



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Tricomas glandulares em *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) do Cerrado: morfologia, densidade e secreção em diferentes populações

LUIZ RICARDO DOS SANTOS TOZIN

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Botânica), AC:
Morfologia e Diversidade de Plantas.

BOTUCATU-SP

2014



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Tricomas glandulares em *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae)
do Cerrado: morfologia, densidade e secreção em diferentes
populações**

LUIZ RICARDO DOS SANTOS TOZIN

**PROF^a DR^a TATIANE MARIA RODRIGUES
ORIENTADORA**

**PROF^a DR^a MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES
CO-ORIENTADORA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Morfologia e Diversidade de Plantas.

BOTUCATU-SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Tozin, Luiz Ricardo dos Santos.

Tricomas glandulares em *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) do cerrado : morfologia, densidade e secreção em diferentes populações / Luiz Ricardo dos Santos Tozin. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Tatiane Maria Rodrigues

Coorientador: Marcia Ortiz Mayo Marques

Capes: 20300000

1. Plantas dos cerrados - População. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Anatomia vegetal. 4. Morfologia vegetal.

Palavras-chave: Anatomia; Cerrado stricto sensu; Óleo; Tricomas.

Dedicatória

*Dedico essa vitória aos meus pais,
Maria de Lourdes e José Luiz, e ao
meu irmão, Luiz Renato, que
sempre me apoiaram e estiveram ao
meu lado.*

Agradecimentos

À **Deus**, por mais essa vitória.

À **Prof. Dra. Tatiane Maria Rodrigues**, pela orientação, paciência e exemplo como profissional.

À **Prof. Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques**, pela co-orientação e acolhida no Instituto Agronômico de Campinas.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela bolsa concedida.

À todos **funcionários, alunos e professores do Departamento de Botânica**, pela convivência, ensinamentos e auxílios.

À **equipe do Centro de Microscopia Eletrônica**, IBB, UNESP, pela assistência no processamento das amostras.

Aos **funcionários da Biblioteca Central da UNESP, Câmpus Botucatu**, pela edição da ficha catalográfica.

À **Jennifer Bufalo e Angélica Rodrigues**, pela amizade e apoio em momentos difíceis.

À **Yve, Fernanda e Maëla**, pela convivência e auxílio no laboratório.

Ao **Jr Ricca**, pelo apoio, compreensão e muitas vezes válvula de escape.

À todos que contribuíram de forma direta ou indireta para concretização deste trabalho. Muito obrigado!!!

Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	3
Introdução.....	5
Revisão Bibliográfica.....	7
Apresentação dos Capítulos.....	19
Capítulo 1.....	20
Resumo.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	23
Resultados.....	25
Discussão.....	31
Referências Bibliográficas.....	38
Tabelas.....	47
Figuras.....	49
Legenda das figuras.....	56
Capítulo 2.....	61
Resumo.....	61
Introdução.....	62
Material e Métodos.....	63
Resultados.....	67
Discussão.....	70
Referências Bibliográficas.....	75
Tabelas.....	82
Figuras.....	88
Considerações Finais.....	92
Referências Bibliográficas.....	94

TOZIN, L. R. S. **TRICOMAS GLANDULARES EM *LIPPIA ORIGANOIDES* KUNTH (VERBENACEAE) DO CERRADO: MORFOLOGIA, DENSIDADE E SECREÇÃO EM DIFERENTES POPULAÇÕES.** 2013. 100p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

Resumo - Espécies de Verbenaceae são conhecidas pela produção de óleos essenciais em tricomas glandulares amplamente distribuídos no corpo vegetal. Embora a presença desses tricomas seja um caráter constitutivo para espécies da família, a densidade glandular e a quantidade e a composição química da secreção produzida podem variar de acordo com as condições ambientais. *Lippia origanoides*, espécie nativa do Cerrado brasileiro, vem sendo apontada como produtora de compostos bioativos importantes no combate a células cancerosas e na proteção antibacteriana, antiviral e antioxidante. O objetivo deste trabalho foi estudar a distribuição, morfologia, histoquímica e ultraestrutura dos tricomas de *L. origanoides*, além de avaliar a densidade glandular e o perfil químico do óleo essencial extraído de órgãos vegetativos e reprodutivos em plantas de duas fisionomias de Cerrado. Foram coletadas amostras de folhas completamente expandidas, primórdios foliares, caules e inflorescências de indivíduos do campo cerrado e do cerrado *stricto sensu*. O material foi processado segundo técnicas convencionais em microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão e fitoquímica. Cinco morfotipos de tricomas glandulares típicos (I a V) e um morfotipo de tricoma tector (VI) com atividade secretora mostraram distribuição diferencial nos órgãos vegetativos e reprodutivos de *L. origanoides*. Tais morfotipos de tricomas diferiram entre si quanto ao formato e número de células da cabeça, do pedúnculo e da base, além da composição, local de acúmulo e modo de acúmulo e liberação da secreção. Nossos resultados sugerem uma relação entre morfotipo glandular e composição da secreção. Compostos fenólicos, proteínas e polissacarídeos foram identificados nos tricomas I a V; terpenos nos tricomas I, II, IV e V; e alcalóides nos tricomas tipo III. Nos tricomas do tipo VI foram encontrados lipídios totais, terpenos e alcalóides. Os aspectos ultraestruturais observados corroboraram os resultados dos testes histoquímicos e forneceram subsídios para o entendimento do processo secretor em cada morfotipo de tricoma. A densidade glandular e o rendimento do óleo essencial foram maiores nas inflorescências em comparação com as folhas.

Embora as folhas de indivíduos do campo cerrado tenham apresentado maior densidade glandular, não foram observadas diferenças no rendimento do óleo essencial entre as diferentes populações. A composição química do óleo essencial mostrou-se diferente entre os indivíduos das diferentes áreas e entre indivíduos da mesma população; em cada área foram encontrados três grupos químicos. Nossos dados evidenciaram a diversidade morfológica e funcional dos tricomas glandulares e a plasticidade química de *L. origanoides* indicando a necessidade de maior controle na utilização do óleo produzido por esta espécie.

Palavras-chave: anatomia, campo cerrado, cerrado *stricto sensu*, óleo, tricomas, ultra-estrutura

TOZIN, L. R. S. **GLANDULAR TRICHOMES OF *Lippia origanoides* KUNTH (VERBENACEAE) FROM CERRADO: MORPHOLOGY, DENSITY AND SECRETION IN DIFFERENT POPULATIONS.** 2013. 100p. MSc DISSERTATION – BIOSCIENCE INSTITUTE, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

Abstract – Verbenaceae species are known for the production of essential oils in glandular trichomes widely distributed in the plant body. Although the occurrence of these trichomes is a constitutive character to Verbenaceae, the glandular density and the quantity and chemical composition of the secretion can vary according to the environmental conditions. *Lippia origanoides*, a native species from the Brazilian Cerrado, has been identified as producer of bioactive compounds important in the treatment against cancer cells and in the antibacterial, antiviral and antioxidant protection. Our aim was to study the distribution, histochemistry and ultrastructure of the trichomes in *L. origanoides*, in addition to evaluate the glandular density and the chemical profile of the essential oils from vegetative and reproductive organs in plants from two physiognomies of Cerrado. Samples of expanded leaves, leaf primordia, stem and inflorescences were collected from individuals of campo cerrado and cerrado *stricto sensu*. The samples were processed according to conventional techniques in light microscopy, scanning and transmission electron microscopy and phytochemistry. Five morphotypes of typical glandular trichomes (I to V) and one morphotype of tector trichome (VI) with secretory activity exhibited differential distribution in the vegetative and reproductive organs of *L. origanoides*. These morphotypes of trichomes differ in the shape and number of cells in the head, stalk and basis, and in the composition, accumulation site and liberation mode of the secretion. Our results suggest a relation between glandular morphotype and secretion composition. Phenolic compounds, proteins and polysaccharides were identified in trichomes I to V; terpenes in trichomes I, II, IV and V; alkaloids in trichomes III. In trichomes VI, total lipids, terpenes and alkaloids were identified. The ultrastructural aspects corroborated the results of the histochemical tests and provided subsidies to understand the secretory process in each morphotype of trichome. The glandular density and the essential oil yield in the inflorescences were higher than in leaves. Although the leaves of plants from campo cerrado have shown higher glandular density, differences in the oil yield were not

observed between the different populations. The chemical composition of the essential oils was different in the plants from different areas and among plants from the same population; three different chemotype were identified in each area. Our data evidenciated the morphological and functional diversity of the glandular trichomes and the chemical plasticity of *L. origanoides* and indicate the need for a higher control of the utilization of the oil produced by this species.

Palavras-chave: anatomy, campo cerrado, cerrado *stricto sensu*, oil, trichomes, ultrastructure

Introdução

A presença de tricomas glandulares é um aspecto constitutivo e diagnóstico para muitas espécies de plantas pertencentes a diferentes famílias (Judd et al. 2009). Entretanto, diversos fatores bióticos e abióticos podem levar a variações na distribuição e densidade dessas glândulas, além da quantidade e composição química da secreção produzida por elas. Estudos demonstram que a herbivoria, temperatura, luminosidade, disponibilidade hídrica e sazonalidade são fatores exógenos capazes de influenciar a formação e funcionamento dos tricomas glandulares em diferentes grupos vegetais (Gianfagna et al. 1992; Werker 2000; Pérez-Estrada et al. 2000; Juliani-Jr et al. 2002; Santos 2004; Viljoen et al. 2005; Argyropoulou et al. 2007; Gonzáles et al. 2008; Martinez-Natarén et al. 2011).

Espécies de Verbenaceae são caracterizadas pela abundância de tricomas glandulares em órgãos vegetativos e reprodutivos, sendo tais glândulas os principais sítios de síntese e acúmulo dos metabólitos que conferem características medicinal e/ou aromática a essas plantas (Pascual et al. 2001; Judd et al. 2009; Souza & Lorenzi 2008). Pesquisas indicam que a diversidade morfológica dos tricomas glandulares em espécies de Verbenaceae é bastante grande e mais de um tipo morfológico de tricoma pode estar presente no mesmo indivíduo (Inamdar 1969; Bonzani et al. 2003; Santos et al. 2004; Combrick et al. 2007; Favorito 2009; Argyropoulou et al. 2010; Martinez-Natarén et al. 2011). Apesar da importância dos tricomas glandulares como sítios de produção de substâncias biotivas em Verbenaceae, estudos detalhados de sua estrutura são escassos (Inamdar 1969; Bonzani et al. 2003; Santos et al. 2004; Combrick et al. 2007; Favorito 2009; Argyropoulou et al. 2010; Martinez-Natarén et al. 2011), principalmente no que diz respeito às espécies nativas (Favorito 2009).

Lippia, o maior gênero de Verbenaceae, compreende cerca de 240 espécies, muitas delas de grande importância na medicina popular, na complementação alimentar e no fornecimento de substratos para as indústrias de fármacos e de cosméticos (Pascual et al. 2001; Aguiar & Costa 2005). A secreção produzida pelos tricomas glandulares de espécies pertencentes a esse gênero apresenta importantes atividades biológicas, como antiviral, bactericida, alelopática, anti-inflamatória (Pilau et al. 2011; Rivero-Cruz et al. 2011; Rodrigues et al. 2011; Gomes et al. 2012; Marco et al. 2012; Stashenko et al. 2013; Veras et al. 2013). Estudos demonstram que a secreção produzida por espécies de

Lippia apresenta ampla plasticidade química variando de monoterpene a sesquiterpene dominante, sendo que dentro da mesma espécie diversos quimiotipos podem ser diferenciados (Frighetto et al. 1998; Santos et al. 2004; Vila et al. 2004; Costa et al. 2005; Mishra et al. 2010; Sarrazin et al. 2012).

Lippia origanoides, espécie nativa do Cerrado brasileiro, pode ser encontrada em diferentes fisionomias da vegetação. Recentemente foi sinonimizada com outras 28 espécies, dentre elas *Lippia salviifolia*, *Lippia sidoides* e *Lippia graveolens*. Pesquisas recentes indicam que seus compostos bioativos isolados podem inibir o crescimento de células cancerosas causadoras de melanoma e causar apoptose em diversos outros tipos de células cancerosas (Funari et al. 2011; Dozio et al. 2010). As propriedades antibacteriana, antiviral, antioxidante, acaricida, anti-inflamatória e alelopática do óleo essencial extraído das suas folhas também são comumente referidas em literatura (Rocha-Gusmán et al. 2007; Stashenko et al. 2010; Pilau et al. 2011; Rodrigues et al. 2011; Gomes et al. 2012; Marco et al. 2012; Veras et al. 2013).

Visando ampliar as informações sobre os tricomas glandulares em representantes nativos de Verbenaceae, este trabalho teve como objetivo estudar a distribuição, morfologia, histoquímica e ultraestrutura dos tricomas de *Lippia origanoides* Kunth, além de avaliar a densidade glandular e o perfil químico do óleo essencial produzidos em órgãos vegetativos e reprodutivos em plantas crescendo em duas fisionomias de Cerrado, buscando correlacionar possíveis variações com as características do ambiente.

Revisão bibliográfica

1. Sistemática e morfologia da família Verbenaceae

De acordo com o sistema de classificação de Cronquist (1981), a ordem Lamiales incluía as famílias Lennoaceae, Boraginaceae, Verbenaceae (incl. Avicenniaceae, Chloanthaceae, Dicrastylidiaceae, Nyctanthaceae, Phrymaceae, Stilbaceae, Symphoremataceae) e Lamiaceae (incl. Menthaceae, Tetrachondraceae). Segundo o APG III (2009), estão contidas em Lamiales as famílias Acanthaceae, Bignoniaceae, Byblidaceae, Calceolariaceae, Carlemanniaceae, Gesneriaceae, Lamiaceae, Lentibulariaceae, Linderniaceae, Martyniaceae, Mazaceae, Oleaceae, Orobanchaceae, Paulowniaceae, Pedaliaceae, Phrymaceae, Plantaginaceae, Plocospermataceae, Schlegeliaceae, Scrophulariaceae, Stilbaceae, Tetrachondraceae, Thomandersiaceae e Verbenaceae. Nesta classificação atual, grupos anteriormente incluídos dentro de determinada família pelo sistema de classificação de Cronquist voltam a ser considerados famílias e diversas novas famílias são criadas.

De acordo com Judd et al. 2009, Lamiales é claramente monofilética, sendo caracterizada pela presença de tricomas glandulares, estocagem de carboidratos na forma de oligossacarídeos, extensão do tecido parenquimático desde o conectivo das anteras até os lóculos, presença frequente de estômatos diacíticos e inclusões protéicas nos núcleos das células do mesofilo. Dentro desta ordem, Verbenaceae e Lamiaceae são consideradas famílias-irmãs por apresentarem espécies com ovário dividido em quatro lóculos devido à presença de falsos septos, além da ocorrência de óleos aromáticos (APG III 2009; Judd et al. 2009; Souza & Lorenzi 2008).

A família Verbenaceae foi criada com o que se conhecia por Verbenoideae, subfamília de Lamiaceae e tem sua monofilia sustentada por caracteres morfológicos e análises genéticas (Judd et al. 2009). Segundo APG III, Verbenaceae compreende 36 gêneros e cerca de 1000 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo ervas, arbustos e menos frequentemente árvores ou lianas (Souza & Lorenzi 2008; Judd et al. 2009). No Brasil foram descritos 16 gêneros e cerca de 300 espécies (Souza & Lorenzi 2008), sendo as espécies de *Lippia* L. e *Stachytarpheta* Vahl. bastante comuns nos cerrados e campos rupestres (Souza & Lorenzi 2008).

As espécies pertencentes à Verbenaceae são caracterizadas pela presença de caule quadrangular em secção transversal, tricomas glandulares produtores de óleos

aromáticos e tricomas tectores comumente unicelulares, às vezes calcificados ou silicificados. Apresentam filotaxia oposta ou ocasionalmente verticilada; suas folhas são simples, sem estípulas, inteiras a serreadas, com venação pinada. Suas flores são pequenas, bissexuadas, zigomorfas, diclamídeas, com estames didínamos; o ovário é súpero e bicarpelar. Suas inflorescências apresentam crescimento indeterminado formando racemos, espigas ou glomérulos, terminais ou axilares. O fruto é do tipo drupa com dois a quatro caroços ou esquizocárpico; as sementes não apresentam endosperma (Judd et al. 2009; Souza & Lorenzi 2008).

Diversas espécies de Verbenaceae apresentam potencial ornamental, tais como aquelas pertencentes aos gêneros *Lantana*, *Duranta* e *Verbena*, as quais são amplamente utilizadas em paisagismo; ainda inúmeros exemplares desta família possuem propriedades aromáticas, como as dos gêneros *Lippia*, *Lantana* e *Aloysia*. Além disso, muitas espécies possuem grande importância medicinal, tais como aquelas pertencentes aos gêneros *Stachyparpheta*, *Verbena* e *Lippia*, sendo amplamente utilizadas pela indústria de fármacos e na medicina popular (Pascual et al. 2001; Judd et al. 2009; Souza & Lorenzi 2008).

1.1 O gênero *Lippia*

O gênero *Lippia* L. está inserido na tribo Lantaneae Endler, a maior das oito tribos de Verbenaceae, e é organizado em sete seções (Marx et al. 2010). Compreende plantas com diferentes hábitos como ervas, arbustos e arvoretas. Embora apresente cerca de 240 espécies com ampla distribuição, a maior riqueza de espécies encontra-se na América do Sul, com poucos exemplares endêmicos da África (Pascual et al. 2001).

Morfologicamente, *Lippia*, é caracterizada por inflorescências em forma de capítulos, normalmente axilares, com flores de cálice bilobado e fruto seco separado em duas unidades (O’Leary et al. 2012). As propriedades medicinais e aromáticas das espécies de *Lippia* são atribuídas aos metabólitos secundários produzidos por tricomas glandulares presentes em seus órgãos vegetativos e reprodutivos (Werker 2000; Pascual et al. 2001). Segundo Pascual et al. (2001), os óleos essenciais e as substâncias fenólicas são os principais compostos produzidos por essas glândulas.

Estudos demonstram que os óleos essenciais produzidos por espécies deste gênero apresentam propriedades antibacteriana, analgésica, antiviral, antioxidante,

acaricida, anti-inflamatória e alelopática (Rocha-Gusmán et al. 2007; Stashenko et al. 2010; Pilau et al. 2011; Rodrigues et al. 2011; Gomes et al. 2012; Marco et al. 2012; Veras et al. 2013). Ainda, espécies de *Lippia* vêm sendo utilizadas em programas de complementação alimentar no Brasil, a exemplo da *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.

Dentre as espécies de *Lippia* com reconhecido potencial econômico e medicinal, *Lippia alba* é a mais conhecida e profundamente estudada sob os pontos de vista químico, etnofarmacológico e estrutural (Pascual et al. 2001; Santos et al. 2004; Hennebelle et al. 2008; Oliveira et al. 2006). Conhecida popularmente como erva-cidreira-brasileira ou melissa, *L. alba* é consumida em forma de chás, macerados e banhos para diversos fins, além de apresentar atividade antifúngica, bactericida e analgésica comprovadas (Pascual et al. 2001; Aguiar & Costa 2005). Estudos apontam que a composição química do óleo essencial dentre as espécies do gênero é bastante variável, podendo ser monoterpeneo dominante (Sarrazin et al. 2012) ou sesquiterpeneo dominante (Silva et al. 2010). Pesquisas demonstram ainda que variação na composição química do óleo pode ocorrer dentro da mesma espécie de acordo com o local de ocorrência da população ou estação do ano (Zoghbi et al. 2002).

Neste gênero, 41 espécies foram registradas para a seção *Goniostachyum*. Entretanto, muitos destes táxons não são formalmente alocados, sendo todos sustentados por caracteres morfológicos que definem esta seção. Assim, muitos autores mencionam espécimes com caracteres intermediários ou simultâneos e citam o mesmo espécime para mais de uma espécie, mostrando assim a dificuldade de distinção dos táxons em *Goniostachyum* (Salimena & Giulietti 1998; Salimena & Santos-Silva 2009). Nesse sentido, O'Leary et al. (2012) revisaram a seção *Goniostachyum* deste gênero, constatando que inúmeros indivíduos semelhantes estavam sendo denominados de diferentes formas. Assim, com base em análises de agregação populacional e conceito de espécie filogenética, os autores reuniram as 41 espécies em apenas quatro, *Lippia sericea* Cham., *Lippia grata* Schauer, *Lippia organoides* Kunth, e *Lippia stachyoides* Cham..

1.2 *Lippia organoides* Kunth

Lippia organoides é caracterizada por pubescência em órgãos vegetativos e reprodutivos, havendo relatos de tricomas não glandulares retos, rígidos e pontiagudos,

e tricomas glandulares. Apresenta inflorescência frondosa, livre e com brácteas apicais. Possui ampla distribuição, ocorrendo da Guiana até o norte da Argentina na América do Sul e na América Central (Fig. 1) (O’Leary et al. 2012).



Figura 1. Distribuição geográfica de *Lippia origanoides* Kunth (O’Leary et al. 2012).

Recentemente foi sinonimizada com outras 28 espécies, dentre elas *Lippia sidoides* Cham., *Lippia salviifolia* Cham. e *Lippia graveolens* Kunth (O’Leary et al. 2012). Dessa forma, estudos com enfoque químico e farmacológico para *Lippia origanoides* (*sensu lato*) são encontrados na literatura com grande variedade de nomes, gerando confusão, além de divergências (Monteiro et al. 2007; Brito et al. 2009; Fernandes et al. 2008; Fontenelle et al. 2007; Melo et al. 2011; Morais et al. 2012).

Para esta espécie, diversos estudos foram realizados focando a composição química e as atividades antimicrobiana (Oliveira et al. 2007; Rivero-Cruz et al. 2011), antiviral (Pilau et al. 2011), acaricida (Cavalcanti et al. 2010; Gomes et al. 2012),

antioxidante (Rocha-Gusmán et al. 2007), antibacteriana (Rodrigues et al. 2011) e anti-inflamatória (Veras et al. 2013) do óleo essencial extraído das folhas. Em grande parte desses trabalhos, diferentes quimiotipos são relatados, contudo normalmente os compostos majoritários são p-cimeno, timol e carvacrol. Stashenko et al. (2010) encontraram além dos quimiotipos representados por carvacrol e timol, um terceiro quimiotipo onde os compostos majoritários são α e β -phellandrenos, p-cimeno e limoneno. Rivero-Cruz et al. (2011) além dos majoritários mencionados anteriormente, também encontraram importantes concentrações de γ -terpineno, β -caryophylleno e 1,8-cineol. Já Rodrigues et al. (2011) encontraram compostos completamente diferentes, sendo os majoritários 1,8-cineol (18,12%), β -oximeno (15,2%), bicyclogermacreno (11,63%) e óxido de caryophylleno (8,32%). Entretanto, de uma forma geral, os trabalhos citados não descrevem as características do ambiente onde os indivíduos ocorrem.

2. Tricomas glandulares

Tricomas glandulares são expansões epidérmicas, uni ou multicelulares, originadas a partir da protoderme (Fahn 1979; Werker 2000; Evert 2006). Estudos indicam que a secreção produzida pelos tricomas glandulares pode apresentar composição química bastante variável podendo ser completamente hidrofílica, completamente hidrofóbica, ou ainda de natureza mista (Evert 2006; Werker 2000).

Dentre as substâncias produzidas pelos tricomas glandulares, os terpenos são os mais comuns (Roshchina & Roshchina 1993; Langenheim 2003). Essas substâncias são formadas a partir de unidades contendo cinco carbonos, designadas isopreno, originadas a partir da rota do ácido mevalônico (MVA) ou da rota do 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP); a união dos isoprenos pode dar origem a terpenos de 10, 15, 20 e 30 carbonos, denominados monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, respectivamente. Os terpenos de menor peso molecular, mono e sesquiterpenos, são voláteis e constituem os óleos essenciais, responsáveis pelo aroma e/ou propriedade medicinal de diversas espécies vegetais (Roshchina & Roshchina 1993; Langenheim 2003).

Segundo Dickison (2000), tricomas glandulares podem ser encontrados em diferentes órgãos, vegetativos e reprodutivos, de uma espécie vegetal. Essas glândulas

têm sua origem nos estádios iniciais da ontogênese de um órgão, sendo que tricomas em diferentes fases do desenvolvimento podem ocorrer lado a lado (Werker 2000). Entretanto, o desenvolvimento de novos tricomas em órgãos em formação continua enquanto houver porções de protoderme, sendo sua produção cessada em áreas já diferenciadas da epiderme (Evert 2006).

