



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS CERRO LARGO**  
**CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AMANDA FRITZEN**

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DE FOLHAS DE *ALOYSIA*  
*GRATISSIMA* (GILLIES & HOOK.) TRONC. (VERBENACEAE)**

**CERRO LARGO**

**2019**

**AMANDA FRITZEN**

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DE FOLHAS DE *ALOYSIA  
GRATISSIMA* (GILLIES & HOOK.) TRONC. (VERBENACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Ciências Biológicas - Licenciatura da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dr. Carla Maria Garlet de Pelegrin

CERRO LARGO

2019

### **Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Fritzen, Amanda

Caracterização Anatômica e Histoquímica de folhas de  
Aloysia gratissima (Gillies & Hook.) Tronc.  
(Verbenaceae) / Amanda Fritzen. -- 2019.

46 f.:il.

Orientadora: Doutora Carla Maria Garlet de Pelegrin.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Ciências Biológicas-Licenciatura , Cerro Largo, RS ,  
2019.

1. Plantas medicinais. 2. Aloysia gratissima. 3.  
Anatomia foliar. 4. Composição química. I. Pelegrin,  
Carla Maria Garlet de, orient. II. Universidade Federal  
da Fronteira Sul. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- LICENCIATURA  
Rua Jacob Reinaldo Haupenthal, 1580, São Pedro, Cerro Largo-RS, CEP 97900-000, 55 3359-3981  
cienciasbiologicas.cl@uffrs.edu.br, [www.uffrs.edu.br](http://www.uffrs.edu.br)

AMANDA FRITZEN

CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DE FOLHAS DE *ALOYSIA GRATISSIMA* (GILLIES & HOOK.) TRONC. (VERBENACEAE)

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientadora: Dra. Carla Maria Garlet de Pelegrin

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

04 / 12 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof.<sup>a</sup> Dra. Carla Maria Garlet de Pelegrin - UFFS

Prof.<sup>a</sup> Dra. Nessana Dartora - UFFS

Prof.<sup>a</sup> Dra. Mardiore Tanara Pinheiro dos Santos - UFFS

## RESUMO

O uso de plantas medicinais vem sendo adotado pela população mundial como alternativa de tratamento de diversas doenças. Há pouca ou nenhuma comprovação acerca das propriedades fitoterápicas das plantas medicinais, o que pode trazer complicações ao consumidor, como a toxicidade. Por isso se faz necessária a identificação da espécie e dos seus princípios ativos. As análises anatômicas são uma importante ferramenta para o controle de qualidade de fitoterápicos, pois permitem a correta identificação botânica. Dentre os estudos anatômicos há os testes histoquímicos, que possibilitam a localização de certos compostos bioativos no material vegetal com potencial terapêutico. No meio de muitas espécies vegetais com potencial medicinal destacam-se as da família Verbenaceae. *Aloysia gratissima*, popularmente conhecida como “alfazema-do-Brasil”, “garupá” e “erva-da-colônia”, é citada em estudos etnobotânicos no tratamento de dores de cabeça, problemas digestivos e transtornos respiratórios, porém são escassos os estudos que comprovem sua eficácia. O objetivo do trabalho é caracterizar a anatomia e composição histoquímica de folhas de *A. gratissima*. As amostras vegetais coletadas foram fixadas e processadas seguindo protocolos conhecidos para estudos em microscopia ótica. As observações e captura de imagens foram realizadas com microscópio ótico e estereomicroscópio. Para os testes histoquímicos foram utilizados reagentes específicos para identificação de diferentes constituintes celulares. *A. gratissima* apresenta venações pinadas, camptódromas, broquidódromas. A face adaxial da epiderme, em vista frontal, exhibe células com paredes anticlinais retas, algumas células apresentam tricomas gancho não glandulares unicelulares. Na face abaxial da epiderme observou-se uma grande quantidade de tricomas glandulares, classificados em três morfotipos, e tricomas tectores ou não glandulares. Em secção transversal, a lâmina foliar de *A. gratissima* é classificada como hipostomática, a face adaxial da epiderme apresenta duas camadas de células, e algumas células possuem um cristólito de carbonato de cálcio. A cutícula é estriada, o mesófilo é dorsiventral. Os estômatos se encontram elevados em relação às demais células epidérmicas. O feixe vascular mediano é colateral e proeminente na face abaxial, organizado em formato de arco aberto. Na análise histoquímica observou-se reação positiva para lipídeos totais no conteúdo dos tricomas glandulares e da cutícula, reação positiva para mucilagens e pectinas no conteúdo de tricomas glandulares e para a parede celular da maioria das células da folha, reação positiva para polissacarídeos totais no conteúdo de tricomas glandulares e maioria da parede das células, reação positiva para proteínas no conteúdo de tricomas glandulares e não glandulares e na parede celular da maioria das células, reação positiva para alcalóides no conteúdo de tricomas glandulares. Verificou-se ainda, que a célula apical dos tricomas glandulares, principalmente os de Tipo II, apresentam um conteúdo que não foi identificado com os testes histoquímicos realizados no presente estudo. Constata-se a necessidade de análises mais detalhas sobre a constituição química das substâncias secretadas/armazenadas, porém acredita-se que este trabalho contribui adicionando informações que possam servir de subsídio no controle de qualidade de potenciais fitoterápicos.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. *Aloysia gratissima*. Anatomia foliar. Composição química.