Ontogeneticamente, os tricomas glandulares são formados a partir de uma única célula protodérmica. Nos tricomas multicelulares, essa célula protodérmica pode se dividir de forma periclinal e anticlinal; a célula apical resultante diferencia-se na célula secretora que, quando madura, pode apresentar espaço subcuticular para armazenar o exsudato (Dickison 2000; Evert 2006).

De acordo com sua morfologia, os tricomas glandulares podem ser classificados em peltados e capitados (Evert 2006). Os tricomas peltados consistem de uma célula basal, uma célula peduncular curta e uma ampla cabeça com 4-18 células secretoras posicionadas em uma única camada em um ou dois anéis concêntricos (Fahn 1979; Evert 2006 e referências citadas). Já os tricomas capitados consistem de uma célula basal, um pedúnculo com uma a diversas células de altura e cabeça ovóide ou esférica com 1-4 células (Fahn 1979; Evert 2006 e referências citadas). Ainda, segundo Ascensão & Pais (1998), tricomas capitados possuem um pedúnculo duas vezes mais longo que sua cabeça. Contudo, tal classificação foi proposta com base nos tricomas glandulares presentes em Lamiaceae, não sendo possível aplicá-la para todas as demais famílias vegetais.

Os tricomas glandulares também ainda podem ser classificados de acordo com o modo e tempo de liberação da secreção em dois tipos: tricoma glandular de curto prazo - que libera o material produzido logo após a produção (Werker 1993), podendo atuar como lubrificante para facilitar a expansão foliar; e tricoma glandular de longo prazo - no qual o material secretado é liberado apenas quando algum fator externo causa o rompimento da cutícula (Werker 1993, Ascensão et al. 1995).

Análises ultraestruturais mostram que a população de organelas nas células secretoras dos tricomas glandulares varia com a natureza química da secreção produzida. Assim, células secretoras de mucilagem apresentam abundância de dictiosomos enquanto que em células que secretam substâncias lipofílicas é comum a ocorrência de plastídios sem tilacóides e o maior desenvolvimento do retículo endoplasmático liso o qual está envolvido na produção e transporte desse tipo de

substância (Evert 2006; Dickison 2000; Fahn 1979). Ainda, células secretoras de substâncias mistas possuem dictiossomos, plastídios e retículo endoplasmático liso em abundância (Fahn 1979).

De acordo com a natureza química das substâncias produzidas, ocorrem diferentes processos de liberação da secreção a partir das células secretoras. No processo de secreção granulócrino, a liberação do exsudato acontece por meio de vesículas que liberam seu conteúdo para o meio apoplástico, enquanto que no processo de secreção écrino, ocorre passagem direta de pequenas moléculas pela membrana plasmática e parede celular. Ainda, em determinadas situações, para que a secreção seja liberada, é necessário que ocorra ruptura do protoplasto da célula secretora, caracterizando assim o processo holócrino de secreção (Fahn 1979; Evert 2006).

Em alguns casos, a secreção liberada a partir do protoplasto da célula secretora pode ser armazenada no espaço subcuticular e ser liberada para o meio externo através de poros ou do rompimento da cutícula. Em outros casos, o espaço subcuticular não é formado, sendo a secreção armazenada em espaços intercelulares na cabeça secretora. (Fahn 1979; Evert 2006 e literatura citada).

2.1 Tricomas glandulares em Verbenaceae

Embora trabalhos abordando a morfologia das estruturas secretoras de Verbenaceae sejam raros, estudos demonstram que a diversidade morfológica dos tricomas glandulares em espécies desta família é grande e mais de um tipo morfológico de tricoma pode estar presente num mesmo órgão de uma mesma planta (Inamdar 1969; Bonzani et al. 2003; Santos et al. 2004; Combrick et al. 2007; Favorito 2009; Argyropoulou et al. 2010; Martinez-Natarén et al. 2011).

Nesse sentido, Inamdar (1969) estudou as estruturas epidérmicas de 14 espécies de Verbenaceae, porém nenhuma do gênero *Lippia*. Neste trabalho, foram descritos 12 tipos de tricomas, sendo apenas três deles glandulares: 1- Capitado de pedúnculo curto; 2- Glandular peltado e 3- Tricoma glandular peltado filiforme composto de base, pedúnculo filiforme unisseriado com 4-6 células e cabeça com 4-8 células.

Mais recentemente, Bonzani et al. (2003) observaram a variedade morfológica dos tricomas glandulares no caule de espécies de Verbenaceae pertencentes aos gêneros *Lippia*, *Lantana* L. e *Aloysia* Palau. Para as três espécies de *Lippia* - *L. turbinata*

Griseb., *L. junelliana* (Moldenke) Tronc. e *L. integrifolia* (Griseb.) Hieron. – foram descritos tricomas curtos com pedúnculo bicelular e cabeça com 1 a 4 células; além dos tricomas curtos, em *L. junelliana*, foram observados tricomas longos com cabeça pluricelular. Para *Lantana camara* L. foram observados tricomas glandulares curtos com pedúnculo bicelular e cabeça secretora com 1-2 células e tricomas longos com pedúnculo e cabeça pluricelulares. Para as espécies de *Aloysia* - *A. polystachya* (Griseb.) Moldenke, *A. citriodora* Ortega ex Pers. e *A. gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. – foram descritos tricomas glandulares com pedúnculo curto com 1-2 células e cabeça secretora com 1-2 células, tendo sido observada variação na densidade dessas glândulas entre as três espécies estudadas.

Para *Lippia alba* foram descritos três tipos morfológicos de tricomas secretores de substâncias lipofílicas. O primeiro tipo morfológico apresenta uma célula basal, uma peduncular e cabeça secretora bicelulares; o segundo é constituído por uma célula basal, uma célula peduncular e uma porção capitada bicelular; o terceiro tipo apresenta uma célula basal estreita e uma porção capitada globosa (Santos et al. 2004). Os autores ressaltam a distribuição diferencial dessas glândulas, uma vez que o primeiro e o segundo tipo de tricomas foram observados em ambas as faces foliares enquanto que o terceiro tipo foi encontrado apenas na face abaxial das folhas.

Estudos apontam ainda que diferentes tipos morfológicos de tricomas glandulares estão associados à produção de diferentes categorias de substâncias em espécies de *Lippia* (Combrick et al. 2007; Favorito 2009). Em *Lippia scaberrima* Sond., Combrick et al. (2007) encontraram três tipos morfológicos de tricomas glandulares. Os tricomas peltados bulbosos apresentam maior tamanho e são os responsáveis pela produção de terpenos, representando o principal sítio de armazenamento de óleos essenciais. Tricomas capitados e peltados curtos foram identificados como produtores de substâncias fenólicas. O terceiro tipo morfológico de tricoma apresenta formato de uma seta cônica delgada com superfície ornamentada e base unisseriada, tendo sido descritos como produtores de fenólicos e terpenos não-voláteis; esses autores foram os primeiros a relatar a atividade secretora dos tricomas com formato de seta em *L. scaberrima*.

Argyropoulou et al. (2010) estudaram a anatomia e a histoquímica da folha de *Lippia citriodora* H.B.K., e identificaram pelo menos cinco tipos de tricomas glandulares secretando substâncias de diferentes classes químicas. O tipo I é mais ou

menos esférico com pedúnculo e cabeça unicelulares de igual tamanho; o tipo II é oblongo com uma célula curta no pedúnculo, cabeça unicelular alongada e 1-2 células basais; tipo III é similar ao tipo II, mas a célula basal constitui parte do pedúnculo. O tipo IV é o primeiro a se diferenciar durante do desenvolvimento foliar, e é formado por pedúnculo unicelular curto e cabeça unicelular esférica. O tipo V é muito raro, e exclusivamente localizado nas porções epidérmicas sobre as nervuras; são compostos por pedúnculo unicelular e cabeça com 4-8 células e aparentemente não possui espaço subcuticular para estoque dos produtos secretados.

Martinez-Natarén et al. (2011) estudando populações de *Lippia graveolens*, popularmente conhecida como orégano-mexicano, encontraram dois tipos de tricomas glandulares - um peltado e outro capitado. O primeiro tipo é constituído de uma célula basal, pedúnculo curto e cabeça secretora ampla e esférica com acúmulo de óleo essencial no espaço subcuticular. O segundo tipo é constituído por cabeça unicelular arredondada, com tamanho inferior a do peltado e pedúnculo alongado. Os dois tipos são encontrados em ambas as superfícies foliar e aparentemente estão distribuídos aleatoriamente.

No que se refere às espécies nativas desta família, os estudos são ainda mais raros. Favorito (2009) relata a ocorrência de cinco tipos morfológicos de tricomas glandulares capitados em órgãos vegetativos e reprodutivos de *Lippia stachyoides* Cham., os quais diferem entre si com relação ao número de células, natureza química da secreção produzida e aspectos ultraestruturais das células da cabeça e do pedúnculo. Segundo a autora, as variações das características químicas da secreção produzida estão relacionadas aos aspectos celulares diferenciais de cada tipo morfológico de tricoma glandular.

3. Influência de fatores exógenos na densidade de tricomas glandulares e na produção da secreção em táxons diversos

Embora a ocorrência dos tricomas glandulares seja um caráter constitutivo em espécies pertencentes a diversas famílias de angiospermas, incluindo Verbenaceae (Judd et al. 2009), diversos fatores bióticos e abióticos podem levar a variações na distribuição e densidade dessas glândulas, além da quantidade e composição química da secreção produzida por elas. Estudos demonstram que a herbivoria, temperatura, luminosidade, disponibilidade hídrica e sazonalidade são fatores exógenos capazes de influenciar a

formação dessas glândulas em diferentes espécies (Gianfagna et al. 1992; Werker 2000; Pérez-Estrada et al. 2000; Juliani Jr et al. 2002; Santos 2004; Viljoen et al. 2005; Argyropoulou et al. 2007; Gonzáles et al. 2008; Martinez-Natarén et al. 2011).

Nesse sentido, Gianfagna et al. (1992) estudaram experimentalmente a influência da temperatura e do fotoperíodo na densidade de tricomas glandulares em folhas de *Lycopersicon hirsutum* f. *hirsutum* Dunal, uma espécie de Solanaceae. Em condições de dias curtos a densidade de tricomas nas folhas foi duas vezes maior em plantas mantidas a 25/20°C (dia/noite) em comparação com aquelas sob 20/15 °C ou a 30/25 °C. Em plantas mantidas em condição de dias longos a temperatura não influenciou a densidade de tricomas; nessa condição, a densidade glandular foi maior ou igual àquela encontrada em plantas de dias curtos. Ainda, em plantas mantidas em condições de dias curtos, o conteúdo de zingibereno produzido pelos tricomas foi três vezes maior que nas plantas mantidas em condições de dias longos.

Pérez-Estrada et al. (2000) analisaram a influência da sazonalidade e do sombreamento na densidade de tricomas urticantes em folhas de *Wigandia urens* (Ruiz & Pav.) Kunth. Os autores observaram que a densidade de tricomas foi maior em plantas expostas ao sol quando comparada às plantas sombreadas, tanto na estação seca quanto na chuvosa. Ainda, foi possível detectar maior densidade de tricomas glandulares nas folhas durante a estação seca. A densidade de tricomas foliares nessa espécie foi positivamente correlacionada com a temperatura e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e negativamente correlacionada com a transpiração.

Martinez-Natarén et al. (2011) estudaram a variação na densidade de tricomas glandulares em nove populações *Lippia graveolens*, pertencente a três regiões bioclimáticas no México. Ao contrário do esperado pelos autores, os indivíduos vegetando na região mais árida apresentaram menor densidade de tricomas. Neste trabalho, os autores concluem que as condições do microambiente e os fatores genéticos precisam ser melhores estudados para entender de fato as respostas dos indivíduos ao ambiente.

Pesquisas demonstram ainda que inúmeros fatores ambientais, como intensidade luminosa, índice pluviométrico, sazonalidade, altitude, ciclo circadiano, entre outros, atuam diretamente nos processos fisiológicos primários, fotossíntese e respiração, e podem influenciar indiretamente a produção de metabólitos secundários, cuja síntese depende de produtos do metabolismo primário, podendo assim influenciar de forma

direta na produção e composição do óleo essencial (Taiz & Zeiger 2006; Gobbo-Neto & Lopes 2007).

Trabalhos focados na composição química do óleo essencial de espécies do gênero *Lippia* são bastante comuns na literatura (Frighetto et al. 1998; Matos et al. 1999; Matos et al. 2000; Santos et al. 2004; Vila et al. 2004; Costa et al. 2005; Argyropoulou et al. 2007; Mishra et al. 2010; Sarrazin et al. 2012), bem como estudos relatando as variações da composição química do óleo essencial de acordo com o ambiente em que as populações vegetam (Chagonda et al. 2000; Zoghbi et al. 2002; Juliani-Jr et al. 2002; Viljoen et al. 2005; Neves et al. 2008; Mesa-Arango et al. 2010; Silva et al. 2010).

Zoghbi et al. (2002) identificaram os constituintes químicos do óleo essencial de *Lippia lupulina* Cham. em amostras do caule e das folhas de três populações localizadas no Mato Grosso nas estações seca e chuvosa. As amostras coletadas na estação chuvosa apresentaram maior quantidade de óleo essencial em relação às da estação seca, com predomínio de monoterpenos. Foi encontrada diferença na composição química do óleo nas três áreas estudadas, o que, segundo os autores, deve-se às características do ambiente. Os autores observaram ainda variações na composição química do óleo produzido em flores em relação ao óleo extraído de órgãos vegetativos.

Variação intraespecífica da composição do óleo em folhas de *Lippia junelliana* (mold.) Tronc., espécie endêmica argentina, foi detectada nas diferentes populações estudadas (Juliani Jr et al. 2002). Juliani Jr et al. (2002) observaram variações dos quimiotipos na secreção produzida por indivíduos de diferentes populações, sendo a composição química dentro de dado quimiotipos estável. Contudo, foi encontrado que o rendimento do óleo essencial varia consideravelmente entre as populações, o que foi atribuído pelos autores a influencia da luminosidade diferencial em cada ambiente.

Para *Lippia javanica* (Burm f.) Spreng., espécie africana utilizada na medicina popular para tratamento de doenças respiratórias, foram identificados cinco quimiotipos de acordo com a área de ocorrência da população. Entretanto, variações na composição química do óleo essencial podem ocorrer dentro da mesma população (Viljoen et al. 2005), enfatizando a importância do microambiente na produção deste metabólito secundário pelo vegetal.

Santos et al. (2004) avaliaram o rendimento e a composição do óleo essencial produzido por *Lippia alba* com relação ao quimiotipo limoneno-carvona. Os autores

observaram que as estações do ano (seca e chuvosa) e o horário de coleta da secreção podem influenciar os aspectos analisados. O maior rendimento de óleo foi obtido em amostras coletadas às 15 horas e durante a estação seca.

Argyropoulou et al. (2007) analisaram a composição química do óleo essencial de *Lippia citriodora* durante o mês de maio, quando a taxa de crescimento vegetativo é máxima, e em setembro, em plena floração. Em ambas as amostras, os principais componentes foram geranial, neral e limoneno. Contudo, foi observada alteração na concentração de cada um dos três principais produtos, havendo diminuição do geranial e neral e aumento do limoneno na época de floração. Os autores atribuem tais variações às diferenças fenológicas e fisiológicas entre os indivíduos, uma vez que durante a floração, pode haver maior investimento em mecanismos de proteção contra insetos ou patógenos.

Estudos envolvendo a densidade dos tricomas glandulares e a produtividade e composição química do óleo essencial em folhas e inflorescências de espécies nativas de Verbenaceae em diferentes condições ambientais não foram encontrados na literatura disponível.

Conforme estabelecido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) do IBB, UNESP, os resultados obtidos durante a execução deste Projeto de Mestrado foram reunidos em dois artigos científicos para publicação, os quais são apresentados de acordo com as normas do periódico International Journal of Plant Sciences (A2 – Comitê de Biodiversidade da Capes).

Artigo 1: Distribuição, morfologia, histoquímica e ultraestrutura dos tricomas de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) do Cerrado

Artigo 2: Densidade glandular e perfil químico do óleo essencial em folhas e inflorescências de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) em duas fisionomias de Cerrado

**Distribuição, morfologia, histoquímica e ultraestrutura dos tricomas de *Lippia*
origanoides Kunth (Verbenaceae) do Cerrado**

Luiz Ricardo dos Santos Tozin¹ & Tatiane Maria Rodrigues¹

1.Universidade Estadual Paulista, UNESP, Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Botânica, Botucatu-SP, Brasil.

Tricomas de *L. organoides* (Tozin & Rodrigues)

RESUMO

Introdução: Uma característica comum a membros da família Verbenaceae é a presença de tricomas tectores e glandulares em órgãos vegetativos e reprodutivos. O papel dos tricomas glandulares na produção de óleos essenciais é bem conhecido, o que faz com que diversas espécies dessa família sejam exploradas por seu potencial aromático e medicinal; entretanto, pouco se sabe sobre os aspectos morfológicos dessas glândulas, principalmente no que se refere aos aspectos ultraestruturais. *Lippia organoides*, espécie nativa do cerrado, é conhecida pelas propriedades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e alelopática do óleo essencial extraído de suas folhas. O objetivo deste trabalho foi analisar a distribuição, morfologia, histoquímica e ultraestrutura dos tricomas tectores e glandulares em folhas, caule e inflorescências de *L. organoides*. **Metodologia:** Amostras foram coletadas de indivíduos adultos vegetando no Cerrado e processadas segundo técnicas convencionais em anatomia vegetal e microscopia eletrônica de varredura e transmissão; testes histoquímicos foram realizados para identificação das substâncias produzidas pelos tricomas. **Resultados:** Seis morfotipos de tricomas com distribuição diferencial nos órgãos estudados foram identificados. Os tricomas I a V apresentam características típicas de tricomas glandulares, enquanto que o tricoma tipo VI mostra aspecto morfológico de tricoma

tector e atividade secretora. Compostos fenólicos, proteínas e polissacarídeos foram encontrados nos morfotipos I a V; terpenos foram identificados nos tricomas dos tipos I, II, IV e V, enquanto que alcalóides ocorrem nos tricomas do tipo III. No tricoma tipo VI, foram encontrados terpenos e alcalóides. As características ultraestruturais mostraram peculiaridades nos locais de síntese e na forma de acúmulo e liberação da secreção entre os diferentes morfotipos de tricomas, além de corroborarem os resultados dos testes histoquímicos. **Conclusão:** Nossos dados evidenciam a diversidade morfológica dos tricomas em *L. origanoides* e mostraram uma associação entre morfotipo glandular e natureza da secreção produzida, sugerindo um papel diferencial para cada morfotipo de tricoma.

Palavras-chave: estrutura; secreção; tricoma glandular; tricoma tector.

INTRODUÇÃO

Tricomas são apêndices epidérmicos com morfologia, função e duração bastante variáveis (Evert 2006), sendo descritos em literatura mais de 300 tipos morfológicos diferentes (Kolb & Müller 2004). Com base em sua forma e função, os tricomas podem ser classificados em tectores e glandulares (Werker 2000). Tricomas tectores podem ser uni ou pluricelulares com ápice afilado, arredondado ou bifurcado; não produzem secreção e atuam na proteção contra herbívoros de forma mecânica (Behnke 1984; Werker 2000). Tricomas glandulares são morfológicamente caracterizados pela presença de uma cabeça secretora uni ou multicelular e podem apresentar um pedúnculo curto ou longo (Fahn 1979; Alquini et al. 2006), sendo os principais sítios de síntese e acúmulo de metabólitos secundários (Werker 2000; Pascual et al. 2001; Combrinck et al. 2007).

Espécies de Verbenaceae são conhecidas por seu potencial medicinal e aromático (Pascual et al. 2001; Judd et al. 2009; Souza & Lorenzi 2008), sendo a presença de tricomas em órgãos vegetativos e reprodutivos uma característica comum a membros desta família (Judd et al. 2009). Embora estudos sobre a morfologia dos tricomas de Verbenaceae sejam raros, sabe-se que a diversidade morfológica dessas glândulas em espécies da família é grande (Inamdar 1969; Bonzani et al. 2003; Santos et al. 2004; Combrick et al. 2007; Argyropoulou et al. 2010; Martinez-Natarén et al. 2011). Mais de um tipo morfológico de tricoma pode estar presente num mesmo órgão de uma mesma planta e diferentes morfotipos de tricomas glandulares podem secretar substâncias de diferentes naturezas químicas (Bonzani et al. 2003; Combrick et al. 2007; Argyropoulou et al. 2010). Apesar da importância dos tricomas glandulares de Verbenaceae como principais sítios de produção de substâncias bioativas, estudos que detalhem a morfologia dos tricomas em espécies da família são escassos (Inamdar 1969; Argyropoulou et al. 2010), principalmente no que se refere às espécies nativas.

O gênero *Lippia* apresenta aproximadamente 240 espécies de ampla distribuição (Pascual et al. 2001), muitas delas com grande importância na medicina popular e na indústria farmacêutica (Pascual et al. 2001; Aguiar & Costa 2005). Os óleos essenciais produzidos por espécies deste gênero são ricos em mono e sesquiterpenos e suas atividades antifúngica, bactericida e analgésica vêm sendo experimentalmente comprovadas (Viljoen et al. 2004; Pascual et al. 2001; Aguiar & Costa 2005; Fontenelle et al. 2007; Brito et al. 2009). *Lippia origanoides* Kunth. é uma espécie de Verbenaceae nativa do Cerrado brasileiro. Pesquisas recentes indicam que compostos bioativos isolados, extraídos das partes aéreas desta espécie, podem inibir o crescimento de células cancerosas causadoras de melanoma e acarretar apoptose em outros tipos de células tumorais (Funari et al. 2011; Dozio et al. 2010), além de apresentarem atividades

antimicrobiana, antiviral, acaricida, antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória e alelopática (Oliveira et al. 2007; Rocha-Gusmán et al. 2007; Cavalcanti et al. 2010; Stashenko et al. 2010; Pilau et al. 2011; Rivero-Cruz et al. 2011; Rodrigues et al. 2011; Gomes et al. 2012; Marco et al. 2012; Stashenko et al. 2013; Veras et al. 2013). Contudo, as características estruturais e celulares das glândulas responsáveis por produzir tais compostos são desconhecidas.

O objetivo deste trabalho foi analisar a distribuição, morfologia, histoquímica e ultraestrutura dos tricomas glandulares e tectores nos eixos vegetativo e reprodutivo de *Lippia origanoides* do cerrado, buscando associar o morfotipo glandular com a natureza química da secreção produzida. Nossos resultados proporcionarão avanços no conhecimento sobre os mecanismos de produção de importantes compostos biologicamente ativos e poderão subsidiar pesquisas futuras em diferentes áreas da ciência visando à manipulação dessa produção.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Para esse estudo, foram amostrados cinco indivíduos adultos de *L. origanoides* vegetando no campo cerrado, em uma reserva particular localizada na Fazenda Palmeira da Serra, município de Pratânia (S 22°48'50,2" e W 48°44'35,8"), estado de São Paulo.

Foram coletados ápices caulinares, folhas completamente expandidas localizadas entre o terceiro e quarto nós caulinares, porções de caule jovem localizadas a 1,5 cm do ápice, flores em antese e brácteas.

Ramos férteis foram depositados no Herbário Irina Delanova Gemtchújnicov (BOTU), do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, sob o registro BOTU 28299.

Microscopia de luz

Amostras foram fixadas em FAA 50% (Johansen 1940), desidratadas em série etílica e embebidas em resina metacrilato (Gerrits 1991). Secções transversais com 6µm de espessura obtidas em micrótomato rotativo semi-automático foram coradas com Azul de toluidina 0,05%, pH 4,3 (O'Brien 1964); lâminas permanentes foram montadas com Permout (Gerlach 1969). Os aspectos mais relevantes foram documentados em fotomicroscópio Leica acoplado a sistema de captura de imagens. Para ilustrar as particularidades estruturais dos tricomas foram elaboradas ilustrações com auxílio de microscópio de projeção e câmara clara acoplada ao microscópio de luz.

Testes Histoquímicos

Para identificação das principais classes químicas de substâncias presentes nos tricomas, amostras de folhas e caules jovens recém coletados foram seccionadas com auxílio de micrótomato de Ranvier e as secções com cerca de 10µm de espessura foram tratadas com: Sudan IV para identificação de lipídios totais (Johansen 1940); reagente de Nadi para terpenos (David & Carde 1964); solução de cloreto férrico 10% para compostos fenólicos (Johansen 1940); ácido periódico/reagente de Schiff (PAS) para polissacarídeos não-celulósicos (Amaral et al. 2001; Taboga & Vilamaior 2001); reagente de Dragendorff para alcalóides (Yoder & Mahlberg 1976); azul mercúrio de bromofenol para proteínas (Mazia et al. 1953), solução de acetato cúprico 10% para resina (Johansen 1940) e reagente de Lugol para grãos de amido (Johansen 1940).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras de folhas, caule, flores e brácteas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por uma hora e desidratadas em série etílica. Em seguida, foi realizada secagem em ponto crítico e metalização com ouro (Robards 1978). A análise das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura Fei Quanta.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para o estudo dos aspectos ultraestruturais dos tricomas, amostras de limbo foliar foram fixadas em Karnovsky a 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por uma hora, desidratadas em série cetônica e embebidas em Araldite (Machado & Rodrigues 2004). As amostras ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila (Watson 1958) e citrato de chumbo (Reynolds 1963) e examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Fei Tecnai Spirit.

RESULTADOS

Distribuição, morfologia e histoquímica dos tricomas

Tricomas tectores e glandulares foram observados no caule (Fig. 1A), nas faces abaxial e adaxial do limbo foliar (Fig. 1B), bráctea (Fig. 1C) e pétalas e na face abaxial das sépalas (Fig. 1D). Nas folhas estão presentes desde a fase de primórdios foliares (Fig. 1E). No bordo das brácteas, observa-se um tricoma tector alongado (Fig. 1C). A face abaxial das pétalas é pubescente desde sua região mediana até o ápice, sendo glabra

na porção inferior; na face adaxial das pétalas tricomas ocorrem na altura do estigma. O gineceu e o androceu não apresentaram tricomas glandulares ou tectores.

Foram identificados cinco tipos morfológicos de apêndices com características típicas de tricomas glandulares nos órgãos aéreos de *L. origanoides* (tipos I, II, III, IV e V), e um tipo com formato de tricoma tector (tipo VI), com distribuição diferencial entre os órgãos estudados (Tab. 1).

O tricoma glandular tipo I é composto por uma célula basal proeminente que se insere entre as demais células da epiderme, pedúnculo curto constituído por uma única célula achatada transversalmente e cabeça secretora unicelular ovalada (Fig. 2A-C). Proteína, compostos fenólicos, polissacarídeos, lipídios totais e terpenos foram histoquimicamente detectados na célula da cabeça secretora, e polissacarídeos e lipídios na célula basal e peduncular (Tab. 2).

O tricoma glandular do tipo II possui uma célula basal proeminente, pedúnculo unicelular alongado e uma célula colar estreita que liga o pedúnculo à cabeça secretora unicelular ovalada (Fig. 2D-F). As células da base e do pedúnculo possuem paredes anticlinais espessadas cutinizadas (Fig. 2D-E). Lipídios totais, terpenos e compostos fenólicos foram detectados no protoplasto da célula da cabeça secretora (Tab. 2).

O tricoma do tipo III também é tipicamente glandular e apresenta uma célula basal ligeiramente alongada, pedúnculo unicelular curto e cabeça secretora ovalada com quatro células (Fig. 2G-I). Os testes histoquímicos indicaram a presença de compostos fenólicos na célula basal e peduncular; alcaloides na célula peduncular; além de lipídios totais, compostos fenólicos, proteína, alcaloides e polissacarídeos nas células da cabeça secretora (Tab. 2).

O tipo IV é um tricoma glandular em forma de ampola, composto por uma célula basal ligeiramente alongada, pedúnculo unicelular curto e cabeça secretora alongada

com quatro células (Fig. 2J-L). Substâncias fenólicas, proteínas e terpenos foram detectados nas células da cabeça, proteínas na célula peduncular e polissacarídeos nas células basal, peduncular e da cabeça (Tab. 2).

O glandular tipo V possui base unicelular proeminente, pedúnculo bicelular alongado e cabeça secretora unicelular esférica (Fig. 2M-O). Os testes histoquímicos detectaram substâncias fenólicas na célula da cabeça, proteínas e terpenos nas células do pedúnculo e da cabeça, e polissacarídeos nas células basal, peduncular e da cabeça (Tab. 2).

O tipo VI apresenta morfologia típica de tricoma tector. É alongado, unisseriado com base constituída por 4-10 células formando roseta e ápice cônico unicelular (Fig. 2P-R). Os testes histoquímicos detectaram a presença de lipídios totais, terpenos e alcaloides na célula apical (Tab. 2).

Ultraestrutura dos tricomas

Neste trabalho foram descritos os aspectos ultraestruturais dos cinco tipos morfológicos de tricomas ocorrentes no limbo foliar.

No tricoma tipo I, a célula da cabeça secretora exhibe cutícula delgada, onde observa-se uma linha de deiscência (Fig. 3A). Nesse morfotipo glandular, a cutícula permanece aderida à parede celular, sem a formação de espaço subcuticular (Fig. 3B). Na porção mediana da célula da cabeça, observa-se uma região mais delgada (Fig. 3B); essa região, em estágio posterior do ciclo secretor, se rompe ao redor de toda a circunferência da célula (Fig. 3C) e a porção superior da cabeça se destaca, permanecendo no ápice do tricoma uma estrutura semelhante a um prato (Fig. 3D). As paredes da célula da cabeça são delgadas e apresentam aspecto laxo; ramificações elétron-densas atravessam a parede e a cutícula (Fig. 3E) e são observadas em toda a

extensão da célula; o citoplasma é reduzido a uma pequena faixa na periferia da célula devido à presença de um grande vacúolo central preenchido por secreção com aspecto fibrilar e grânulos elétron-densos (Fig. 3 B, E); no citoplasma são encontradas vesículas e gotas de óleo em abundância (Fig. 3E). A célula do pedúnculo possui parede celular pecto-celulósica delgada (Fig. 3B, F); plasmodesmos ocorrem nas paredes periclinais conectando a célula peduncular com a base (Fig. 3F) e a cabeça do tricoma; o citoplasma é abundante e apresenta mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, plastídios desprovidos de tilacóides contendo gotas lipídicas volumosas e vacúolos pequenos; gotas de óleo são observadas dispersas no citoplasma (Fig. 3F). A célula basal possui parede celular pecto-celulósica delgada (Fig. 3B, G, H), com plasmodesmos nas paredes anticlinais e periclinais conectando-a com a célula peduncular, células epidérmicas vizinhas e mesofilo (Fig. 3G, H); o núcleo é volumoso com contorno irregular (Fig. 3H); o citoplasma é abundante e apresenta dictiossomas ativos na produção de vesículas (Fig. 3G), extensivo retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias com glóbulos elétron-densos e gotas de óleo dispersas; os vacúolos apresentam tamanhos variáveis e contém inclusões lipídicas e material fibrilar (Fig.3H).

No tricoma tipo II, a célula da cabeça secretora apresenta cutícula delgada; secreção pode ser observada na superfície de alguns tricomas (Fig. 4A); a cutícula permanece aderida à parede celular, sem formação de espaço subcuticular (Fig. 4B); ao longo da circunferência da célula da cabeça, são observadas regiões mais delgadas que originam poros por onde a secreção é liberada (Fig. 4B); as paredes da célula da cabeça são delgadas com aspecto laxo, sendo impregnada por aglomerados de material elétron-densos (Fig. 4C); o citoplasma é reduzido a uma estreita faixa na periferia da célula devido a presença de um grande vacúolo central (Fig. 4B). A célula colar possui paredes espessas e protoplasto bastante reduzido (Fig. 4D). As células peduncular e basal (Fig.

4E-I) possuem organização semelhante; apresentam paredes celulares anticlinais espessas com aspecto lamelar, sendo que grânulos elétron-densos são observados em meio às microfibrilas de celulose (Fig. 4G); plasmodesmos estão presentes nas paredes periclinais (Fig. 4F); o núcleo é conspícuo com contorno irregular (Fig. 4H); no citoplasma, observam-se dictiossomos hiperativos, mitocôndrias com cristas dilatadas e glóbulos elétron-densos, retículo endoplasmático rugoso, polirribosomos (Fig. 4G-I); os plastídios são polimórficos, possuem tilacóides e acumulam grãos de amido de diferentes tamanhos, além de gotas lipídicas (Fig. 4H-I); imagens sugerem a divisão de plastídios (Fig. 4I); vesículas são observadas bem próximas à membrana plasmática (Fig. 4G); os vacúolos apresentam diferentes tamanhos e contêm material floculado e inclusões lipídico (Fig. 4I); gotas de óleo ocorrem dispersas no citoplasma e na proximidade de vacúolos (Fig. 4H, I).

No tricoma tipo III, a cutícula que reveste as células da cabeça é delgada, com aspecto irregular e apresenta poros (Fig. 5A); nesse tipo de tricoma, a cutícula se distende formando um espaço subcuticular preenchido por material fibrilar e inclusões osmiofílicas (Fig. 5B); as paredes das células da cabeça são delgadas e apresentam ramificações elétron-densas em sua porção mais interna; no espaço periplasmático observa-se material com aspecto semelhante àquele que preenche o espaço subcuticular (Fig. 5B); o citoplasma dessas células é abundante e elétron-denso e os vacúolos são pequenos (Fig. 5C-E); o núcleo é volumoso com contorno irregular (Fig. 5C); numerosas mitocôndrias contendo glóbulos elétron-densos, retículo endoplasmático rugoso, dictiossomos hiperativos e vesículas foram observados no citoplasma (Fig. 5C-E); os plastídios são volumosos, desprovidos de tilacóides e apresentam numerosas inclusões osmiofílicas com aspectos distintos, possivelmente lipídios e proteínas; gotas de óleo ocorrem dispersas no citoplasma (Fig. 5C, E); vesículas foram observadas em

íntima associação com a membrana plasmática; a imagem de corpos paramurais é bastante comum (Fig. 5D). A célula peduncular possui parede celular pecto-celulósica delgada (Fig. 5F) com plasmodesmos nas faces periclinais; o citoplasma é elétron-denso e abundante (Fig. 5F); os vacúolos são pequenos e apresentam conteúdo floculado ou fibrilar, além de lipídios (Fig. 5F, G); figuras de mielina ocorrem no interior de alguns vacúolos (Fig. 5G); mitocôndrias com glóbulos elétron-densos, ribossomos e gotas de óleo dispersas são observados no citoplasma (Fig. 5F, G); os plastídios são volumosos e contêm proeminentes inclusões osmiofílicas e corpos prolamelares (Fig. 5F, G). A célula da base apresenta parede celular pecto-celulósica espessa; o citoplasma é abundante e apresenta mitocôndrias, plastídios com grãos de amido com sinais de degradação, retículo endoplasmático rugoso e gotas de óleo; os vacúolos contêm lipídios e inclusões membranosas (Fig. 5H).

No tricoma tipo IV, a célula da cabeça secretora possui parede celular delgada (Fig. 6A); a cutícula permanece aderida à parede celular e não apresenta poros ou linhas de deiscência; o espaço periplasmático é amplo e preenchido por conteúdo fibrilar (Fig. 6B-C); corpos elétron-densos são observados no espaço periplasmático, imersos na matriz da parede e na cutícula (Fig. 6B-C); o citoplasma é abundante e apresenta mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso, poliribossomos, abundância de dictiossomos hiperativos, plastídios desprovidos de tilacóides e numerosas vesículas (Fig. 6B-D); os vacúolos são pequenos e contêm material fibrilar (Fig. 6B, D); inclusões osmiofílicas foram observadas dispersas no citoplasma e no interior de plastídios (Fig. 6B, D). A célula peduncular possui parede celular pecto-celulósica delgada, citoplasma reduzido e grandes vacúolos com conteúdo fibrilar e membranoso (Fig. 6E); no citoplasma são observadas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, plastídios contendo inclusões osmiofílicas e ribossomos (Fig. 6E). A célula basal possui paredes

pecto-celulósicas delgadas ricas em plasmodesmos (Fig. 6F); o núcleo é volumoso e apresenta contorno irregular (Fig. 6H); o citoplasma é reduzido devido à presença de grandes vacúolos contendo material fibrilar (Fig. 6F); mitocôndrias com glóbulos elétron-densos, retículo endoplasmático rugoso, dictiossomos, gotas de óleo livres, poliribossomos e plastídios com grãos de amido e pequenas inclusões lipídicas são observados no citoplasma (Fig. 6G).

No tricoma tipo VI, a célula apical possui parede pecto-celulósica e cutícula espessa podendo ser lisa em algumas tricomas (Fig. 7A) ou com ornamentações semelhantes a verrugas em outros (Fig. 7B). Em tricomas mais jovens, o citoplasma é abundante (Fig. 7C) e apresenta mitocôndrias, retículo endoplasmático, dictiossomos, plastídios com inclusões osmiofílicas, vesículas e gotas de óleo dispersas (Fig. 7D, E); o vacúolo é preenchido por lipídios (Fig. 7D). Em fases posteriores do desenvolvimento do tricoma, as paredes da célula apical se tornam mais espessas e lignificadas e o citoplasma se torna bastante reduzido (Fig. 7F). As células da base possuem paredes espessas (Fig. 7G) com aspecto lamelar (Fig. 7H); na cutícula são observadas ramificações elétron-densas (Fig. 7G); acúmulos de substâncias elétron-densas são observados na porção externa da parede e na cutícula (Fig. 7H); o citoplasma apresenta aspecto floculado e numerosas gotas de óleo volumosas (Fig. 7H).

A tabela 1 apresenta uma compilação dos dados sobre a distribuição, morfologia e ultraestrutura celular dos diferentes tipos de tricomas de *L. origanoides*.

DISCUSSÃO

Neste trabalho foi demonstrado que tricomas tectores e glandulares produtores de diferentes categorias de substâncias ocorrem no limbo foliar, brácteas, sépalas e pétalas de *L. origanoides*, estando ausentes nos verticilos férteis das flores. Tricomas

tectores e glandulares podem atuar na proteção da planta contra fatores bióticos e abióticos, tais como alta intensidade luminosa, temperatura elevada, ataque de herbívoros e infecção por patógenos, além de exercer papéis importantes na reprodução, atuando na atração de agentes polinizadores e dispersores (Werker 2000; Paiva & Martins 2011). Considerando-se que as flores de *L. origanoides* apresentam corola tubular, androceu e gineceu apresentam-se bem protegidos pelos verticilos externos e brácteas, o que pode explicar a ausência dessas estruturas nos órgãos férteis. Além disso, a ausência de tricomas nos órgãos férteis de *L. origanoides* pode estar relacionada à menor intensidade luminosa que atinge tais estruturas. Estudos demonstram que a radiação UV age na indução do desenvolvimento de tricomas (Milanez & Machado 2011), conferindo vantagens adaptativas a condições abióticas desfavoráveis (Gitz & Liu-Gitz 2003).

A combinação de diferentes técnicas de microscopia possibilitou a identificação de diferentes morfotipos de tricomas em *L. origanoides*, com base em seus aspectos morfológicos, histoquímicos e ultraestruturais. Foram identificados cinco morfotipos com características típicas de tricomas glandulares e um morfotipo com morfologia de tricoma tector e atividade secretora. A grande diversidade morfológica de tricomas observada em *L. origanoides* é comum para outras espécies de Verbenaceae (Inamdar 1969; Bonzani et al. 2003; Santos et al. 2004; Combrick et al. 2007; Argyropoulou et al. 2010; Martinez-Natarén et al. 2011).

Sabe-se que a morfologia dos tricomas glandulares pode apresentar significado taxonômico colaborando na identificação de espécies e gêneros de diferentes famílias (Falciani et al. 1995; Salmaki et al. 2009). O'Leary et al. (2012) sinonimizaram *L. origanoides* com 28 espécies pertencentes aos gêneros *Lippia* e *Lantana*. Uma das espécies sinonimizadas, *Lippia graveolens*, teve o indumento foliar estudado e descrito

como contendo dois tipos de tricomas glandulares, ambos com cabeça secretora unicelular esférica (Martínez-Natarén et al. 2011), sendo um deles bastante similar com o tipo V descrito no presente trabalho. Entretanto, nossos resultados demonstram a existência de um número bem maior de morfotipos de tricomas glandulares nas folhas de *L. origanoides*. Essa discrepância pode significar possíveis problemas taxonômicos.

Tricomas glandulares com aspectos morfológicos e histoquímicos semelhantes àqueles descritos para o tipo I no presente trabalho parecem ser bastante comuns para espécies de *Lippia*, (Santos et al. 2004; Combrinck et al. 2007; Argyropoulou et al. 2010). Nesse morfotipo glandular, a célula da cabeça secretora apresenta citoplasma reduzido e um grande vacúolo central, onde a secreção se acumula. Aspecto semelhante foi observado no tricoma tipo II. Segundo Argyropoulou et al. (2010), em tricomas glandulares com tais características, a cabeça secretora atua apenas para estocagem de substâncias produzidas pelas demais células do tricoma. De fato, a observação generalizada de plasmodesmos nas paredes das células desses morfotipos glandulares corrobora a hipótese de que as substâncias produzidas nas células basais e do pedúnculo podem ser transportadas para a célula da cabeça do tricoma via simplasto (Evert 2006). De forma, geral, para todos os morfotipos de tricomas encontrados no presente trabalho, a presença de numerosas mitocôndrias, dictiossomos, retículo endoplasmático rugoso, plastídios com inclusões lipídicas e gotas de óleo livres no citoplasma das células do pedúnculo e da base indica sua atuação na produção de substâncias de natureza diversa (Evert 2006; Fahn 1979). Em tricomas onde as células da cabeça apresentam a maquinaria necessária para o processo de síntese da secreção como os tipos III e IV, as células da base e do pedúnculo podem atuar no fornecimento de substâncias precursoras necessárias para a formação do exsudato. Segundo Argyropoulou et al. (2010), os produtos primários se movem das células da base para o pedúnculo e daí para a cabeça

do tricoma onde se dá a produção dos constituintes do óleo essencial e outras substâncias. A presença de plastídios com grãos de amido com diferentes tamanhos nas células basal ou peduncular dos tricomas II, III e IV sugere que a hidrólise do amido forneça recursos para a produção da secreção (Paiva & Machado 2008). Além disso, a presença de numerosas mitocôndrias com cristas dilatadas e glóbulos elétron-densos sugere a alta atividade metabólica dessas células (Sachetti et al. 1999).

A secreção acumulada no vacúolo da célula da cabeça dos tricomas I e II pode ser liberada para o apoplasto por diferentes processos, dependendo de sua natureza química; assim, o material lipídico observado no vacúolo e no citoplasma dessas células pode atravessar a membrana plasmática e a parede celular caracterizando processo écrino de secreção; por outro lado, a observação de vesículas próximas à membrana plasmática sugere processo granulócrino de secreção, comum na liberação de substâncias hidrofílicas (Fahn 1979; Evert 2006; Rodrigues & Machado 2012). Ainda, a observação de uma ruptura ao redor de toda a circunferência da célula da cabeça do tricoma tipo I de *L. origanoides* e a posterior destacamento da porção superior do tricoma sugerem a ocorrência de processo holócrino de secreção em estádios mais tardios do desenvolvimento do tricoma. Entretanto, esse processo ainda não foi inteiramente compreendido e merece maior atenção. A presença de uma linha frágil que permite o destacamento da porção superior do tricoma com conseqüente liberação da secreção foi relatada em outras espécies (Ascensão et al. 1995; Bruni & Modenesi 1983; Argyropoulou et al. 2010).

Nas células da cabeça secretora do morfotipo glandular III, a presença de dictiossomos, retículo endoplasmático rugoso e plastídios com inclusões osmiofílicas sugerem que essas células podem produzir polissacarídeos, proteínas e substâncias lipídicas; nas células da cabeça dos tricomas do tipo IV, chama atenção a abundância de

dictiossomos hiperativos sugerindo intensa produção de substâncias hidrofílicas (Fahn 1979; Ascensão & Pais 1998; Rodrigues et al. 2011; Rodrigues & Machado 2012). Nas células da cabeça dos tricomas III e IV, acúmulo de material fibrilar, tipicamente polissacarídeos (Ascensão & Pais 1998), e de glóbulos elétron-densos foi observado no amplo espaço periplasmático, indicando que a secreção liberada a partir do protoplasto por processo écrino ou granulócrino permanece acumulada entre a parede celular e a membrana plasmática (Fahn 1979; Ascensão & Pais 1998; Evert 2006).

A presença de uma linha de deiscência ou de poros na cutícula, como observado em eletromicrografias de varredura para os tricomas I e II e III, sugere que a liberação do exsudato para o meio externo ocorra através de aberturas na cutícula (Fahn 1979; Evert 2006; Argyropoulou et al. 2010). Entretanto, substâncias lipofílicas são capazes de atravessar a cutícula sem a necessidade de aberturas ou de estruturas especiais (Evert 2006). Ainda, a presença de canais de pectina (visualizados ao microscópio eletrônico de transmissão como ramificações elétron-densas) na cutícula das células secretoras dos tricomas I, II, III e IV pode facilitar a passagem da secreção, principalmente de sua porção hidrofílica (Ascensão & Pais 1998), em situações onde poros ou rupturas cuticulares não ocorrem ou ainda não foram formados.

O espessamento e a cutinização das paredes periclinais das células da base e do pedúnculo dos tricomas do tipo II de *L. origanoides* são aspectos que merecem atenção; as propriedades dessas paredes podem dificultar as trocas de substâncias com as células adjacentes, dificultando o fluxo de substâncias para o mesofilo e fornece suporte adicional à glândula colaborando na manutenção de sua estrutura (Ascensão et al. 1999; Combrinck et al. 2007; Argyropoulou et al. 2010). Autores sugerem que a cutinização das paredes laterais das células do pedúnculo pode representar uma fonte de cutina no processo de espessamento da cutícula (Bosabilidis & Tsekos 1982). Em *L. origanoides*,

a presença de corpos eletrôn-densos nas paredes celulares pode estar relacionada a este processo de cutinização.

Tricomas glandulares semelhantes estruturalmente aos descritos nesse trabalho como tipo III tem sido comumente descrito morfológicamente por outros autores para espécies de *Lippia* (Combrinck et al. 2007; Santos et al. 2004; Argyropoulou et al. 2010). Entretanto, nenhum dos trabalhos encontrados explora os aspectos ultraestruturais desse tipo glandular. Nas células do pedúnculo, a presença de plastídios com conspícuas inclusões elétron-densas é um aspecto diferencial para esse tipo de tricoma, podendo representar alcalóides (Wink 1987) e/ou proteínas (Evert 2006). Segundo Roshchina & Roshchina (1993), os plastídios são os principais sítios de síntese de alcalóides. Nas células pedunculares do tipo III chama atenção, também, a presença de corpos prolamelares nos plastídios; tais inclusões são comumente relatadas em plantas que vivem em condições de sombreamento (Gunning 2001; Evert 2006); a presença dessas estruturas em *L. organoides* pode ser explicada pelo sombreamento proporcionado pelos demais tipos de tricomas sobre o morfotipo III que se apresenta mais curto, principalmente em comparação com os tricomas do tipo VI.

O tricoma tipo VI de *L. organoides* apresenta características morfológicas externas típicas de tricoma tector com base multicelular e ápice cônico com extremidade afilada. Entretanto, nossos resultados mostraram a presença de diferentes categorias de metabólitos no interior de suas células, identificadas histoquimicamente como lipídios totais, terpenos e alcalóides. Assim, esse morfotipo de tricoma é ativo na produção de secreção, sugerindo que além de proteção física (Behnke 1984) eles atuem na defesa química dos indivíduos. Combrinck et al. (2007) descrevem um tipo semelhante de tricoma em *L. scaberrima* como estruturas de estocagem de metabólitos secundários, principalmente compostos glicosídicos e fenólicos. Entretanto, em *L. organoides* ficou

claro que os tricomas do tipo VI não atuam apenas na estocagem de metabólitos secundários, mas são ativos na produção dessas substâncias, uma vez que a maquinaria celular observada nesses tricomas corresponde àquela de células produtoras de substâncias lipofílicas (Evert 2006).

L. origanoides é conhecida principalmente pela produção de óleos essenciais com potencial aromático e medicinal (Pilau et al. 2011; Marco et al. 2012; Stashenko et al. 2013; Veras et al. 2013). De fato, terpenos foram histoquimicamente detectados nos tricomas I, II, IV, V e VI. Entretanto, nossos resultados mostraram que diferentes categorias químicas de substâncias podem ser produzidas pelos tricomas de *L. origanoides*, existindo correlação entre morfotipo glandular e secreção.