## ABSTRACT

The use of medicinal plants has been adopted by the world population as an alternative treatment for various diseases. There is little or no evidence about the herbal properties of medicinal plants, which can bring complications to the consumer, such as toxicity. Therefore, the identification of the species and its active principles is necessary. Anatomical analyzes are an important tool for the quality control of herbal medicines, as they allow the correct botanical identification. Among the anatomical studies are the histochemical tests, which enable the location of certain bioactive compounds in plant material with therapeutic potential. Among many plant species with medicinal potential stand out those of the Verbenaceae family. *Aloysia gratissima*, popularly known as "alfazema-do-Brasil", "garupá" and "erva-da-colônia", is cited in ethnobotanical studies in the treatment of headaches, digestive problems and respiratory disorders, but there are few studies that prove their effectiveness. The objective of this work is to characterize the anatomy and histochemical composition of *A. gratissima* leaves. The collected plant samples were fixed and processed following known protocols for optical microscopy studies. Observations and image capture were performed with optical microscope and stereomicroscope. For the histochemical tests specific reagents were used to identify different cellular constituents. *A. gratissima* has pinnate venations, camptodromous, brochidodromous. The adaxial face of the epidermis, in frontal view, shows cells with straight anticlinal walls, some cells have unicellular non-glandular hook trichomes. On the abaxial face of the epidermis, a large number of glandular trichomes were classified into three morphotypes and tectorial or non-glandular trichomes. In cross section, the leaf blade of *A. gratissima* is classified as hipoestomatic, the adaxial face of the epidermis has two cell layers, and some cells have a calcium carbonate cystolith. The cuticle is striated, the mesophyll is dorsiventral. Stomata are elevated compared to other epidermal cells. The median vascular bundle is collateral and prominent on the abaxial face, organized in an open arch shape. Histochemical analysis showed positive reaction for total lipids in glandular trichome and cuticle content, positive reaction for mucilage and pectins in glandular trichome content and cell wall of most leaf cells, positive reaction for total polysaccharides in content of glandular trichomes and majority of cell wall, positive reaction for proteins in glandular and non-glandular trichome contents and in cell wall of most cells, positive reaction for alkaloids in glandular trichome content. It was also found that the apical cell of glandular trichomes, especially Type II trichomes, present a content that was not identified with the histochemical tests performed in the present study. There is a need for more detailed analysis on the chemical constitution of secreted/stored substances, but it is believed that this work contributes by adding information that can serve as a subsidy in the quality control of potential herbal medicines.

**Keywords:** Medicinal plants. *Aloysia gratissima*. Leaf anatomy. Chemical composition.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. *Aloysia gratissima*. ..... 16
- Figura 2. A- inclusão com historresina. B- material vegetal incluído aderido em bloco de madeira. ....23
- Figura 3. Vista frontal da lâmina foliar de *Aloysia gratissima*. A- vista do padrão de nervação em estereomicroscópio. B- representação esquemática do padrão de nervação.....25
- Figura 4. Vista frontal da face adaxial da lâmina foliar de *Aloysia gratissima*. A- distribuição dos tricomas em estereomicroscópio (seta). B- detalhe dos tricomas ligados aos cristólitos em microscópio ótico (diafanização) e células epidérmicas com paredes anticlinais retas (seta). C- representação esquemática do tricoma. ....26
- Figura 5. Cortes transversais da folha de *Aloysia gratissima*. A- células epidérmicas da borda da folha com parede espessa e cutícula estriada (seta) (Sudan IV). B- cutícula estriada (seta) (Sudan IV). C- borda foliar com espessamento de parede celular epidérmica (PAS). D- mesofilo dorsiventral. E- estômatos elevados. F- estômatos protegidos por tricomas. ep aba: face abaxial da epiderme; ep ada: face adaxial da epiderme; pp: parênquima paliçádico; pe: parênquima esponjoso; es: estômato; tec: tricoma tector não glandular.....28
- Figura 6. Cortes transversais da folha de *Aloysia gratissima*. A- feixe vascular mediano em formato de arco aberto (seta). B- feixes de menor calibre voltados para face abaxial (seta). C- detalhe do feixe vascular mediano, evidenciando o colênquima anelar (seta). D- detalhe do cristólito de carbonato de cálcio. E,F- tricomas gancho associados aos cristólitos. ep aba: face abaxial da epiderme; ep ada: face adaxial da epiderme; fx v: feixe vascular; cis: cristólito; tric: tricoma gancho não glandular.....30
- Figura 7. Vista frontal da lâmina foliar de *Aloysia gratissima*. A- vista da face abaxial da epiderme em estereomicroscópio exibindo a densidade de tricomas. B- vista da face abaxial da epiderme em microscópio óptico (diafanização). ....31
- Figura 8. Tricomas glandulares e não glandulares da folha de *Aloysia gratissima*. A- tricomas tectores não glandulares (seta) em corte a mão livre sem coloração. B- representação esquemática dos tricomas não glandulares. C- ocorrência isolada de tricomas glandulares na face adaxial (seta) (Sudan IV). D- tricoma glandular do Tipo I (seta) (PAS). E- tricoma glandular do Tipo II (seta) (Azul de toluidina). F- tricoma