A distribuição diferencial dos morfotipos de tricomas nos órgãos aéreos de *L. origanoides* pode estar relacionada ao papel diferente de cada morfotipo de tricoma e das substâncias produzidas por ele em cada órgão (Ascensão et al. 1999). Assim, tricomas produtores de lipídios totais, substâncias fenólicas, proteínas, polissacarídeos e terpenos, como aqueles classificados no presente trabalho como tipos I (presentes em folhas, caules, flores e brácteas) e II (presentes em folhas e caule) podem exercer diferentes papéis ecológicos como proteção contra ataque de herbívoros e patógenos, proteção contra alta intensidade luminosa e atração de agentes polinizadores e dispersores, devido à presença de terpenos (Werker 1993; Ascensão et al. 1999; Langenheim 2003). Além disso, substâncias hidrofílicas, como os polissacarídeos, presentes nos tricomas I a V podem atuar na manutenção do potencial hídrico das células e na lubrificação dos primórdios foliares, facilitando a expansão foliar e protegendo os órgãos contra dissecação (Ascensão et al. 1999; Werker 2000; Machado et al. 2012), características importantes em ambientes com baixa umidade do ar como o cerrado (Machado et al. 2012). Os tricomas do tipo III que ocorrem em folhas, flores e

brácteas apresentam substâncias fenólicas em todas as células e são ricos em alcalóides; as substâncias fenólicas podem indicar importante papel na proteção contra radiação UV-B, resultante da exposição aos raios solares (Liakoura et al. 1997), enquanto que os alcalóides podem estar associados à defesa química, uma vez que são tóxicos para herbívoros (Levin 1973; Wagner 1991); substâncias fenólicas também parecem ser o material biologicamente ativo produzido pelos tricomas do tipo IV presentes em folhas, caules e brácteas. Da mesma forma, tricomas do tipo V, que ocorrem exclusivamente no caule de *L. origanoides* e apresentam substâncias fenólicas e terpenos, podem ser especializados na proteção contra fatores bióticos e abióticos (Liakoura et al. 1997; Werker 2000). No que se refere aos tricomas do tipo VI, sua função de proteção química é sugerida pela presença de terpenos e alcalóides.

Esse trabalho evidenciou a diversidade estrutural dos tricomas de *L. origanoides* e mostrou serem esses os sítios de síntese e acúmulo de substâncias de valor ecológico e medicinal, indicando a necessidade de novos estudos para o entendimento do papel de cada morfotipo de tricoma nas relações ecológicas dessa espécie e na produção das substâncias exploradas comercialmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar JS, MCCD Costa 2005 *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. Revista Brasileira de Plantas Medicinais 8:79-84.
- Alquini, Y, C Bona, MRT Boeger, CG Costa, CF Barra 2006 Epiderme. Páginas 87-96 in B Apezatto-da-Glória, SM Carmello-Guerreiro, eds. *Anatomia Vegetal*, Visçosa, UFV.

- Amaral L I V, MFDA Pereira, AL Cortelazzo 2001 Formação das substâncias de reserve durante o desenvolvimento de sementes de Urucum (*Bixa orellana* L.-Bixaceae). *Acta Botanica Brasilica* 15:125-132.
- Argyropoulou, C, A Akoumianakiloannidou, SN Christodoulakis, C Fasseas 2010 Leaf anatomy and histochemistry of *Lippia citriodora* (Verbenaceae). *Australian Journal of Botany* 58:398-409.
- Ascensão L, L Mota, MM Castro 1999 Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany* 84:437-447.
- Ascensão L, MS Pais 1998 The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. *Annals of Botany* 81:263-271.
- Ascensão L, NE Marques, MS Pais 1995 Glandular Trichomes on Vegetative and Reproductive Organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany* 75:619-626.
- Behnke HD 1984 Plant trichomes - structure and ultrastructure: general terminology, taxonomic applications, and aspects of trichome-bacteria interaction in leaf tips of Discorea. Páginas 95-112 in: E Rodriguez, PL Healey, I Metha 1984 *Biology and chemistry of plant trichomes*. New York: Plenum Press.
- Bosabalidis A, I Tsekos 1982 Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. I. Early stages of the gland cells differentiation. *Protoplasma* 112:55-62.
- Bozani NE, EM Filippa, GE Barboza 2003 Estudio anatómico comparativo de tallo em algumas espécies de Verbenaceae. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma Del México, Serie Botánica* 74:31-45.

- Brito MB, GB Barin, AAS Araújo, DP DE Sousa, SCH Cavalcanti, AAM Lira, RS Nunes, 2009 The action modes of *Lippia sidoides* (Cham) essential oil as penetration enhancers on snake skin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 97:323-327.
- Bruni A, P Modenesi P 1983 Development, oil storage and dehiscence of peltate trichomes in *Thymus Šulgaris* (Lamiaceae). *Nordic Journal of Botany* 3:245-251.
- Cavalcanti SCH, ES Niculau, AF Blank, CAG Câmara, IN Araújo, PB Alves 2010 Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychusurticae* Koch). *Bioresource Technology* 101:829-832.
- Combrinck S, GWD Plooy, RI McCrindle, BM Botha 2007 Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of Botany* 99:1111-1119.
- David R, JP Carde 1964 Coloration differentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du pine maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus de L'Academie des Sciences Paris, Série D.* 257 :1338-1340.
- Dozio E, M Ruscica, L Passafaro, G Dogliotti, L Steffani, A Pagani, G Dermatini, D Espoti, F Fraschini, P Magni 2010 The natural antioxidant alpha-lipoic acid induces p27Kip1-dependent cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology* 641:29-34.
- Evert RF 2006 *Esau's Plant Anatomy*. 3a. ed. Wiley-Interscience, new Jersey.
- Fahn A 1979 *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London
- Falciani L, LB Maleci, MM Lippi 1995 Morphology and distribution of trichomes in Italian species of the *Stachys germanica* group (Labiatae): a taxonomic evaluation. *Botanical Journal of the Linnean Society* 119:245-256.

- Fontenelle ROS, SM Morais, EHS Brito, MR Kerntopf, RSN Brilhante, RA Cordeiro, AR Tomé, MGR Queiroz, NRF Nascimento, JJC Sidrim, MEG Rocha 2007 Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham.. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 59:934-940.
- Funari CS, TG Passalacqua, D Rinaldo, A Napolitano, M Festa, A Capasso, S Piacente, C Pizza, MCM Young, G Durigan, DHS Silva 2011 Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. Ethanol extracts. Phytochemistry 72:2052-2061.
- Gerlach G 1969 Botanische Mikrotechnik, eine Einführung. Gorg Thieme: Stuttgart.
- Gerrits PO 1991 The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles. Department of Anatomy and Embryology State University Groningen, Netherlands.
- Gitz DC, L Liu-Gitz 2003 How do UV photomorphogenic responses confer water stress tolerance? Photochemistry and Photobiology 78:529-534.
- Gomes GA, CMO Monteiro, TOS Senra, V Zeringota, F Calmon, RS Matos, E Daemon, RWS Gois, GMP Santiago, MG Carvalho 2012 Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentornitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*(Acari: Ixodidae). Parasitology Research 111:2423-2430.
- Gunning BES 2001 Membrane geometry of “open” prolamellar bodies. Protoplasma 215:4-15.
- Inamdar JA 1969 Epidermical structure and ontogeny of stomata in some Verbenaceae. Annals of Botany 33:55-66.
- Johansen DA 1940 Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.

- Judd WS, CS Campbell, EA Kellogg, PF Stevens, MJ Donoghue 2009 Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3 ed. Artmed, Porto Alegre.
- Kolb D, M Müller 2004 Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* and histochemistry of glandular secretory products. *Annals of Botany* 94:515–526.
- Langenheim JH 2003 Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany. Timber Press, Portland, Cambridge.
- Levin DA 1973 The role of trichomes in plant defense. *The quarterly review of biology* 48:3-15.
- Liakoura V, M Stepfanou, Y Manetas, C Cholevas, G Karabourniotis 1997 Trichome density and its UV-B protective potential are affected by shading and leaf position on the canopy. *Environmental and. Experimental Botany* 38:223-229.
- Machado SR, DP Barreiro, JF Rocha, TM Rodrigues 2012 Dendroid colleters on vegetative and reproductive ápices in *Alibertia sessilis* (Rubiaceae) differ in ultrastructure and secretion. *Flora* 207: 868-877.
- Machado SR, TM Rodrigues 2004 Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 27: 135-147.
- Marco CA, E Teixeira, A Simplício, C Oliveira, J Costa, J Feitosa 2012 Chemical composition and allelopathic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72(1): 157-160.
- Martínez-Natarén DA, V Parra-Tabla, G Dzib, LM Calvo-Irbién 2011 Morphology and density of glandular trichomes in populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H. B. K., Verbernaceae), and the relationship between trichome density and climate. *Journal of the Torrey Botanical Society* 138(2): 134-144.

- Mazia D, PA Brewer, M Alfert 1953 The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *The Biological Bulletin* 104: 57-67.
- Milanez CRD, SR Machado 2011 SEM studies on the leaf indumentum of six Melastomataceae species from Brazilian *Cerrado*. *Rodriguésia* 62(1): 203-212.
- O'Brien TP, N Feder, ME Mccully 1964 Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59(2): 368-373.
- O'Leary N, SS Denham, F Salimena, ME Múlgura 2012 Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbanaceae) using the phylogenetic species concept. *Botanical Journal of Linnean Society* 170: 197-219.
- Paiva EAS, SR Machado 2008 The floral nectary of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae, Caesalpinioideae): Strctural aspects during floral development. *Annals of Botany* 101(1): 125-133.
- Paiva EAS, LC Martins 2011 Calycinal trichomes in *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae): ontogenesis, structure and functional aspects. *Australian Journal of Botany* 59(1): 91-98.
- Pascual ME, K Slowing, E Carretero, DM Mata, A Villar 2001 *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 6: 201-214.
- Pilau MR, SH Alves, R Weiblen, S Arenhart, AP Cueto, LT Lovato 2011 Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 1616-1624.
- Reynolds ES 1963 The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208-212.

- Rivero-Cruz I, G Duarte, A Navarrete, R Bye, E Linares, R Mata 2011 Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. *Journal of Food Science* 76(2): 309-317.
- Robards AW 1978 An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. in: *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. J. L. Hall. (eds.). New York, Elsevier.
- Rocha-Guzmán NE, JA Gallegos-Infante, RF González-Laredo, M Ramos-Gómez, ME Rodríguez-Muñoz, R Reynoso-Camacho, A Rocha-Uribe, MR Roque-Rosales 2007 Antioxidant effect of orégano (*Lippia berlandieri* v. Shauer) essential oil and mother liquors. *Food Chemistry* 102: 330-335.
- Rodrigues TM, SR Machado 2012 Oil glands in *Pterodon pubescens* Benth. (Leguminosae-Papilionoideae): distribution, structure and secretion mechanisms. *International Journal of Plant Sciences* 173: 984-992.
- Rodrigues TM, SP Teixeira, SR Machado 2011 The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae-Caesalpinioideae). *Flora* 206: 585-594.
- Rodrigues FFG, HDM Coutinho, AR Campos, SG Lima, JGM Costa 2011 Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Lippia microphylla* Cham. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 33(2): 141-144.
- Sachetti G, C Romagnoli, M Nicoletti, A Di Fabio, A Bruni, F Poli 1999 Glandular trichomes of *Calceolaria adscendens* Lidl. (Scrophulariaceae): histochemistry, development and ultrastructure. *Annals of Botany* 83: 87-92.
- Salmaki Y, S Zarre, Z Jamzad, C Bräuchler 2009 Trichome micromorphology of Iranian *Stachys* (Lamiaceae) with emphasis on its systematic implication. *Flora* 204: 371-381.

- Santos MRA, R Innecco, MA Soares 2004 Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. Revista Ciência Agronômica 35: 377-383.
- Souza VC, H Lorenzi 2008 Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2ª Ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Stashenko EE, JR Martínez, MP Cala, DC Durán, D Caballero 2013 Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. Journal of Separation Science 36: 192-202.
- Stashenko EE, JR Martínéz, CA Ruíz, G Arias, C Durán, W Salgar, M Cala 2010 *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. Journal of Separation Science 33: 93-103.
- Veras HNH, MKA Araruna, JGM Costa, HDM Coutinho, MR Kerntopf, MA Botelho, IRA Menezes 2013 Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible mechanism of action. Phytotherapy research 27: 179-185.
- Viljoen AM, S Subramoney, SF Van Vuuren, KHC Baser, B Dermirci 2005 The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. Journal of Ethnopharmacology 96: 271-277.
- Taboga SR, PSL Vilamaior 2001 Citoquímica. in Carvalho HF, SM Recco-Pimentel eds, A célula. Manole LTDA: Barueri.
- Wagner GJ 1991 Secreting glandular trichomes: more than just hairs. Plant Physiologist 96: 675-679.
- Watson ML 1958 Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. Journal of Biophysics and Biochemistry Cytology 4: 475.

- Werker E 1993 Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae – A Review. *Flavour and Fragrance Journal* 8: 249-255.
- Werker E 2000 Trichome Diversity and Development. *Advances in Botanical Research* 31.
- Wink M 1987 Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids in *Cell, Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol 4. Academic Press, Inc.
- Yoder LR, PG Mahlberg 1976 Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany* 63: 1167-1173.

Tabela 1. Distribuição, morfologia, aspectos ultraestruturais e forma de liberação da secreção dos tricomas de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae).

Tipo	Distribuição	Morfologia	Ultraestrutura	Forma de Liberação da secreção
I	Primórdio foliar, folha expandida, caule, bráctea, cálice e corola	Glandular. Base unicelular, colar e cabeça secretora unicelular ovalada.	Cabeça: cutícula com linha de ruptura; pequena faixa de citoplasma com vesículas, gotas de óleo e grande vacúolo central. Pedúnculo: estreito com poucas organelas; plasmodesmos. Base: Pequenos vacúolos, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e dictiossomos; plasmodesmos nas paredes anticlinais e periclinais.	Holócrina; Écrina; granulócrina
II	Primórdio foliar, folha expandida e caule	Glandular. Base e pedúnculo unicelulares, colar e cabeça secretora unicelular ovalada.	Cabeça: cutícula com poro; faixa citoplasmática periférica com gotas de óleo e grande vacúolo central. Base e pedúnculo: paredes anticlinais espessas e cutinizadas, plasmodesmos nas paredes periclinais; plastídios com tilacóides e amido, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, dictiossomos, vacúolos e vesículas. Colar: estreito e com poucas organelas.	Écrina; granulócrina
III	Primórdio foliar, folha expandida, bráctea e corola	Glandular. Base e pedúnculo unicelulares e cabeça secretora 4-celular esférica.	Cabeça: cutícula com poro; espaço subcuticular e periplasmático; retículo endoplasmático rugoso, dictiossomos, plastídios. Pedúnculo: mitocôndrias, plastídios com corpo prolamelar, figura de mielina em vacúolos. Base: gotas de óleo livre no citoplasma e mitocôndrias com cristas dilatadas.	Écrina; granulócrina
IV	Primórdio foliar, folha expandida, caule e bráctea	Glandular. Base e pedúnculo unicelulares e cabeça secretora 4-celular em forma de ampola.	Cabeça: espaço periplasmático; dictiossomos, plastídios, retículo endoplasmático rugoso e vacúolos. Base e pedúnculo: plastídios com amido, mitocôndrias, vacúolos e gotas de óleo.	Écrina; granulócrina
V	Caule	Glandular. Base unicelular proeminente, pedúnculo bicelular e cabeça secretora unicelular esférica.	-	-
VI	Primórdio foliar, folha expandida, caule, bráctea, cálice e corola	Tector. Unisseriado com 4-10 células formando ao redor da base unicelular e ápice cônico unicelular.	Ápice: mitocôndrias, gotas de óleo em abundância e vesículas. Base: acúmulo de secreção na parede, plasmodesmos na parede periclinal externa.	Écrina

Tabela 2. Histoquímica dos tricomas de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae).

Substâncias	Tipos de tricomas glandular																
	I			II				III			IV			V			VI
	cb	cp	cg	cb	cp	cc	cg	cb	cp	cg	cb	cp	cg	cb	cp	cg	ca
Lipídios totais	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Compostos fenólicos	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Proteínas	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Polissacarídeos neutros	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Terpenos	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Alcalóides	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Amido	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

cb: célula basal; cp: célula peduncular; cc: célula colar; cg: cabeça glândula; ca: célula apical; +: positivo; -: negativo.

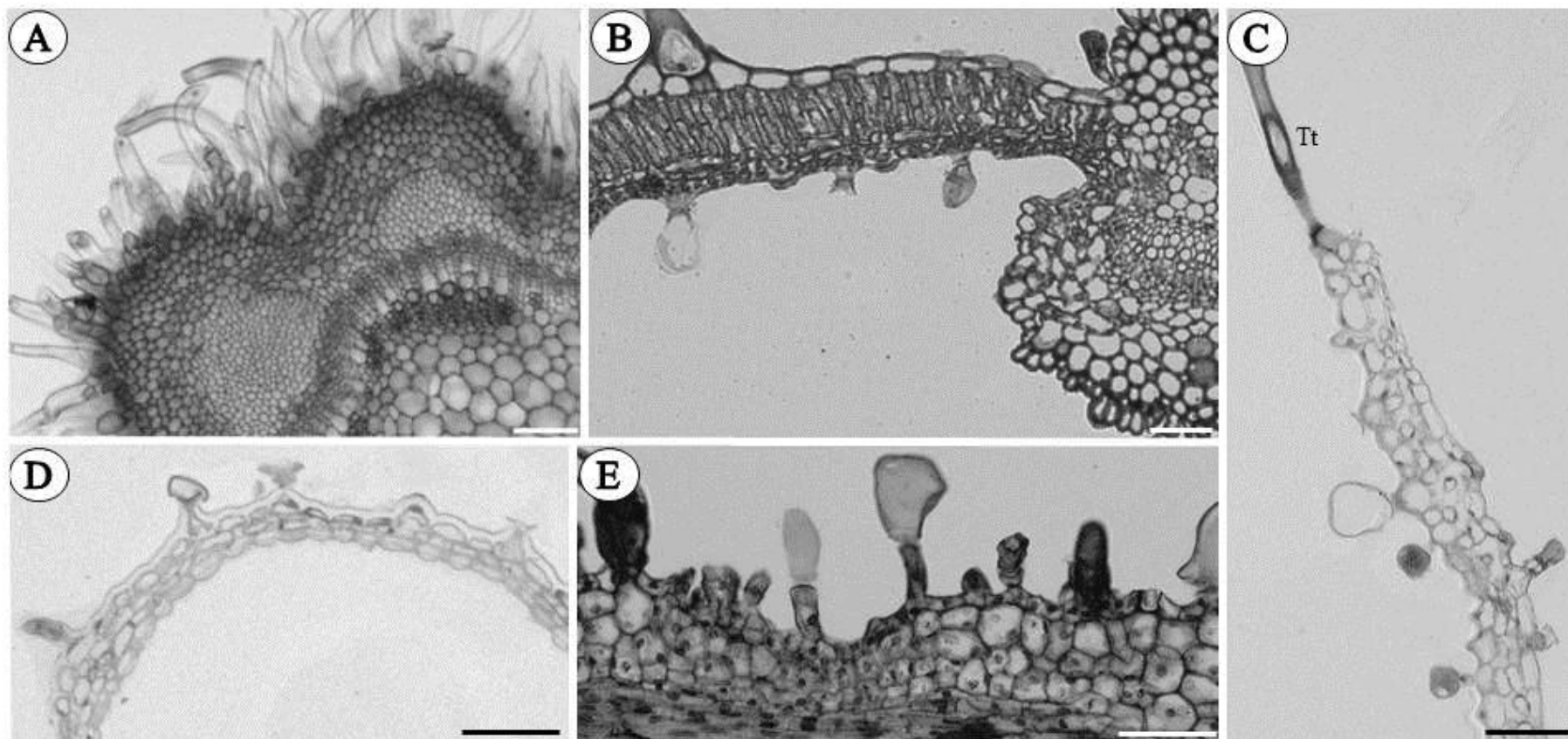


Figura 1

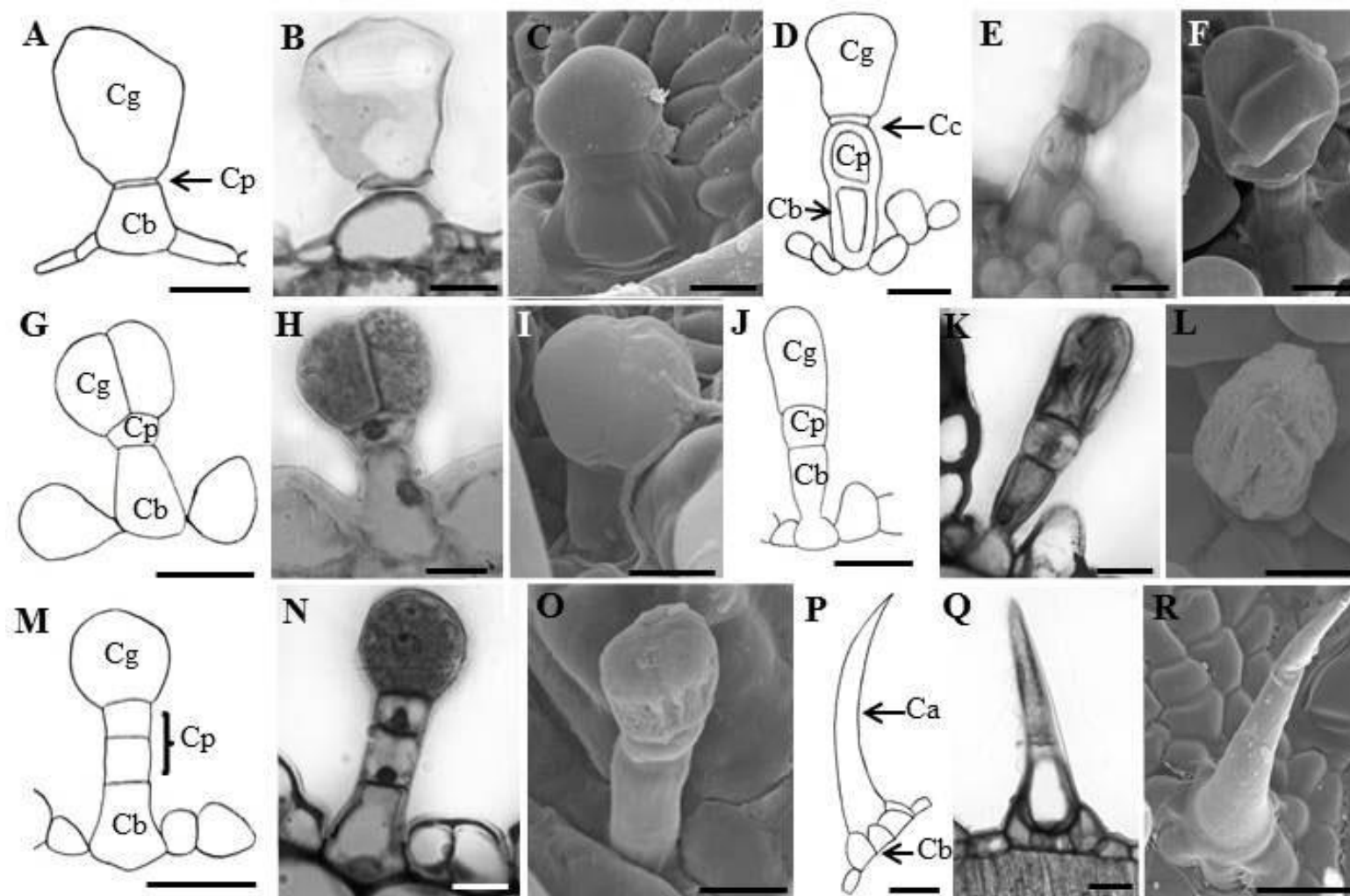


Figura 2

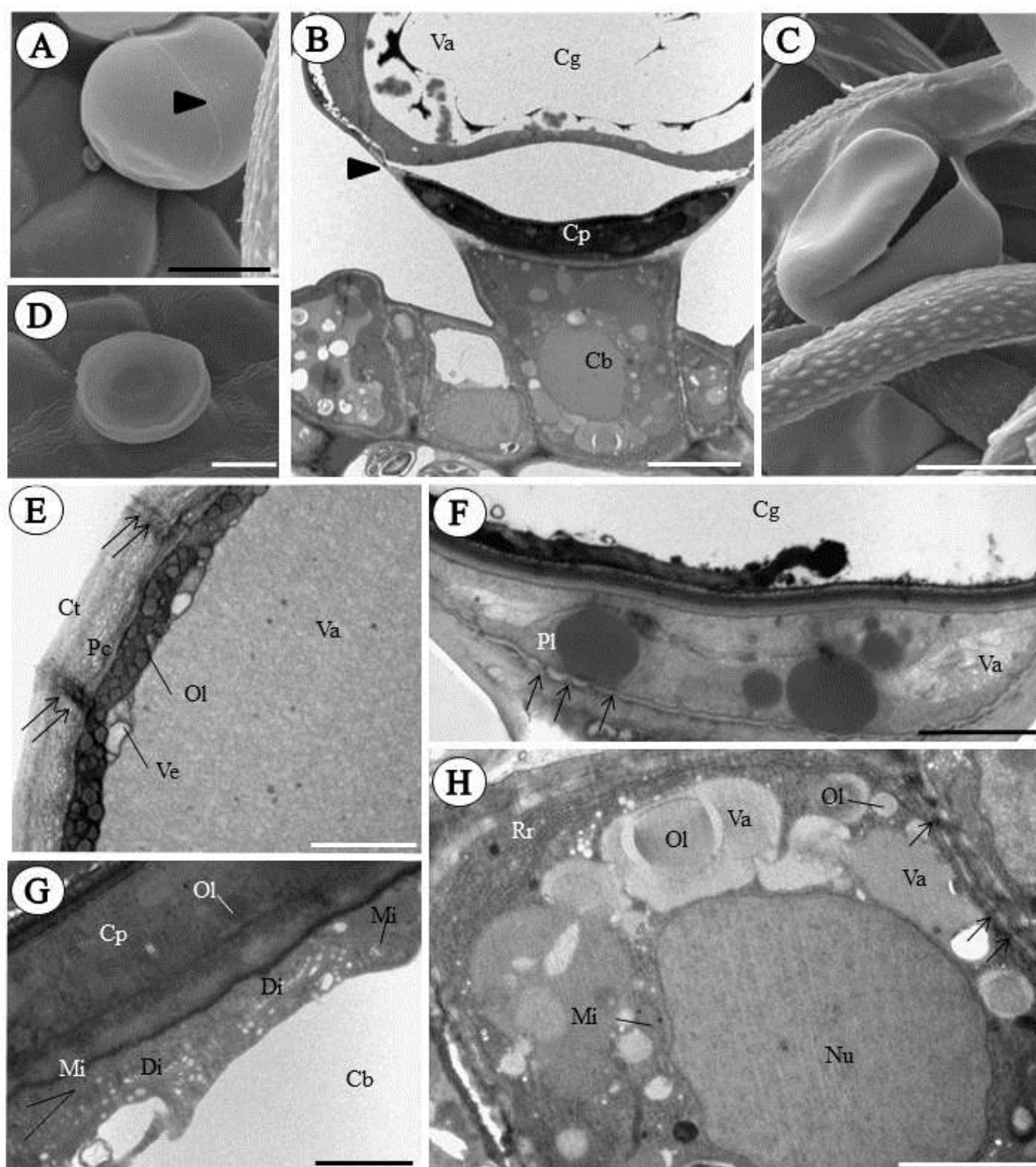


Figura 3

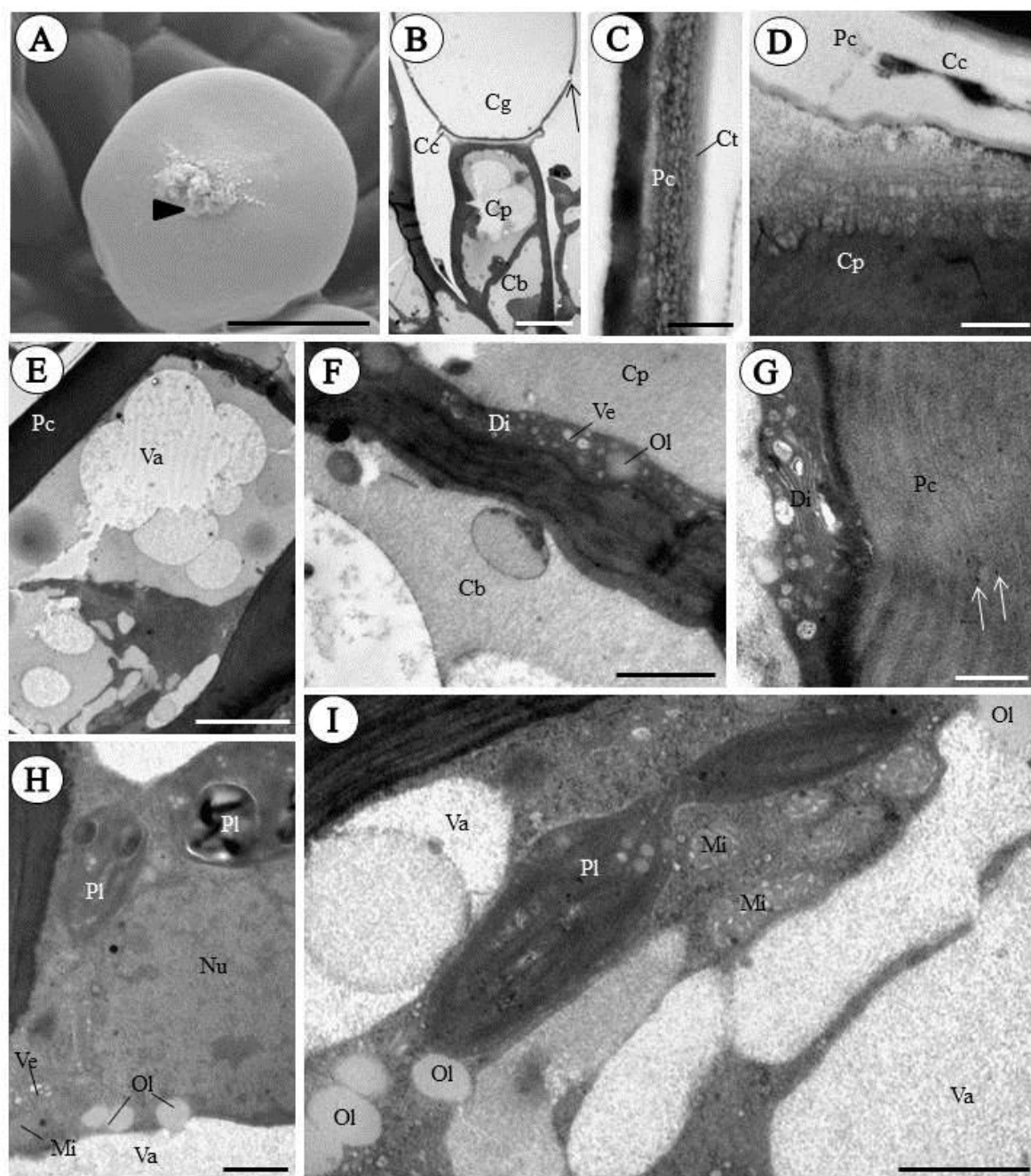


Figura 4

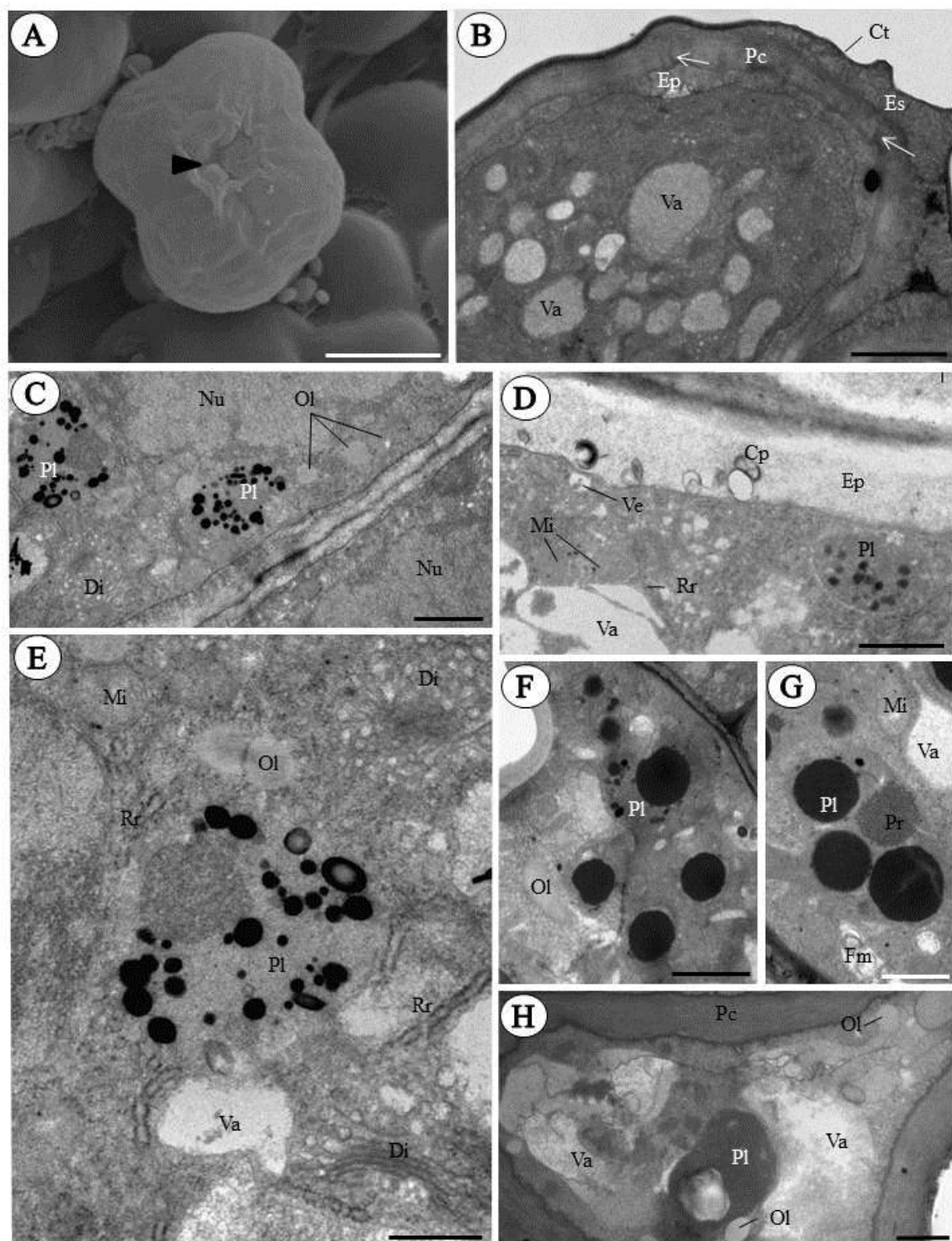


Figure 5

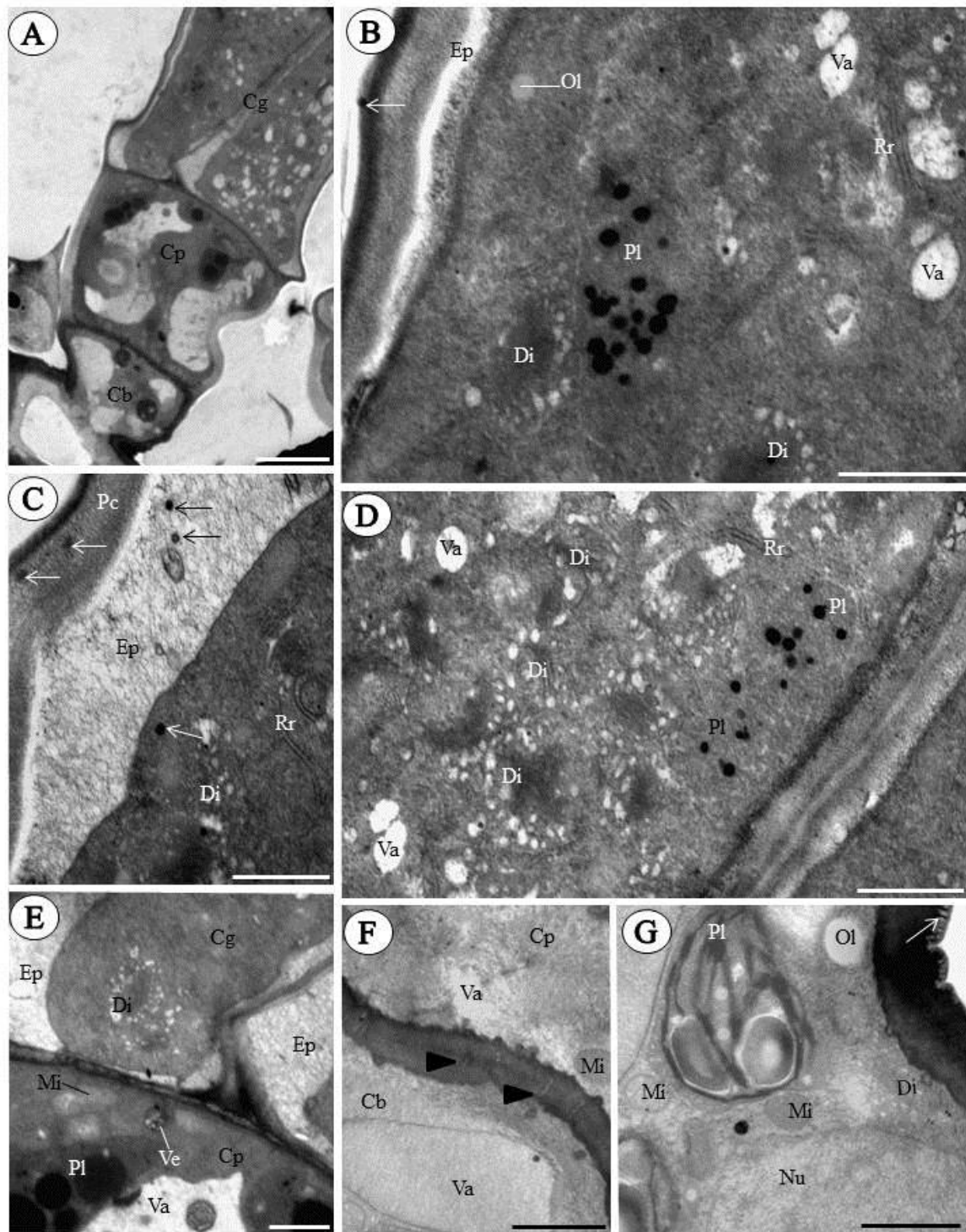


Figura 6

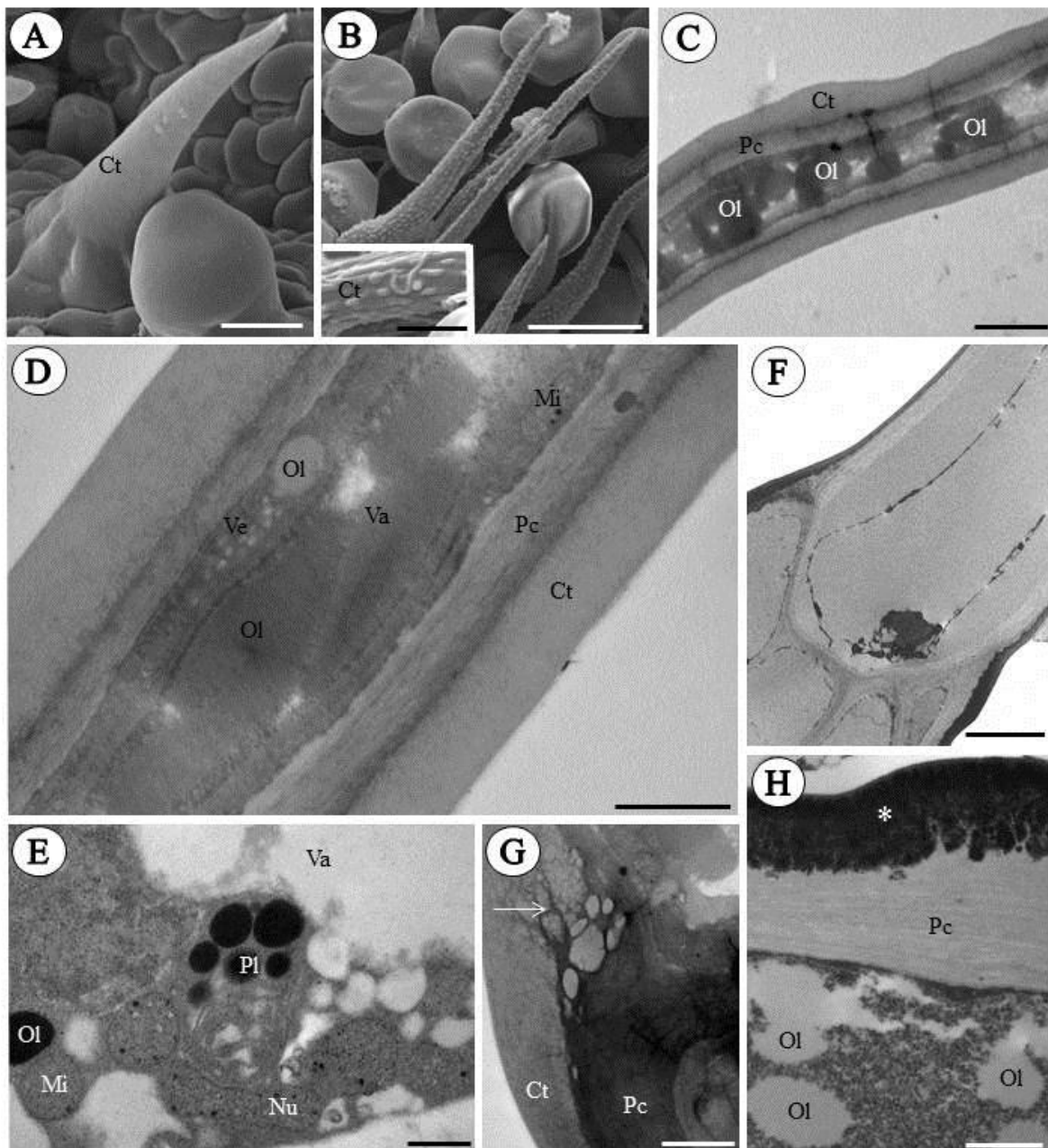


Figura 7

Figura 1. Distribuição dos tricomas tectores e glandulares em *Lippia origanoides*. A. Caule. B. Limbo foliar. C. Bráctea. D. Sépala. E. Primórdio foliar. Tt. Tricoma tector; Tg: tricoma glandular. Barras: A = 80 μm , B, C, D = 50 μm ; E = 40 μm .

Figura 2. Representação esquemática, fotomicrografias e eletronicmicrografias (MEV) dos tricomas de *Lippia origanoides*. A-C. Tricoma tipo I. D-F. Tricoma tipo II. G-I. Tricoma tipo III. J-L. Tricoma tipo IV. M-O. Tricoma tipo V. P-R. Tricoma tipo VI. Cg: cabeça glandular, Cc: célula colar, Cp: célula peduncular, Cb: célula basal, Ca: célula apical. Barras: A = 30 μm ; B, I, L = 15 μm ; C, D, E, J, Q, R = 25 μm ; H, K = 10 μm ; F, G = 20 μm ; P = 50 μm .

Figura 3. Eletronicmicrografias (MEV e MET) do tricoma tipo I de *Lippia origanoides*. A, C, D: MEV; B, E-H: MET. A. Visão superficial da cabeça. A seta indica a linha de abertura da cutícula. B. Aspecto geral mostrando célula basal, peduncular e cabeça glandular. A ponta de seta indica região delgada na célula da cabeça. C. Abertura da cabeça glandular por uma linha de deiscência. D. Tricoma glandular após a liberação da porção superior da cabeça secretora. E. Detalhe de célula da cabeça glandular mostrando parede delgada com aspecto laxo e ramificações elétron-densas (setas duplas), citoplasma reduzido e vacúolo volumoso. F. Célula peduncular com citoplasma abundante rico e vacúolos pequenos. Observar a presença de inclusões osmiofílicas nos plastídios e de plasmodesmos na parede periclinal interna (setas). G. Detalhe mostrando célula colar com citoplasma gotas de óleo no elétron-denso e célula basal com vacúolo volumoso e citoplasma rico em dictiossomas, mitocôndrias e vesículas. H. Célula basal com núcleo volumoso, citoplasma abundante e vacúolos. Observar mitocôndrias, gotas de óleo, extensivo retículo endoplasmático rugoso. As setas apontam plasmodesmos nas

paredes anticlinais. Cb: célula basal, Cp: célula peduncular, Cg: célula da cabeça glandular, Ct: cutícula, Pc: parede celular, Va: vacúolo, Di: dictiossomo, Mi: mitocôndria, Nu: núcleo, Ol: óleo, Pl: plastídio, Rr: retículo endoplasmático rugoso, Ve: vesícula. Barras: A, C = 25 μm ; B = 5 μm ; D = 10 μm ; E, G = 1 μm ; F, H = 2 μm .

Figura 4. Eletronmicrografias (MEV e MET) do tricoma tipo II de *Lippia origanoides*.

A: MEV; B-I: MET. A. Superfície do tricoma mostrando secreção (ponta de seta) liberada pela célula da cabeça. B. Aspecto geral mostrando célula basal, pedúnculo, colar e célula da cabeça. A ponta de seta indica região delgada na superfície da célula. C. Detalhe mostrando parede da célula da cabeça glandular com aspecto laxo. D. Detalhe mostrando célula colar com parede celular espessa e protoplasto reduzido e parte de célula peduncular com ramificações elétron-densas na parede. E. Célula peduncular com paredes anticlinais espessas, citoplasma reduzido e grandes vacúolos. F. Detalhe mostrando porção da célula basal e da célula peduncular. A seta indica vesícula próxima à membrana plasmática. G. Detalhe da célula peduncular mostrando parede espessa com aspecto lamelar e inclusões elétron-densas (setas). H. Célula basal com núcleo volumoso, mitocôndrias, gotas de óleo dispersas, vesículas e plastídios contendo grãos de amido e inclusões lipídicas. I. Célula basal mostrando citoplasma com ribossomos, mitocôndrias com cristas dilatadas, plastídio em divisão, gotas de óleo dispersas e vacúolos com conteúdo floculado. Cb: célula basal; Cc: célula colar, Cp: célula do pedúnculo, Cg: célula da cabeça glandular, Ct: cutícula, Di: dictiossomo, Mi: mitocôndria, Nu: núcleo, Ol: óleo, Pc: parede celular, Pl: plastídio, Va: vacúolo, Ve : vesícula. Barras: A = 25 μm ; B = 10 μm ; C-G = 0,5 μm ; E = 5 μm ; F, H, I = 1 μm .

Figura 5. Eletronmicrografias (MEV e MET) do tricoma tipo III de *Lippia origanoides*.

A: MEV. B-H: MET. A. Aspecto geral do tricoma tipo III mostrando cutícula irregular e poro (ponta de seta) na superfície. B. Célula da cabeça glandular mostrando parede celular com ramificações elétron-densas (setas), citoplasma abundante rico em organelas e vacúolos pequenos. Observar acúmulo de secreção no espaço periplasmático e no espaço subcuticular. C. Detalhe de células da cabeça glandular mostrando núcleo com contorno irregular, plastídios com inclusões osmiofílicas, dictiossomos e gotas de óleo livres no citoplasma. D. Pormenor de célula da cabeça glandular mostrando plastídios com inclusões osmiofílicas, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e vacúolos. Observar vesículas próximas à membrana plasmática, e conteúdo fibrilar e corpos paramurais no espaço periplasmático. E. Citoplasma de célula da cabeça glandular com retículo endoplasmático rugoso, plastídios com inclusões lipídicas e proteínas, dictiossomos hiperativos, mitocôndrias e gotas de óleo dispersas. F. Célula peduncular com gotas de óleo dispersas, pequenos vacúolos e plastídios com inclusões osmiofílicas conspícuas. G. Detalhe de célula peduncular mostrando plastídios com inclusões osmiofílicas conspícuas e corpo prolamelar. Observar figura de mielina no interior de vacúolo. H. Célula basal mostrando citoplasma com gotas de óleo, plastídios contendo amido e vacúolos. Cp: corpos paramurais, Ct: cutícula, Ep: espaço periplasmático, Es: espaço subcuticular, Fm: figura de mielina, Mi: mitocôndrias, Nu: núcleo, Ol: óleo, Pl: plastídio, Pc: parede celular; Pr: corpo prolamelar, Rr = retículo endoplasmático rugoso, Va: vacúolo. Barras: A = 10 μm ; B = 2 μm ; C, D, F, G, H = 1 μm ; E = 0,5 μm .

Figura 6. Eletronmicrografia (MET) do tricoma tipo IV de *Lippia origanoides*. A. Aspecto geral mostrando célula basal, células do pedúnculo e células da cabeça

glandular. B. Detalhe de célula da cabeça glandular mostrando inclusão elétron-densa na cutícula (seta), amplo espaço periplasmático e citoplasma com plastídios contendo inclusões osmiofílicas, dictiossomos, retículo endoplasmático rugoso, gotas de óleo dispersas, vesículas e pequenos vacúolos. C. Porção de célula da cabeça glandular com inclusões elétron-densas no citoplasma, no espaço periplasmático e na parede celular (setas). Observar amplo espaço periplasmático preenchido com conteúdo fibrilar. D. Célula da cabeça glandular com grande quantidade de dictiossomos hiperativos, retículo endoplasmático rugoso, plastídio com inclusões osmiofílicas e pequenos vacúolos. E. Células da cabeça e célula do pedúnculo. Observar no pedúnculo vacúolo, plastídio com inclusões osmiofílicas, mitocôndrias e vesículas. Na cabeça glandular observar amplo espaço periplasmático preenchido com conteúdo fibrilar. F. Plasmodesmos (ponta de seta) conectando célula da base e do pedúnculo. Observar vacúolo com conteúdo fibrilar na célula da base. G. Célula basal com parede com ramificações elétron-densas (seta) na sua porção externa, núcleo volumoso, dictiossomos, mitocôndrias, gotas de óleo dispersas e plastídios com grãos de amido e inclusões lipídicas. Cb: célula da base, Cg: células da cabeça glandular, Cp: célula do pedúnculo, Di: dictiossomo, Ep: espaço periplasmático, Mi: mitocôndria, Nu: núcleo, Ol: gota de óleo, Pc: parede celular, Pl: plastídio, Rr: retículo endoplasmático rugoso, Va: vacúolo. Barras: A = 5 μm ; B-G = 1 μm .

Figura 7. Eletronmicrografias do tricoma tipo VI de *Lippia origanoides*. A, B: MEV; C-H: MET. A Tricoma com base multicelular e célula apical afilada com superfície cuticular lisa. B. Tricoma com superfície cuticular com ornamentações. C Célula apical mostrando parede celular, cutícula espessa e citoplasma repleto de gotas de óleo. D. Detalhe da figura anterior mostrando cutícula espessa, parede celular e citoplasma com

gotas de óleo, vesículas, mitocôndrias e vacúolo repleto de óleo. E. Detalhe mostrando porção citoplasmática de célula apical com núcleo, mitocôndrias, plastídios com inclusões osmiofílicas e vacúolo. F. Tricoma em estágio posterior do desenvolvimento mostrando redução do protoplasto. G. Detalhe de célula basal com ramificações elétron-densas (setas) na parede e cutícula. H. Célula basal mostrando parede celular com estrutura lamelar e acúmulo de substâncias elétron-densas (*) na porção externa. Observar citoplasma floculado e gotas de óleo volumosas. Ct: cutícula; Pc: parede celular; Mi: mitocôndria, Nu: núcleo Ol: gota de óleo, P: plastídio; Va: vacúolo, Ve: vesícula. Barras: A = 25 μm ; B = 50 μm detalhe = 20 μm ; C, F = 5 μm ; D, G, H = 1 μm ; E = 50 nm.

Densidade glandular e perfil químico do óleo essencial em folhas e inflorescências de *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) em duas fisionomias de Cerrado

Luiz Ricardo dos Santos Tozin¹, Marcia Ortiz Mayo Marques² & Tatiane Maria Rodrigues¹

1.Universidade Estadual Paulista, UNESP, Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Botânica, Botucatu-SP, Brasil.

2.Instituto Agrônomo de Campinas, IAC, Laboratório de Produtos Naturais, Campinas-SP, Brasil.

Densidade glandular e óleo essencial em *L. origanoides* (Tozin et al.)

RESUMO

Introdução: A presença de tricomas glandulares em órgãos aéreos vegetativos e reprodutivos é um aspecto comum a Verbenaceae, onde estão incluídas numerosas espécies aromáticas e medicinais. Entretanto, fatores ambientais bióticos e abióticos podem influenciar na densidade de estruturas secretoras formadas, além da quantidade e da composição química da secreção produzida. *Lippia origanoides*, espécie nativa do Cerrado, pode ser encontrada em diferentes fisionomias desta vegetação. O óleo extraído de suas folhas apresenta potencial medicinal e vêm sendo testado no tratamento de diversas doenças, dentre elas, melanoma. O objetivo deste trabalho foi investigar a densidade de tricomas glandulares e o rendimento e composição química do óleo essencial em 1) folhas e inflorescências de *L. origanoides* do campo cerrado; e em 2) folhas de indivíduos vegetando no campo cerrado e no cerrado *stricto sensu*.

Metodologia: Amostras de folhas e inflorescências foram processadas segundo técnicas convencionais em microscopia eletrônica de varredura. O óleo essencial de folhas e inflorescências foi obtido por hidrodestilação e identificado com auxílio de CG-EM e CG-DIC. **Resultados:** Brácteas e sépalas apresentaram maior densidade glandular, seguidas por pétalas e limbo foliar. A densidade glandular na face abaxial do limbo

foliar foi maior em indivíduos do campo cerrado. O rendimento de óleo essencial nas inflorescências foi maior que nas folhas. A composição química do óleo essencial variou entre os indivíduos das diferentes áreas e entre indivíduos da mesma população, sendo que em cada área foram encontrados três diferentes grupos químicos. **Conclusão:** Nossos resultados evidenciaram a plasticidade química apresentada pelos indivíduos de *L. origanoides* e a influência do ambiente na densidade glandular das folhas.

Palavras-chave: campo cerrado, cerrado *stricto sensu*, óleo, tricomas glandulares

INTRODUÇÃO

Tricomas glandulares são apêndices epidérmicos presentes em órgãos vegetativos e reprodutivos de diversas espécies vegetais, capazes de produzir, acumular e liberar substâncias bioativas com diversas composições químicas (Werker 1993; Ascensão et al. 1999). Dentre essas substâncias, os terpenos voláteis são bastante comuns, sendo os principais constituintes dos óleos essenciais responsáveis pelo aroma e/ou propriedade medicinal de diversas plantas (Langenheim 2003).

O rendimento do óleo essencial em certas espécies vegetais está associado ao número de tricomas glandulares encontrados em determinado órgão (Yamaura et al. 1989; Gomes et al. 2009). Estudos apontam que ambos os aspectos, rendimento do óleo essencial e densidade de tricomas glandulares, podem sofrer influência de diversos fatores ambientais bióticos e abióticos, como herbivoria, temperatura, luminosidade, disponibilidade hídrica, altitude, ciclo circadiano e sazonalidade, dentre outros (Gianfagna et al. 1992; Werker 2000; Pérez-Estrada et al. 2000; Juliani Jr et al. 2002; Viljoen et al. 2005; Gobbo-Neto & Lopes 2007; Argyropoulou et al. 2007; Gonzáles et al. 2008; Martinez-Natarén et al. 2011). Pesquisas demonstram ainda que, além da densidade glandular e da quantidade da secreção produzida, fatores exógenos podem

influenciar na composição química da secreção produzida por determinada espécie (Juliani Jr et al. 2002; Viljoen et al. 2005; Mesa-Arango et al. 2010) e que diferentes órgãos de uma mesma planta podem produzir exudatos com diferentes composições químicas (Bassole et al. 2005; Fornari et al. 2012).

Espécies de Verbenaceae são conhecidas pela presença dos tricomas glandulares produtores de óleos essenciais, sendo muitas delas amplamente utilizadas pela indústria de fármacos e na medicina popular (Pascual et al. 2001; Judd et al. 2009; Souza & Lorenzi 2008). *Lippia origanoides* Kunth, espécie nativa do Cerrado, possui ampla distribuição, ocorrendo da Guiana até o norte da Argentina na América do Sul e na América Central (O’Leary et al. 2012), ocupando diferentes fisionomias no Cerrado brasileiro. O óleo essencial extraído das folhas de *L. origanoides* apresenta atividades antimicrobiana, antiviral, acaricida, antioxidante, antibacteriana e antiinflamatória (Oliveira et al. 2007; Rocha-Gusmán et al. 2007; Cavalcanti et al. 2010; Stashenko et al. 2010; Gomes et al. 2012; Stashenko et al. 2013; Veras et al. 2013). Diferentes quimiotipos são relatados em grande parte dos trabalhos com esta espécie, sendo o p-cimeno, timol e carvacrol os compostos majoritários mais comumente relatados (Oliveira et al. 2007; Cavalcante et al. 2010; Stashenko et al. 2010; Stashenko et al. 2013).

O objetivo deste trabalho foi investigar a densidade de tricomas glandulares e o rendimento e composição química do óleo essencial em 1) folhas e inflorescências de *L. origanoides* do campo cerrado; e em 2) folhas expandidas de indivíduos vegetando no campo cerrado e no cerrado *stricto sensu*.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de coleta

Este estudo foi conduzido envolvendo duas populações naturais de *Lippia origanoides* ocorrentes em diferentes fisionomias de cerrado localizadas na região centro-oeste do estado de São Paulo, Brasil. Na reserva particular de cerrado da Fazenda Palmeira da Serra (S 22°49'11,39" e O 48°44'51,18"), localizada no município de Pratânia, estado de São Paulo, foram demarcados 12 indivíduos adultos vegetando em área de cerrado *stricto sensu* (Fig. 1 A). Na segunda população estudada, uma área de campo cerrado localizada no distrito de Rubião Júnior, município de Botucatu, SP (S 22°53'29,82" e O 48°29'25,81") (Fig. 1 B), foram demarcados outros 12 indivíduos adultos.

O cerrado *stricto sensu* é caracterizado pela presença de árvores médias, arbustos esparsos e algumas herbáceas, enquanto que o campo cerrado caracteriza-se pelo predomínio de gramíneas e pequenos arbustos com ocorrência de algumas árvores (Maroni et al. 2006). Dessa forma, no cerrado *stricto sensu* os indivíduos de *L. origanoides* estão sujeitos ao sombreamento nos horários iniciais da manhã e do final da tarde, por parte das árvores localizadas aos arredores, enquanto que os indivíduos que vegetam no campo cerrado estão expostos à luz solar durante todo o dia.

Material vegetal

Para a análise de densidade dos tricomas foliares, foram coletadas duas folhas completamente expandidas de cada um dos 12 indivíduos ocorrentes nas duas populações: uma folha foi utilizada para estudos da face abaxial do limbo foliar e uma folha para análise da face adaxial. Foi também coletada uma inflorescência de cada indivíduo do campo cerrado.

Para análises do rendimento de óleo essencial produzido pelos tricomas glandulares e para sua caracterização química, folhas e inflorescências foram coletadas

durante o verão, em fevereiro de 2013, a partir de quatro indivíduos (numerados de 1 a 4) de *L. origanoides* vegetando no cerrado *stricto sensu* e de três indivíduos (numerados de 1 a 3) da população ocorrente no campo cerrado. É importante salientar que um dos indivíduos ocorrentes no campo cerrado (indivíduo número 1) encontrava-se sobre um formigueiro. Todos os indivíduos estudados encontravam-se no mesmo estágio fenológico.

Ramos férteis foram depositados no Herbário Irina Delanova Gemtchújnicov (BOTU), do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

Registro das condições ambientais

Informações sobre a temperatura e umidade relativa do ar no período de Novembro de 2012 a Março de 2013, momento em que as folhas estão em formação, foram obtidas com auxílio de DataLogger para o cerrado *stricto sensu* e da mini estação meteorológica do Departamento de Botânica da Unesp para o campo cerrado. A densidade do fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) foi obtida com auxílio de fluorômetro em ambos ambientes às 13 horas, em dias consecutivos.

A tabela 1 apresenta os dados de temperatura, umidade relativa do ar, DFFF e altitude das duas áreas estudadas.

Densidade de tricomas glandulares

Amostras de flores e da região mediana do limbo foliar foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por uma hora e desidratadas em série etílica. Em seguida,

foram secadas em ponto crítico, metalizadas com ouro (Robards 1978) e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura Fei Quanta.

Para obtenção dos valores de densidade glandular no limbo foliar e nas peças florais, o número de tricomas glandulares foi calculado em uma área de 1mm^2 com auxílio do software Scandiun acoplado ao sistema de captura de imagens do microscópio eletrônico de varredura.

Os resultados obtidos para densidade de tricomas glandulares nas peças florais e limbo foliar; e na mesma face do limbo foliar em cada área, foram submetidos à análise estatística ANOVA, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do software BioEstat 5.0.

Extração, quantificação e caracterização da composição química dos óleos essenciais

Amostras de folhas e inflorescências foram acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar, em temperatura controlada de 40°C , realizando-se pesagens diárias, até que se obtivesse massa seca constante.

A extração e a análise da composição química do óleo essencial foram conduzidas no Laboratório de Produtos Naturais, do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas – SP.

O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger (Craveiro et al. 1981) por duas horas, e, posteriormente, armazenado em frascos de vidro transparente devidamente identificados e mantidos em freezer a 4°C até a análise da sua composição química.

A análise qualitativa da composição química dos óleos essenciais foi conduzida em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-

5000), dotado de coluna capilar de sílica fundida OV - 5 (30m x 0,25mm x 0,25µm Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.), operando por impacto de elétrons (70 eV.), hélio com gás de arraste (1,0 mL/min.), injetor a 240°C, detector a 230°C, volume de injeção: 1µL de solução (1mg óleo essencial/1mL de acetato de etila), *split* 1/20 e o seguinte programa de temperatura: 60°C – 240°C, 3°C/min.

A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.) e índice de retenção (Adams 2007). Os índices de retenção (IR) das substâncias foram obtidos através da injeção de uma mistura padrão de n-alcanos (Sigma-Aldrich, C₉-C₂₄), nas mesmas condições operacionais descritas acima para o sistema CG-EM, aplicando-se a equação de Van den Dool & Kratz (1963).

A separação e quantificação (método de normalização de área) das substâncias foi conduzida em cromatógrafo gasoso (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010/AOC-20i), dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm), utilizando hélio como gás de arraste (1,0 mL/min), volume de injeção: 1µL de solução (1mg óleo essencial/1mL de acetato de etila), *split* 1/20 e o seguinte programa de temperatura: 60°C – 160°C, 5°C/min.; 160°C – 230°C, 3°C/min.; 230°C – 280°C, 10°C/min.

O rendimento de óleo essencial foi comparado entre os órgãos e entre as áreas de coleta por meio da análise estatística ANOVA, sendo as médias comparadas pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do software BioEstat 5.0. As substâncias majoritárias (> 10%) foram submetidas à análise multivariada, por meio da técnica de Análise por Componentes Principais (PCA) correlacionando e agrupando os dados dos componentes químicos em relação a sua proporção relativa nos óleos essenciais.

RESULTADOS

Densidade de tricomas

Tricomas glandulares foram observados em ambas as faces do limbo foliar (Fig. 2A-B) e das brácteas (Fig. 2C), além da face abaxial das sépalas (Fig. 2D) e pétalas (Fig. 2E) de *L. origanoides*. Nas pétalas essas glândulas encontram-se distribuídas na região distal, estando ausentes na região mediana e basal. Estames e carpelos não apresentaram tricomas glandulares.

Nas inflorescências de indivíduos do campo cerrado, a densidade glandular observada foi superior em comparação com as folhas ($P < 0,00001$; $F=144,3919$) (Tab.2). Brácteas e sépalas foram os órgãos com maior densidade glandular na inflorescência (Tab. 2).

Tanto para indivíduos do campo cerrado como do cerrado *stricto sensu*, a densidade de tricomas glandulares na face abaxial do limbo foliar (Fig. 2-B) foi cerca de 3 a 4 vezes maior que na adaxial (Fig. 2-A) (Tab. 3).

No que se refere à comparação da densidade glandular em folhas de indivíduos vegetando nas diferentes fisionomias do cerrado, a densidade de tricomas glandulares foi maior na face abaxial do limbo foliar de indivíduos do campo cerrado ($P= 0.0009$; $F=15.6354$). Já para a face adaxial do limbo foliar, a densidade dos tricomas glandulares não variou entre os ambientes ($P = 0.2998$; $F= 1.1297$) (Tab. 3).

Perfil químico do óleo essencial

O rendimento do óleo essencial extraído das inflorescências de *L. origanoides* foi maior quando comparado com o material extraído das folhas (Fig. 3). Nas amostras provenientes do campo cerrado, a média do rendimento do óleo foi de 0,58 e 0,14 nas inflorescências e folhas, respectivamente; enquanto que no cerrado *stricto sensu* a média foi de 0,76 e 0,28, respectivamente (Fig. 3).

No que se refere a comparação do rendimento do óleo essencial extraído de folhas de indivíduos vegetando nas diferentes áreas de cerrado, não houve variação entre as populações.

Para o cálculo do rendimento foram desprezadas as amostras de ambos os órgãos do indivíduo 1 do campo cerrado, pois a produção de óleo essencial por este indivíduo foi discrepante das demais, sendo de 1,98 e 3,97 nas inflorescências e nas folhas, respectivamente.

Foram identificadas no total 49 substâncias no óleo essencial extraído das folhas e inflorescências dos indivíduos de *L. origanoides*. A quantidade de substâncias encontradas nas inflorescências foi superior em relação às folhas, independente da área de coleta, variando entre 20-30 nas inflorescências e entre 18-28 nas folhas no cerrado *stricto sensu* e entre 20-26 e 15-24 nas inflorescências e folhas, respectivamente, no campo cerrado. Os compostos majoritários variaram entre as áreas de coleta, bem como para um mesmo indivíduo e o órgão da planta amostrado (Tab. 4).

No cerrado *stricto sensu* os indivíduos 1, 2 e 4 apresentaram como substância majoritária nas inflorescências o *trans*-cariofileno (63,4%; 33,7% e 39,3%), enquanto o indivíduo 3 o α -humuleno (58,7%). Nas folhas o indivíduo 2 apresentou o *trans*-cariofileno (33,7%) e δ -cadineno (10,3%) como substâncias majoritárias; e os indivíduos 3 e 4 o α -humuleno (66,3% e 40,0%), seguido pelo *trans*-cariofileno, 9,5% e 24,9%, respectivamente. No campo cerrado a substância majoritária do indivíduo 1 foi o 1,8 cineol tanto nas inflorescências (52,2%) como nas folhas (58,2%); o indivíduo 2 apresentou o β -elemeno nas inflorescências (10,2%) e α -humuleno nas folhas (10,3%), e *trans*-cariofileno, γ -selineno e 7-epi- α -selineno, tanto nas inflorescências (11,2%, 14,9% e 10,5%), como nas folhas (9,5%, 16,7% e 13,5%). O indivíduo 3 apresentou nas inflorescências α -pineno (27,2%) e *trans*-cariofileno (38,6%), enquanto que nas folhas

apresentou como majoritário o *trans*-cariofileno (60,6%) (Tab. 4). O indivíduo 1 do campo cerrado não apresentou a classe dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos como a mais abundante dos óleos essenciais, nestes predominam os monoterpenos oxigenados para a inflorescência e folhas, 61,8% e 71,3%, respectivamente (Tab. 4).

A análise de componentes principais mostra a formação de três grupos químicos em cada área de coleta. No cerrado *stricto sensu* apenas os indivíduos 3 e 4 agrupam-se constituindo um único grupo ; os indivíduos 1 e 2 formam grupos isolados (Fig. 4). Já no campo cerrado não ocorre o agrupamento de nenhum dos indivíduos, sendo cada indivíduo separado em um grupo químico (Fig. 4). Ainda, embora a inflorescência e folha de cada indivíduo estejam agrupadas, as substâncias minoritárias, bem como, a proporção relativa das substâncias majoritárias variam entre os órgãos (Tab. 4).

DISCUSSÃO

No presente trabalho maior densidade de tricomas glandulares foi observada na face abaxial do limbo foliar de indivíduos de *L. origanoides* crescendo no campo cerrado, onde a umidade relativa do ar mostra-se discretamente mais baixa e os valores de DFFF e altitude mais elevados. Pouco se sabe sobre a influência de fatores exógenos na formação de estruturas secretoras em plantas, havendo relatos do efeito da luz, temperatura, altitude, disponibilidade de nutrientes, dentre outros, na densidade de glândulas em diferentes espécies vegetais (Gianfagna et al. 1992; Pérez-Estrada et al. 2000; Horgan et al. 2009). Estudos comprovam que em ambientes mais secos, a densidade de tricomas nas folhas de determinada espécie pode ser maior quando comparada com indivíduos vegetando em ambiente com maior umidade (Pérez-Estrada et al. 2000). Da mesma forma, a luminosidade pode influenciar positivamente a formação de tricomas glandulares (Yamaura et al. 1989; Pérez-Estrada et al. 2000).

Segundo Pérez-Estrada et al. (2000), além de um papel defensivo contra agentes bióticos, tricomas glandulares podem atuar na reflexão de raios solares e assim, restringir a perda de água. Embora a DFFF tenha variado pouco entre as áreas, sabe-se que o cerrado *sensu stricto* apresenta maior adensamento vegetal e em determinados períodos do dia os indivíduos podem encontrar-se em situações de sombreamento, o que não ocorre no campo cerrado, devido ao predomínio de herbáceas. Assim, o possível sombreamento recebido pelos indivíduos desta área pode estar relacionado à menor densidade de tricomas glandulares, uma vez que plantas expostas a maior radiação solar tendem a possuir maior densidade glandular como mecanismo de proteção (Gianfagna et al. 1992; Pérez-Estrada et al. 2000). Ainda, a maior densidade de tricomas glandulares nas folhas de indivíduos de *L. origanoides* vegetando no campo cerrado pode estar relacionada à maior altitude registrada na área de coleta. A influência da altitude na abundância de estruturas secretoras foi confirmada por Sheue et al. (2003) que mostraram maior número de glândulas internas em indivíduos de *Pinus taiwanensis* em altitudes medianas (1000 a 2500m), em comparação com aqueles encontrados sob baixas (700m) ou elevadas altitudes (3000m). Segundo os autores, as variações no número de estruturas secretoras devem ser resultantes de interações genéticas e ambientais. Da mesma forma, podemos sugerir que as variações na densidade glandular observada entre indivíduos de *L. origanoides* vegetando no campo cerrado e no cerrado *stricto sensu* podem ser resultantes da interação entre fatores ambientais ou micro-ambientais e fatores genéticos.

Apesar da diferença observada na densidade glandular em folhas de indivíduos de *L. origanoides* vegetando no campo cerrado e no cerrado *stricto sensu*, não houve variação no rendimento do óleo essencial entre os ambientes. Esse fato pode estar relacionado à natureza mista da secreção produzida pelos tricomas glandulares de *L.*

origanoides. Além de substâncias lipídicas, Tozin & Rodrigues (2014) detectaram histoquimicamente a presença de polissacarídeos, substâncias fenólicas, proteínas, alcalóides, dentre outros, nos tricomas glandulares dessa espécie. A natureza mista da secreção produzida pelos tricomas é um aspecto comum a outras espécies de *Lippia* (Combrinck et al. 2007; Argyropoulou et al. 2010). Tozin & Rodrigues (2014) demonstraram ainda que não são todos os morfotipos de tricomas glandulares de *L. organoides* que produzem óleos essenciais. Dessa forma, os tricomas glandulares que se encontram em maior abundância nas folhas de indivíduos do campo cerrado podem não ser aqueles produtores de óleo essencial. Ou ainda, podemos sugerir que sob as condições ambientais do campo cerrado, ocorra maior investimento na produção de outros tipos de substâncias pelos tricomas glandulares que garantam maior proteção contra alta intensidade luminosa e menor umidade relativa do ar. Nesse sentido, é conhecido que as secreções hidrofílicas podem atuar como lubrificantes em ambientes mais secos e facilitar a expansão foliar (Ascensão et al. 1999). Além disso, sabe-se que em espécies de *Lippia* compostos fenólicos são abundantes e de constituição variável (Pascual et al. 2001), o que pode representar importante papel na proteção contra elevados índices e radiação UV-B resultantes da maior exposição aos raios solares (Liakoura et al. 1997).

Nossos resultados mostraram ainda que as inflorescências de *L. organoides* apresentam maior densidade de tricomas glandulares e maior rendimento de óleo essencial em comparação com o limbo foliar de indivíduos em um mesmo ambiente. Esse dado é contrastante com estudos para outras espécies que relatam baixa produtividade de óleo essencial em flores e inflorescências em comparação com folhas (Bassole et al. 2005; Parra-Gárce et al. 2010) e pode estar relacionado com o papel diferencial dessas glândulas em órgãos reprodutivos (Ascensão et al. 1999; Paiva &

Martins 2011). Assim, podemos sugerir que em *L. origanoides*, os tricomas glandulares presentes nas inflorescências estão envolvidos principalmente na produção de grandes quantidades de óleos essenciais, os quais exercem papel importante na proteção dos órgãos reprodutivos contra herbívoros e patógenos (Stökl et al. 2010). Além disso, muitos terpenos podem ser reutilizados no metabolismo vegetal (Harborne 1988), podendo atuar como precursores na síntese de hormônios, tais como hormônios do florescimento (Danilova & Kashina 1987; Roshchina & Roshchina 1993).

As análises químicas do óleo essencial de folhas e inflorescências de *L. origanoides* revelaram uma grande variação na composição química do óleo essencial entre os indivíduos em cada área de coleta. Esse fato pode estar relacionado à variabilidade genética entre os indivíduos das populações estudadas. Segundo Catalan & Lampasona (2002), variações intra-específicas na composição química do óleo essencial é um aspecto comum para o gênero *Lippia*. Para uma mesma espécie, mais de 15 diferentes quimiotipos podem ser encontrados (Bassole et al. 2003).

Estudos realizados com exemplares de *L. origanoides* (*lato sensu*) mostram perfis químicos bastante divergentes. As substâncias timol, carvacrol e p-cimeno são normalmente relatadas como majoritárias (Oliveira et al. 2007; Cavalcante et al. 2010; Stashenko et al. 2010; Stashenko et al. 2013). Entretanto, no presente trabalho timol e carvacrol não foram encontrados, enquanto que p-cimeno foi encontrado em pequenas quantidades. Esta situação corrobora os relatos de Stashenko et al. (2010) e Rodrigues et al. (2011) que demonstraram perfil químico bastante divergente nesta espécie. Deve-se salientar que a grande variedade de quimiotipos encontrados para *L. origanoides* pode ser decorrente da sinonimização proposta por O’Leary et al. (2012), onde em revisão da secção *Goniostachyum* de *Lippia* sinonimizaram 41 espécies em apenas quatro. Assim,

o que se considera *L. origanoides*, hoje, é resultado da sinonimização de 28 espécies (O’Leary et al. 2012).

Em alguns indivíduos de *L. origanoides* o α -pineno, foi encontrado em grande quantidade nas inflorescências. Esse fato pode estar associado ao conhecido papel dessa substância na atração de agentes polinizadores (Stökl et al. 2010). Contudo, as inflorescências de alguns indivíduos de *L. origanoides* não apresentaram tal composto em grandes quantidades, o que pode ser explicado por diferenças fenológicas entre os indivíduos. Estudos apontam que após a antese alguns compostos podem volatilizar ou serem utilizados como precursores para a formação de outras substâncias (Stökl et al. 2010; Parra-Garcés et al. 2010) tais como carvoneno, limoneno e β -pineno (Bicas et al. 2008).

O *trans*-cariofileno e o α -humuleno estão presentes entre os majoritários em folhas e inflorescências de grande parte dos indivíduos. Estudos veem demonstrando a importância dessas substâncias devido suas atividades biológicas, como anti-inflamatório, analgésico, entre outros (Fernandes et al. 2007; Sabulal et al. 2006), além da utilização na indústria produtora de sabões, detergentes e grande variedade de produtos alimentícios (Standen et al. 2006).

O indivíduo número 1 do campo cerrado, localizado sobre um formigueiro, foi o que apresentou maior divergência quanto ao rendimento e composição química do óleo essencial, sendo o único a apresentar 1,8 cineol (eucaliptol) como composto majoritário tanto nas inflorescências (52,2%) como nas folhas (58,2%). A abundante produção desta substância pode estar relacionada ao ataque de formigas a este indivíduo, visto que o 1,8 cineol é tóxico para insetos herbívoros (Prates et al. 1998; Sukotason et al. 2004). Pesquisas relatam que essa substância tóxica penetra no corpo do inseto via sistema respiratório – efeito fumigante, cutícula – efeito de contato, ou sistema digestivo –

efeito digestivo, podendo causar a morte de diversas espécies animais (Sukotason et al. 2004). Esse fato evidencia a plasticidade química que os indivíduos de *L. origanoides* podem apresentar conduzindo as rotas metabólicas produtoras do óleo essencial de acordo com as pressões exercidas pelo meio, indicando a necessidade de maior controle na utilização desta espécie, principalmente na medicina popular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams RP 2007 Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Allured Publ. Corp, Carol Stream.
- Argyropoulou, C, A Akoumianakiloannidou, SN Christodoulakis, C Fasseas 2010 Leaf anatomy and histochemistry of *Lippia citriodora* (Verbenaceae). Australian Journal of Botany 58:398-409.
- Argyropoulou C, D Daferera, PA Tarantilis, C Fasses, M Polissiou 2007 Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H. B. K. (Verbenaceae) at two developmental stages. Biochemical Systematics and Ecology 35: 831-837.
- Ascensão L, L Mota, MM Castro 1999 Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. Annals of Botany 84:437-447.
- Bassole IHN, R Nebie, A Savadogo, CT Ouattara, N Barro, SA Traore 2002 Composition and antimicrobial activities of the leaf and flower essential oils of *Lippia chevalieri* and *Ocimum canum* from Burkina Faso. African Journal of Biotechnology 4(10): 1156-1160.

- Bicas JL, P Fontanille, GM Pastore, C Larroche 2008 Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads. *Journal of Applied Microbiology* 105: 1991-2001.
- Catalan CAN, PDE Lampasona 2002 The chemistry of the genus *Lippia* (Verbenaceae). Pages 127-149. in Kintzios SE eds. *Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia**, Taylor and Francis; London
- Cavalcanti SCH, ES Niculau, AF Blank, CAG Câmara, IN Araújo, PB Alves 2010 Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Bioresource Technology* 101:829-832.
- Combrinck S, GWD Plooy, RI Mccrindle, BM Botha 2007 Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of Botany* 99:1111-1119.
- Craveiro AA, AG Fernandes, CHS Andrade, FJA Matos, JW Alencar, MIL Machado 1981 Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza: UFC.
- Danilova MF, TK Kashina TK 1987 Ultrastructure of glandular squamule of *Perilla ocymoides* (Lamiaceae) in connection with their participation in the synthesis of steroid hormones and gibberellins. *Phytomorphology* 72: 427-435.
- Fernandes ES, GF Passos, R Medeiros, FM Cunha, J Ferreira, MM Campos, LF Pianowski, JB Calixto 2007 Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology* 569: 228-236.
- Fonari T, G Vicente, E Vásquez, M García-Risco, G Reglero 2012 Isolation of essential oil from different plants and herbs by superficial fluid extraction. *Journal Chromatography A* 1250: 34-48

- Gianfagna TJ, CD Carter, JN Sacalis 1992 Temperature and photoperiod influence trichome density and sesquiterpene content of *Lycopersicon hirsutum* f. *hirsutum*. Plant Physiology 100: 1403-1405.
- Gobbo-Neto L, NP Lopes 2007 Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química nova 30(2): 374-381.
- Gomes GA, CMO Monteiro, TOS Senra, V Zeringota, F Calmon, RS Matos, E Daemon, RWS Gois, GMP Santiago, MG Carvalho 2012 Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentornitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*(Acari: Ixodidae). Parasitology Research 111: 2423-2430.
- Gomes PA, MF Souza, ITS Júnior, WGO Junior, LS Figueiredo, ER Martins 2009 Influência do sombreamento na produção de biomassa, óleo essencial e quantidade de tricomas glandulares em cidrão (*Lippia citriodora* Lam.). Biotemas 22(4): 9-14.
- Gonzáles WL, MA Negritto, LH Suárez, E Gianoli 2008 Induction of glandular and non-glandular trichomes by damage in leaves of *Madia sativa* under contrasting water regimes. Acta Oecologica 33: 128-132.
- Harborne JB 1988 The Flavonoids: Advances in Research since 1980. New York: Chapman and Hall.
- Horgan FG, DT Quiring, A Lagnaoui, Y Pelletier 2009 Effects of altitude of origin on trichome-mediated anti-herbivore resistance in wild Andean potatoes. Flora 204: 49-62.
- Judd WS, CS Campbell, EA Kellogg, PF Stevens, MJ Donoghue 2009 Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3 ed. Artmed, Porto Alegre.

- Juliani Jr HR, AR Koroch, HR Juliani, VS Trippi, JA Zygodlo 2002 Intraespecific variation in leaf oils of *Lippia junelliana* (mold.) tronc. Biochemical Systematics and Ecology 30: 163-170.
- Langenheim JH 2003 Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany. Timber Press, Portland, Cambridge
- Liakoura V, M Stefanou, Y Manetas, C Cholevas, G Karabourniotis 1997 Trichome density and its UV-B protective potential are affected by shading and leaf position on the canopy. Environmental and Experimental Botany 38:223-229.
- Maroni BC, LC Di Stasi, SR Machado 2006 Plantas medicinais do cerrado de Botucatu – guia ilustrado. São Paulo: Editora UNESP.
- Martínez-Natarén DA, V Parra-Tabla, G Dzib, LM Calvo-Irbién 2011 Morphology and density of glandular trichomes in populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H. B. K., Verberaceae), and the relationship between trichome density and climate. Journal of the Torrey Botanical Society 138(2): 134-144.
- Mesa-Arango AC, L Betancur-Glavis, J Montiel, JG Bueno, A Baena, DC Durán, JR Martínez, EE Stashenko 2010 Antifungal activity and chemical composition of the essential oils of *Lippia alba* (Miller) N. E Brown grow in different regions of Colombia. Journal Essential Oil Research 22(6): 568-574.
- Oliveira DR, GG Leitão, HR Bizzo, D Lopes, DS Alviano, CS Alviano, SG Leitão 2007 Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. Food Chemistry 101: 236-240.
- O’Leary N, SS Denham, F Salimena, ME Múlgura 2012 Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbanaceae) using the phylogenetic species concept. Botanical Journal of Linnean Society 170: 197-219.

- Paiva EAS, LC Martins 2011 Calycinal trichomes in *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae): ontogenesis, structure and functional aspects. Australian Journal of Botany 59(1): 91–98.
- Parra-Garcés MI, JF Caroprese-Araque, D Arrieta-Prieto, E Stashenko 2010 Morfología, anatomía, ontogenia y composición química de metabolitos secundários em inflorescencias de *Lippia alba* (Verbenaceae). Revista Biología Tropical 58(4): 1533-1548.
- Pascual ME, K Slowing, E Carretero, DM Mata, A Villar 2001 *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology 6: 201-214.
- Pérez-Estrada LB, Z Cano-Santana, K Oyama 2000 Variation in leaf trichomes of *Wigandia urens*: environmental factors and physiological consequences. Tree Physiology 20: 629-632.
- Prates HT, JP Santos, JM Waquil, JD Fabris, AB Oliveira, JE Foster 1998 Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzoperthadominica*(F.) and *Triboliumcastaneum* (Herbst). Journal of Stored Products Research 34(4): 243-249.
- Robards AW 1978 An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. in: Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells. J. L. Hall. (eds.). New York, Elsevier.
- Rocha-Guzmán NE, JA Gallegos-Infante, RF González-Laredo, M Ramos-Gómez, ME Rodríguez-Muñoz, R Reynoso-Camacho, A Rocha-Urbe, MR Roque-Rosales 2007 Antioxidant effect of orégano (*Lippia berlandieri* v. Shauer) essential oil and mother liquors. Food Chemistry 102: 330-335.
- Rodrigues FFG, HDM Coutinho, AR Campos, SG Lima, JGM Costa 2011 Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Lippia microphylla* Cham. Acta Scientiarum. Biological Sciences 33(2): 141-144.

- Roshchina VV, VD Roshchina 1993 The Excretory Function of Higher Plants. Berlin: Springer.
- Sabulal B, M Dan, AJ John, R Kurup, NS Pradeep, RK Valsamma, V George 2006 Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingibernimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. *Phytochemistry* 67: 2469-2473.
- Sheue CR, YP Yang, LL Kuo-Huang 2003 Altitudinal variation of resin ducts in *Pinus taiwanesis* Hayata (Pinaceae) needles. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: 305-313.
- Souza VC, H Lorenzi 2008 Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2ª Ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Standen MD, PA Connellan, DN Leach 2006 Natural killer cell activity and lymphocyte activation: Investigating the effects of a selection of essential oils and components in vitro. *The International Journal of Aromatherapy* 16: 133-139.
- Stashenko EE, JR Martínez, MP Cala, DC Durán, D Caballero 2013 Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science* 36: 192-202.
- Stashenko EE, JR Martínéz, CA Ruíz, G Arias, C Durán, W Salgar, M Cala 2010 *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science* 33: 93-103.
- Stökl J, J Brodmann, A Dafni, M Ayasse, BS Hansson 2010 Smells like aphids: orchid flowers mimic aphid alarm pheromones to attract hoverflies for pollination. *Proceedings of The Royal Society B* doi:10.1098/rspb.2010.1770.
- Sukontason KL, N Boonchu, K Sukontason, W Choochote 2004 Effects of eucalyptol on house fly (Diptera: Muscidae) and blow fly (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 46(2): 97-101.

- Van Den Dool H, Kratz DJ 1963 A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal Chromatography* 11: 463-467.
- Veras HNH, MKA Araruna, JGM Costa, HDM Coutinho, MR Kerntopf, MA Botelho, IRA Menezes 2013 Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible mechanism of action. *Phytotherapy research* 27: 179-185.
- Viljoen AM, S Subramoney, SF Van Vuuren, KHC Baser, B Dermirci 2005 The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 271-277.
- Werker E 1993 Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae – A Review. *Flavour and Fragrance Journal* 8: 249-255.
- Werker E 2000 Trichome Diversity and Development. *Advances in Botanical Research* 31.
- Yamaura T, S Tanaka, M Tabata 1989 Light-dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in *Thyme* seedlings. *Phytochemistry*. 32(3): 741-744.

Tabela 1. Dados ambientais registrados em duas áreas de Cerrado na região centro-oeste do estado de São Paulo.

	cerrado <i>stricto sensu</i>	campo cerrado
Temperatura (°C)	22,5	21,7
Umidade relativa (%)	82,0	79,5
DFFF ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	1837	2045
Altitude (m)	719	833

Tabela 2. Densidade de tricomas glandulares (mm²) em folhas e inflorescências de *Lippia origanoides* Kunth do campo cerrado.

Estrutura	Densidade
Bráctea	624,00 A
Sépala	544,42 A
Pétala	271,85 B
Folha (abaxial)	97,62 C
Folha (adaxial)	21,43 D

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 3. Densidade de tricomas glandulares (mm²) do limbo foliar de indivíduos de *Lippia origanoides* Kunth em duas áreas de Cerrado.

Área	Face abaxial do limbo foliar	Face adaxial do limbo foliar
campo cerrado	97,62 A	21,43 A
cerrado <i>stricto sensu</i>	69,52 B	19,16 A

Letras maiúsculas indicam comparação entre áreas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 4. Composição química do óleo essencial (%) extraído de inflorescências e folhas de *Lippia origanoides* Kunth em área de cerrado *stricto sensu* e campo cerrado, no estado de São Paulo, Brasil.

SUBSTÂNCIAS	Inflorescência							Folha						IR*	IR**
	cerrado <i>stricto sensu</i>				campo cerrado			cerrado <i>stricto sensu</i>			campo cerrado				
	1.0	2.0	3.0	4.0	1.0	2.0	3.0	2.0	3.0	4.0	1.0	2.0	3.0		
Hidrocarboneto monoterpênico															
α-tujeno	nc	nc	nc	nc	0.6	nc	nc	nc	nc	nc	0.8	nc	nc	927	930
α-pineno	3.7	0.8	8.4	nc	4.6	nc	27.2	0.5	0.7	nc	4.2	nc	2.4	934	939
canfeno	1.2	3.0	1.3	0.4	0.2	0.2	2.4	1.5	0.1	0.1	tr	nc	0.2	948	954
sabineno	nc	nc	nc	nc	5.8	nc	nc	nc	nc	nc	4.2	0.7	nc	975	975
β-pineno	nc	nc	nc	nc	2.3	nc	1.3	nc	nc	nc	2.3	nc	nc	977	979
mirceno	nc	0.6	0.5	nc	1.5	tr	0.7	tr	tr	nc	1.5	nc	nc	991	990
α-felandreno	nc	nc	0.4	nc	0.3	nc	tr	nc	nc	nc	0.4	nc	nc	1006	1002
α-terpineno	nc	0.6	tr	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	0.6	nc	nc	1017	1017
p-cimeno	1.0	1.9	0.3	tr	1.6	0.2	2.1	0.9	nc	nc	1.0	nc	nc	1024	1024
limoneno	0.4	1.9	3.0	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	1.8	0.2	0.4	1029	1029
Z-β-ocimeno	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	1.4	nc	0.3	nc	nc	nc	1037	1037
E-β-ocimeno	nc	7.9	1.8	nc	tr	1.7	nc	4.5	0.2	tr	tr	0.8	nc	1047	1050
γ-terpineno	tr	5.1	1.2	nc	1.9	nc	nc	0.3	nc	nc	1.3	nc	nc	1058	1059
terpinoleno	nc	0.2	tr	nc	0.3	nc	tr	tr	nc	nc	0.2	nc	nc	1089	1088
Monoterpeno oxigenado															
1-octen-3-ol	0.2	0.3	0.5	nc	nc	nc	nc	0.9	tr	0.4	nc	nc	nc	977	979
1,8 cineol	0.4	8.7	0.4	0.3	52.2	0.3	0.2	4.3	1.3	nc	58.2	nc	nc	1031	1031
linalol	1.2	5.2	0.8	3.7	0.6	5.7	1.9	1.1	tr	2.8	1.6	4.1	0.7	1100	1096
borneol	nc	1.2	tr	nc	0.5	nc	tr	0.3	tr	nc	0.6	nc	nc	1165	1169
terpin-4-ol	nc	0.6	nc	nc	1.8	nc	nc	tr	nc	nc	2.4	nc	nc	1177	1177

Tabela 4. *Continuação*

α -terpineol	nc	1.0	nc	nc	6.7	nc	nc	tr	nc	nc	8.6	nc	nc	1190	1188
Hidrocarboneto sesquiterpênico															
α -copaeno	5.3	5.1	3.4	5.4	tr	1.0	3.7	8.5	4.2	4.6	nc	1.4	8.5	1378	1376
β -elemeno	4.2	1.6	1.4	1.7	0.5	10.2	3.3	nc	nc	nc	nc	0.5	tr	1394	1390
α -gurjuneno	nc	0.3	tr	0.2	nc	nc	nc	0.6	nc	0.2	nc	nc	nc	1411	1409
<i>trans</i> -cariofileno	63.4	34.2	12.7	39.3	3.9	11.2	38.6	33.7	9.5	24.9	2.5	9.5	60.6	1422	1419
α -guaiano	nc	0.9	nc	nc	0.3	nc	nc	1.8	nc	nc	0.2	tr	nc	1440	1439
aromadendreno	nc	nc	nc	nc	nc	0.6	nc	nc	nc	nc	nc	0.6	nc	1446	1441
α -humuleno	3.7	2.3	58.7	35.0	0.3	8.3	2.2	2.7	66.3	40.0	tr	10.3	3.7	1455	1554
<i>allo</i> -aromadendreno	0.6	nc	tr	0.8	tr	tr	0.2	0.3	0.3	0.7	tr	tr	0.5	1462	1460
γ -muuroleno	1.0	0.4	0.5	1.0	nc	1.3	nc	0.9	nc	nc	nc	1.2	nc	1475	1479
germacreno D	1.6	0.6	0.3	0.9	0.6	0.7	0.7	1.0	0.6	0.9	nc	nc	1.2	1478	1485
γ -selineno	nc	nc	nc	nc	nc	14.9	nc	tr	nc	nc	nc	16.7	nc	1481	1498
β -selineno	0.9	0.7	1.3	0.5	nc	3.7	1.1	tr	nc	nc	nc	3.1	tr	1487	1492
valenceno	nc	nc	nc	nc	nc	3.0	nc	nc	nc	nc	nc	3.6	nc	1490	1496
α -selineno	nc	nc	nc	nc	nc	6.6	nc	0.9	0.3	nc	nc	6.0	tr	1496	1498
biciclogermacreno	0.2	0.5	tr	tr	5.3	nc	4.1	nc	nc	nc	2.2	nc	nc	1497	1500
α -muuroleno	nc	nc	nc	1.7	nc	nc	nc	1.6	0.7	0.9	nc	nc	1.4	1501	1500
germacreno A	1.8	2.4	tr	nc	nc	1.0	nc	0.4	nc	nc	nc	nc	nc	1506	1509
7- <i>epi</i> - α -selineno	nc	nc	nc	nc	nc	10.5	nc	nc	nc	nc	nc	13.5	nc	1514	1522
δ -cadineno	2.2	5.4	1.0	2.2	tr	0.2	0.8	10.3	1.5	2.5	nc	0.4	2.9	1525	1513
<i>trans</i> -1,4-dieno-cadina	nc	tr	nc	nc	nc	nc	nc	0.3	nc	nc	nc	nc	nc	1534	1534
germacreno B	tr	nc	tr	nc	nc	0.5	nc	nc	nc	nc	nc	0.5	nc	1553	1561
Sesquiterpeno oxigenado															
espatulenol	nc	tr	nc	0.3	3.4	nc	1.0	nc	nc	0.3	2.0	nc	nc	1578	1578

Tabela 4. *Continuação*

óxido de cariofileno	2.1	3.6	0.5	2.3	2.3	1.4	5.8	6.0	0.7	3.9	2.5	1.0	6.2	1583	1583
epoxi de humuleno II	tr	nc	nc	nc	nc	1.1	tr	tr	5.0	4.6	nc	1.2	2.8	1610	1608
1-epi-cubenol	0.3	nc	1.2	1.5	nc	0.8	nc	4.5	1.7	2.2	nc	1.7	nc	1629	1628
cubenol	0.6	1.4	tr	0.5	0.7	nc	0.6	0.3	0.3	2.4	tr	2.0	1.1	1643	1646
α -murolol	tr	0.8	tr	0.5	nc	0.7	nc	5.5	0.2	1.0	nc	0.6	0.7	1646	1646
selin-11-en-4- α -ol	nc	nc	nc	nc	nc	5.8	nc	tr	nc	nc	nc	8.1	nc	1654	1652***
α -cadinol	2.6	0.5	0.6	1.6	nc	5.9	2.0	1.1	1.3	2.8	tr	8.6	nc	1655	1654
Hidrocarboneto monoterpênico	6.3	21.9	16.9	0.4	18.9	2.0	33.7	9.1	1.0	0.4	18.2	1.8	3.0		
Monoterpeno oxigenado	1.8	16.9	1.7	4.1	61.8	6.0	2.1	6.6	1.3	3.2	71.3	4.1	0.7		
Hidrocarboneto sesquiterpênico	84.8	54.2	79.1	88.5	10.9	73.6	54.6	62.9	83.3	74.7	4.9	67.1	78.8		
Sesquiterpeno oxigenado	5.5	6.2	2.3	6.5	6.3	15.6	9.4	17.4	9.2	16.9	4.5	23.2	10.7		
Total identificado	98.4	99.2	100.0	99.5	97.9	97.2	99.7	95.9	94.9	95.2	98.9	96.0	93.3		

IR*= Índice de retenção calculado; IR**= Índice de retenção literatura (Adams, 2007); nc = não consta; tr = traço (tr $\leq$ 0,13).

*** Índice de retenção obtido no site: www.pherobase.com



Figura 1. Áreas de Cerrado. (A) Fragmento de cerrado *stricto sensu* na Fazenda Palmeira da Serra, Pratânia-SP. (B) Fragmento de campo cerrado, Botucatu-SP.

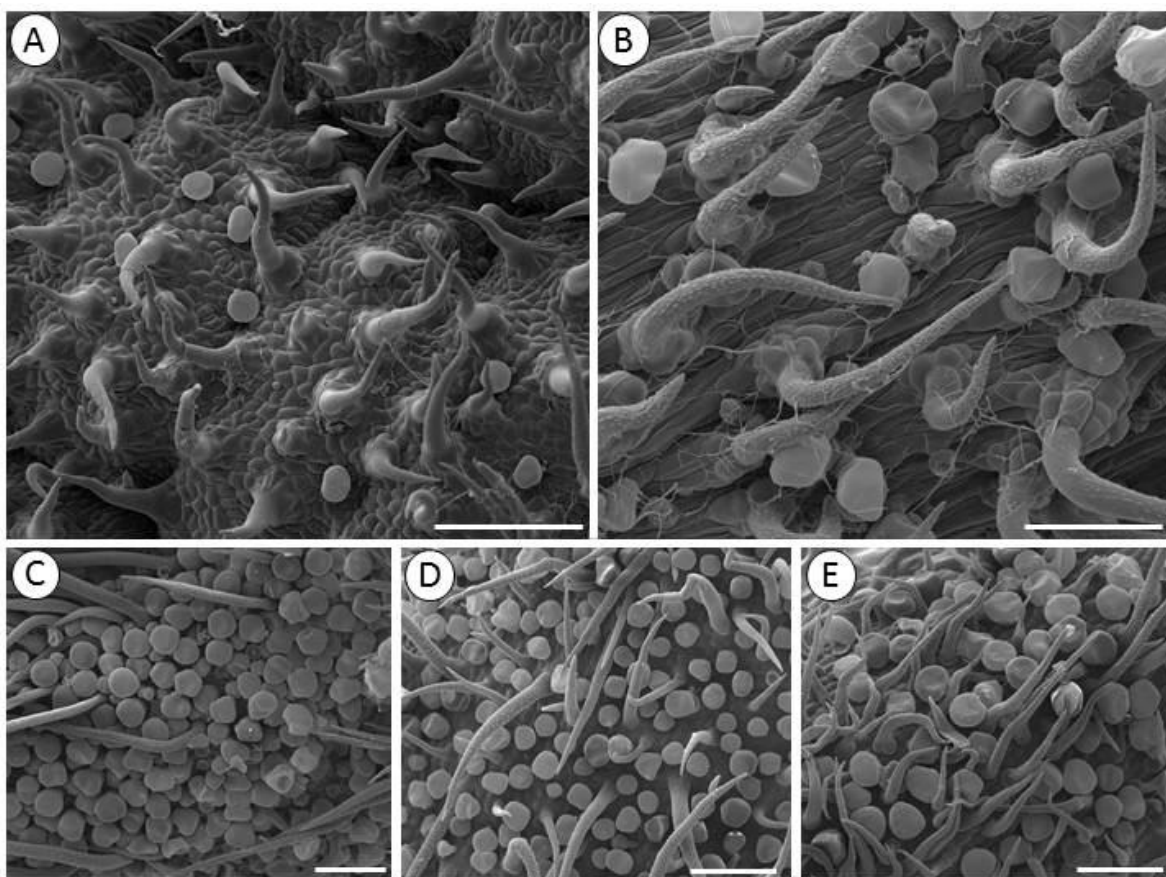


Figura 2. Eletromicrografias (MEV) de folhas e peças florais de *Lippia origanoides* Kunth mostrando tricomas glandulares e tectores. (A) Face adaxial do limbo foliar. (B) Face abaxial do limbo foliar. (C) Face abaxial da bráctea. (D) Face abaxial de sépala. (E) Face abaxial de pétala. Barras: A = 200 μm ; B-E = 100 μm .

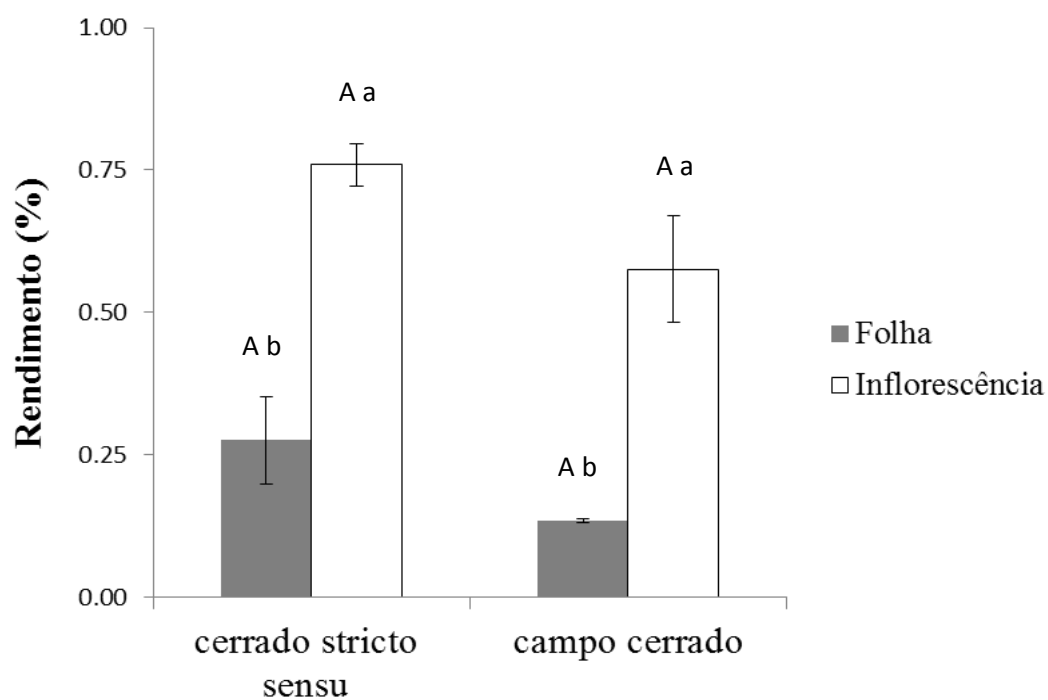


Figura 3. Média do rendimento do óleo essencial de folhas e inflorescências de *Lippia origanoides* Kunth em duas áreas de Cerrado. (Letras maiúsculas indicam comparação do mesmo órgão entre áreas e letras minúsculas entre os órgãos em cada área. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância.)

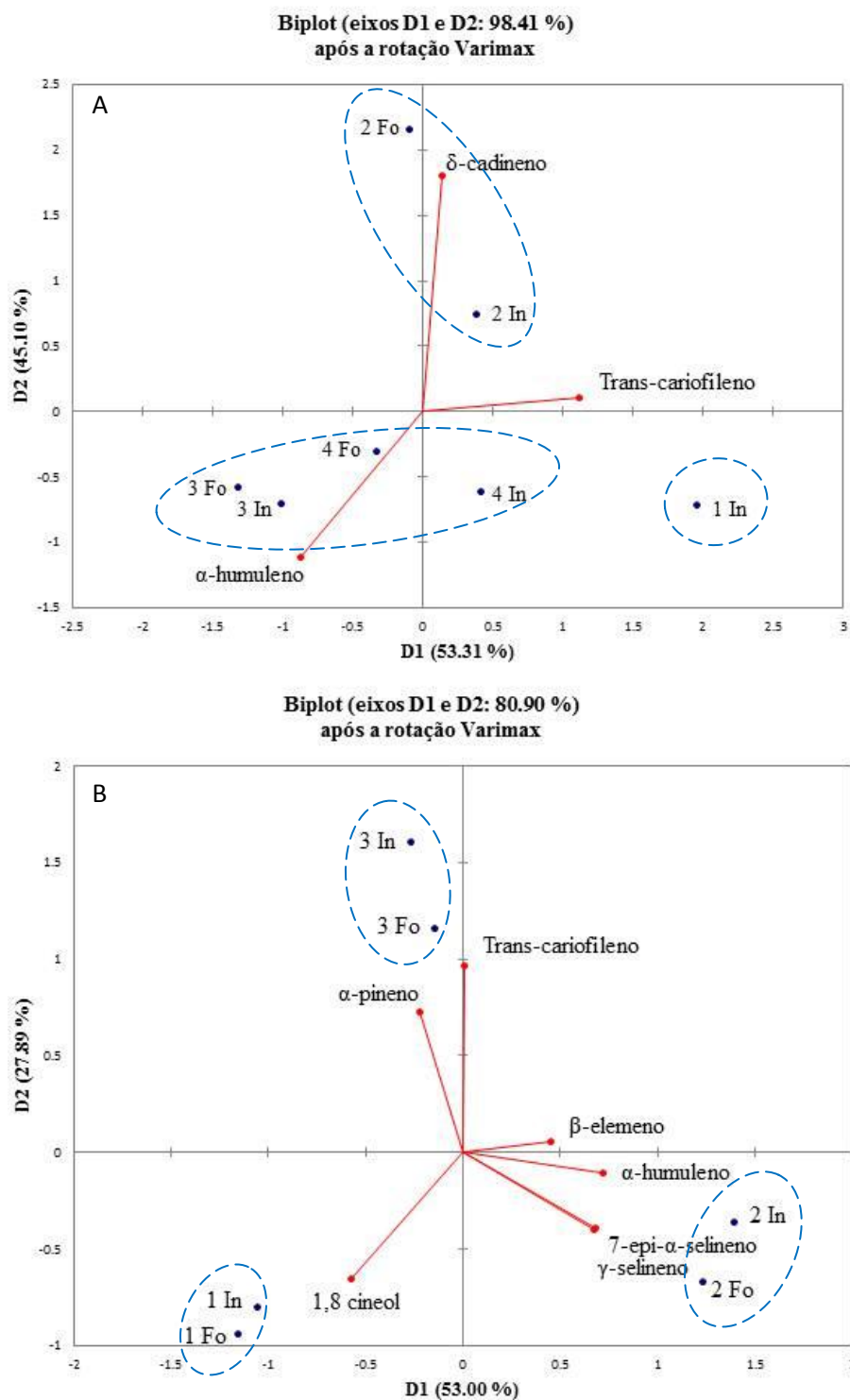


Figura 4. Análise de componentes principais (PCA) dos compostos majoritários presentes no óleo essencial extraído das folhas (Fo) e das inflorescências (In) de *Lippia origanoides* Kunth. (A) PCA dos indivíduos 1-4 do cerrado *stricto sensu*, Pratânia, SP. (B) PCA dos indivíduos 1-3 do campo cerrado, Botucatu, SP.

Considerações Finais

Esse trabalho vem preencher uma lacuna existente na literatura no que se refere à caracterização morfológica, histoquímica e ultraestrutural do sistema secretor de espécies nativas de Verbenaceae, bem como à influência do ambiente na formação e funcionamento de tricomas glandulares.

A combinação de técnicas de microscopia de luz e eletrônica de varredura e transmissão possibilitou a identificação e caracterização de seis diferentes tipos de tricomas em *L. origanoides*, além de trazer informações sobre os aspectos celulares relacionados à síntese, acúmulo e liberação da secreção. Com base na literatura, podemos dizer que as características morfológicas e celulares dos diferentes morfotipos de tricomas estão associadas às diferentes categorias químicas de substâncias produzidas por eles. Análises químicas da secreção total produzida por cada tipo de tricoma podem dar suporte a essa afirmação.

Diferentemente do proposto pela grande maioria dos trabalhos disponíveis em literatura, em *L. origanoides* atividade secretora também foi observada em apêndice epidérmico com morfologia típica de tricoma tector. O relato de tricoma tector atuando como secretor de terpenos e alcalóides não foi encontrado em literatura para espécies nativas de Verbenaceae.

Novos estudos são necessários para o entendimento do papel de cada morfotipo de tricoma nas relações ecológicas dessa espécie e na produção das substâncias de valor comercial e medicinal.

A variação na densidade dos tricomas glandulares em folhas de indivíduos ocorrentes em diferentes ambientes foi comprovada, sugerindo a sensibilidade de *L. origanoides* a pequenas variações nas condições ambientais. Esse fato merece atenção,

uma vez que as mudanças climáticas globais já representam uma realidade admitida por cientistas de todo o mundo.

Chamou atenção ainda, a grande variabilidade química do óleo essencial produzido por *L. origanoides*, o que pode representar um desafio para estudos de quimiotaxonomia e uma limitação para a utilização do óleo na produção de fármacos e em vários segmentos industriais.

Por fim, nossos resultados mostraram a importância dos tricomas de *L. origanoides* como sítios de síntese, acúmulo e liberação de compostos bioativos de valor ecológico e medicinal e sugerem a influência do ambiente no sistema secretor, ressaltando a importância dessa espécie e a necessidade da preservação do habitat natural de sua ocorrência.

Referências Bibliográficas

- AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C.C.D. (2005) *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, 79-84.
- APG III (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.161, 105-121.
- ARGYROPOULOU, C.; AKOUMIANAKILOANNIDOU, A.; CHRISTODOULAKIS, S. N.; FASSEAS, C. (2010). Leaf anatomy and histochemistry of *Lippia citriodora* (Verbenaceae). **Australian Journal of Botany**, v.58, 398-409.
- ARGYROPOULOU, C.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P. A.; FASSES, C.; POLISSIOU, M. (2007). Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H. B. K. (Verbenaceae) at two developmental stages. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, 831-837.
- ASCENSÃO, L. E PAIS, M.S. (1998) The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. **Annals of Botany**, v.81, 263-271.
- ASCENSÃO, L.; MARQUES, N. E PAIS, M.S. (1995) Glandular Trichomes on Vegetative and Reproductive Organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). **Annals of Botany**, v.75, 619-626.
- BOZANI, N. E.; FILIPPA, E. M.; BARBOZA, G. E. (2003). Estudio anatómico comparativo de tallo em algunas espécies de Verbenaceae. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma Del México, Serie Botánica**, v.74, 31-45.
- BRITO, M. B.; BARIN, G. B.; ARAÚJO, A. A. S.; DE SOUSA, D. P.; CAVALCANTI, S. C. H.; LIRA, A. A. M.; NUNES, R. S. (2009). The action modes of *Lippia sidoides* (Cham) essential oil as penetration enhancers on snake skin. **Journal of Thermal Analysis and Calormetry**, v.97, 323-327.
- CAVALCANTI, S. C. H.; NICULAU, E. S.; BLANK, A. F.; CÂMARA, C. A. G.; ARAÚJO, I. N.; ALVES, P. B. (2010). Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychusurticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, 829-832.

- CHAGONDA, L. S.; MAKANDA, C. D.; CHALCHAT, J. C. (2000). Essential oils of wild and cultivated *Lippia javanica* (Spreng) and *L. oatesii* (Rolfe) from Zimbabwe. **Journal of Essential Oil Research**, v.12, 1-6.
- COMBRINCK, S.; DU PLOOY, G. W.; MCCRINDLE, R. I.; BOTHA, B. M. (2007). Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). **Annals of Botany**, v.99, 1111-1119.
- COSTA, S. M. O.; SANTOS, H. S.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G. (2005). Constituents of the essential oil of *Lippia microphylla* Cham. from Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, 378-379.
- CRONQUIST, A. (1981). Na integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press, New York.
- DICKISON, W. C. (2000). Integrative Plant Anatomy. Massachusetts: Harcourt/Academic Press.
- DOZIO, E.; RUSCICA, M.; PASSAFARO, L.; DOGLIOTTI, G.; STEFFANI, L.; PAGANI, A.; DERMATINI, G.; ESPOTI, D.; FRASCHINI, F.; MAGNI, P. (2010). The natural antioxidant alpha-lipoic acid induces p27Kip1-dependent cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v.641, 29-34.
- EVERT, R.F. (2006). Esau's Plant Anatomy. 3a. ed. Wiley-Interscience, new Jersey.
- FAHN, A. (1979). Secretory tissues in plants. Academic Press, London.
- FAVORITO, S. (2009). Tricomas secretors de *Lippia stachyoides* Cham. (Verbenaceae): estrutura, ontogênese e secreção. Dissertação de mestrado, Unesp-Botucatu.
- FERNANDES, L. P.; OLIVEIRA, W. P.; SZTATISZ, J.; NOVÁK, C. (2008). Thermal properties and release of *Lippia sidoides* essential oil from gum Arabic/maltodextrin microparticles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.94, 461-467.
- FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G. R.; NASCIMENTO, N, R. F.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. E. G. (2007). Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham.. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, 934-940.

- FRIGHETTO, N.; OLIVEIRA, J. G.; SIANI, A. C.; CHAGAS, K. C. (1998). *Lippia alba* Mill N. E. Br. (Verbenaceae) as a source of linalool. **Journal of Essential Oil Research**, v.10, 578-580.
- FUNARI, C. S.; PASSALACQUA, T. G.; RINALDO, D.; NAPOLITANO, A.; FESTA, M.; CAPASSO, A.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; YOUNG, M. C. M.; DURIGAN, G.; SILVA, D. H. S. (2011). Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. Ethanol extracts. **Phytochemistry**, v.72, 2052-2061.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. (2007). Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30(2), 374-381.
- GOMES, G. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; DAEMON, E.; GOIS, R. W. S.; SANTIAGO, G. M. P.; CARVALHO, M. G. (2012). Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentornitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, 2423-2430.
- GONZÁLES, W. L.; NEGRITTO, M. A.; SUÁREZ, L. H.; GIANOLI, E. (2008). Induction of glandular and non-glandular trichomes by damage in leaves of *Madia sativa* under contrasting water regimes. **Acta Oecologica**, v. 33, 128-132.
- GIANFAGNA, T. J.; CARTER, C. D.; SACALIS, J. N. (1992). Temperature and photoperiod influence trichome density and sesquiterpene content of *Lycopersicon hirsutum* f. *hirsutum*. **Plant Physiology**, v. 100, 1403-1405.
- HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. (2008). Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, 211-222.
- INAMDAR, J.A. (1969) Epidermical structure and ontogeny of stomata in some Verbenaceae. **Annals of Botany**, v.33, 55-66.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. (2009) Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3 ed. Artmed, Porto Alegre, 632 p.
- JULIANI JR, H. R.; KOROCH, A. R.; JULIANI, H. R.; TRIPPI, V. S.; ZYGADLO, J. A. (2002). Intraespecific variation in leaf oils of *Lippia junelliana* (mold.) tronc. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, 163-170.

- LANGNHEIM, J. H. (2003). Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany. Portland, Cambridge: Timber Press.
- MARTÍNEZ-NATARÉN, D. A.; PARRA-TABLA, V.; DZIB, G.; CALVO-IRBIÉN, L. M. (2011). Morphology and density of glandular trichomes in populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H. B. K., Verbenaceae), and the relationship between trichome density and climate. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v.138(2), 134-144.
- MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; SILVA, M. G. V.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W. (2000). Essential oils of *Lippia alnifolia* Schau. (Verbenaceae) and *Lippia* aff. *gracillis* H. B. K., two aromatic medicinal shrubs from Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.12, 295-297.
- MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; SILVA, M. G. V. (1999). Medicinal plants of Northeast Brazil containing thymol and carvacrol – *Lippia sidoides* Cham. And *L. gracillis* H. B. K. (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.11, 666-668.
- MELO, M. T. P.; CARVALHO JÚNIOR, W. G. O.; SOUZA, M. F.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R. (2011). Produção de fitomassa e teor de óleo essencial de folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em diferentes espaçamentos de plantio. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, 230-234.
- MESA-ARANGO, A. C.; BETANCUR, GLAVIS, L.; MONTIEL, J.; BUENO, J. G.; BAENA, A.; DURÁN, D. C.; MARTÍNEZ, J. R.; STASHENKO, E. E. (2010). Antifungal activity and chemical composition of the essential oils of *Lippia alba* (Miller) N. E Brown grow in different regions of Colombia. **Journal Essential Oil Research**, v. 22(6), 568-574.
- MISHRA, R. K.; CHAUDHARY, S.; PANDEY, R.; GUPTA, S.; MALLAVARAPU, G. R.; KUMAR, S. (2010). Analysis of linalool content in the inflorescence (Flower) essential oil and leaf oil of *Lippia alba* cultivar ‘Kavach’. **Journal of Essential Oil Research**, v.22, 3-7.
- MONTEIRO, M. V. B.; LEITE, A. K. R. M.; BERTINI, L. M.; MORAIS, S. M.; NUNES-PINHEIRO, C. S. (2007). Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, 378-382.

- MORAIS, S. R.; OIVEIRA, T. L. S.; BARA, M. T. F.; CONCEIÇÃO, E. C.; REZENDE, M. H.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. (2012). Chemical constituents of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) leaves cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. **International Journal of Analytical Chemistry**, v.2012, 1-4.
- MARCO, C. A.; TEIXEIRA, E.; SIMPLÍCIO, A.; OLIVEIRA, C.; COSTA, J.; FEITOSA, J. Chemical composition and allelopathic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.72(1), 157-160.
- MARX, H.; O'LEARY, N.; YUAN, Y.; LU-IRVING, P.; TANK, D.; MÚLGURA, M.E.; OLMSTEAD, R. (2010). A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. **American Journal of Botany**, v. 97, 1647–1663.
- NEVES, I. A.; OLIVEIRA, J. C. S.; CAMARA, C. A. G.; SCHWARTZ, M. O. E. (2008). Chemical composition of the leaf oils of *Lippia gracilis* Schauer from two localities of Pernambuco. **Journal of Essential Oil Research**, v.20, 157-160.
- OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LEITÃO, S. G. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v.101, 236-240.
- OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; LEITÃO, S. G. (2006). Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, 103-108.
- O'LEARY, N.; DENHAM, S. S.; SALIMENA, F.; MÚLGURA, M. E. (2012). Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of Linnean Society**, v. 170, 197-219.
- PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SANCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.6, 201-214.
- PÉREZ-ESTRADA, L. B.; CANO-SANTANA, Z.; OYAMA, K. (2000). Variation in leaf trichomes of *wigandia urens*: environmental factors and physiological consequences. **Tree Physiology**, v. 20, 629-632.
- PILAU, M. R.; ALVES, S. H.; WEIBLEN, R.; ARENHART, S.; CUETO, A. P.; LOVATO, L. T. (2011). Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican

- oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, 1616-1624.
- RIVERO-CRUZ, I.; DUARTE, G.; NAVARRETE, A.; BYE, R.; LINARES, E.; MATA, R. (2011). Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. **Journal of Food Science**, v.76(2), 309-317.
- ROCHA-GUZMÁN, N. E.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; RAMOS-GÓMEZ, M.; RODRÍGUES-MUÑOZ, M. E.; REYNOSO-CAMACHO, R.; ROCHA-URIBE, A.; ROQUE-ROSALES, M. R. (2007). Antioxidant effect of orégano (*Lippia berlandieri* v. Shauer) essential oil and mother liquors. **Food Chemistry**, v. 102, 330-335.
- RODRIGUES, F. F. G.; COUTINHO, H. D. M.; CAMPOS, A. R.; LIMA, S. G.; COSTA, J. G. M. (2011). Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Lippia microphylla* Cham. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.33(2), 141-144.
- ROSHCHINA, V.V.; ROSHCHINA, V.D. (1993). The Excretory Function of Higher Plants. Berlin: Springer, 314 pp.
- SALIMENA FR, GIULIETTI AM. 1998. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Verbenaceae. Boletim de Botânica, Departamento de Botânica, Instituto de Biociencias, Universidade de São Paulo. v.17, 155–186.
- SALIMENA FR, SANTOS SILVA TR. 2009. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Verbenaceae. Boletim de Botânica, Departamento de Botânica, Instituto de Biociencias, Universidade de São Paulo. v.27, 119–126.
- SANTOS, M. R. A.; INNECCO, R.; SOARES, M. A. (2004). Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. **Revista Ciência Agronômica**, v.35, 377-383.
- SARRAZIN, S. L. F.; OLIVEIRA, R. B.; BARATA, L. E. S.; MOURÃO, R. H. V. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, v.134, 1474-1478.

- SILVA, A. J. R.; PÉREZ SABINO, J. F.; MÉRIDA REYES, M. (2010). Chemical composition of the essential oil of *Lippia substrigosa* Turcz. Growing wild in Guatemala. **Journal of Essential Oil Research**, v.22, 107-108.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. (2008). Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2ª Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 704p.
- STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; CALA, M. P.; DURÁN, D. C.; CABALLERO, D. (2013). Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. **Journal of Separation Science**, v. 36, 192-202.
- STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J. R.; RUÍZ, C. A.; ARIAS, G.; DURÁN, C.; SALGAR, W.; CALA, M. (2010). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, 93-103.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2004). Fisiologia vegetal. – 3 ed. – Porto Alegre: Artmed.
- VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A. (2013). Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible mechanism of action. **Phytotherapy research**, v.27, 179-185.
- VILA, R.; IGLESIAS, J.; CAÑIGUERAL, S.; CICCIO, J. F. (2004). Composition of the essential oil from leaves of *Lippia myriocephala* from Costa Rica. **Journal of Essential Oil Research**, v.16, 177-179.
- VILJOEN, A. M.; SUBRAMONEY, S.; VAN VUUREN, S. F.; BASER, K. H. C.; DERMIRCI, B. (2005). The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, 271-277.
- WERKER, E. (1993). Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae – A Review. **Flavour and Fragrance Journal**, v.8, 249-255.
- WERKER, E. (2000). Trichome Diversity and Development. **Advances in Botanical Research**, v.31.
- ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S. (2002). Volatile constituents of *Lippia lupulina* Cham.. **Flavour and Fragrance Journal**, v.17, 29-31.