glandular do Tipo III, espaço subcuticular (seta) (Comassie Blue). ep aba: face abaxial da epiderme; cist: cistólito.....33

Figura 9. Representação esquemática dos diferentes tipos de tricomas glandulares encontrados em *Aloysia gratissima*. A- Tipo I. B- Tipo II. C- Tipo III. ca: célula apical; cc: célula do colar; cb: célula basal. ....34

Figura 10. Testes histoquímicos realizados em *Aloysia gratissima*; A- conteúdo do tricoma glandular Tipo I (seta) (Sudan IV). B- conteúdo do tricoma glandular Tipo III (seta) (Sudan Black). C- parede celular (Vermelho de Rutênio). D- parede celular de cistólitos e células epidérmicas (Vermelho de Rutênio). E- conteúdo de tricoma glandular Tipo I (seta) (Azul de Toluidina). F- conteúdo de tricoma glandular Tipo I (seta) (Reagente de Wagner).....37

Figura 11. Testes histoquímicos realizados em *Aloysia gratissima*. A- presença de alcaloide no conteúdo do tricoma grandular Tipo III (seta) (Reagente de Wagner). B- Reação positiva para polissacarídeos no conteúdo da célula apical doricom glandular Tipo III (seta) (PAS). C,D- Tricomas glandulares, conteúdo não identificado (seta) (cortes a mão livre sem coloração). ....38

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Testes histoquímicos realizados em <i>Aloysia gratissima</i> .....	23
Quadro 2. Testes histoquímicos realizados em folhas de <i>Aloysia gratissima</i> . Sinal (+) representa a presença do metabólito, sinal (-) representa a ausência.....	35

## LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

FAA 70% - Formaldeído, ácido acético e etanol 70%.

OMS – Organização Mundial da Saúde.

PAS – *Periodic Acid-Shiff*.

pH - Potencial de Hidrogênio.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS .....	15
2.2 ESTUDOS ANATÔMICOS EM ESPÉCIES DE VERBENACEAE .....	16
2.3 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS .....	17
2.4 SÍTIOS DE ARMAZENAMENTO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS .....	18
2.5 PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DOS VEGETAIS .....	19
2.5.1 Pectinas .....	20
2.5.2 Lipídios .....	20
2.5.3 Terpenos .....	20
2.5.4 Óleos essenciais .....	21
2.5.5 Alcaloides .....	21
2.5.6 Flavonoides .....	22
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	22
3.1 COLETA DO MATERIAL .....	22
3.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL .....	22
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
4.1 ANATOMIA DA FOLHA .....	25
4.2 TRICOMAS .....	31
4.3 TESTES HISTOQUÍMICOS .....	34
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	39
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais vem sendo adotado por inúmeras civilizações ao longo da história como alternativa de tratamento para diversas doenças. Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), cerca de 80% da população de países subdesenvolvidos depende, especialmente, das plantas para os primeiros cuidados com a saúde (ROSA *et al.*, 2011).

O Brasil é reconhecido pela maior diversidade genética vegetal do mundo (HEIZMANN; BARROS, 2007), mas além dessa riqueza biológica deve-se atentar para a socio-diversidade, há comunidades brasileiras com saberes e práticas próprias de sua cultura. Quando se trata do emprego de plantas medicinais, essas práticas culturais estão relacionadas ao acesso a recursos naturais ou falta de acesso a medicina moderna. Com a finalidade de valorizar o conhecimento tradicional e ampliar as opções de plantas para tratamentos terapêuticos, o governo federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006 (Ministério da Saúde, 2009).

Apesar da grande biodiversidade e extensa utilização da fitoterapia pela população, existe o consenso da insuficiência de estudos científicos sobre esse assunto (FERREIRA, 1998), apenas 8% das espécies vegetais do Brasil foram estudadas em busca de algum princípio ativo (HEINZMANN; BARROS, 2007). Trazendo a temática para o contexto regional, os conhecimentos de fitoterapia no Rio Grande do Sul derivam, além dos índios, também dos colonizadores europeus que procuraram, pelo método de tentativa e erro, encontrar plantas medicinais similares às por eles conhecidas em seu país de origem (MENTZ; LUTZEMBERGER; SCHENKEL, 1997).

Há pouca ou nenhuma comprovação acerca das propriedades fitoterápicas da maioria das plantas medicinais, o que pode trazer complicações ao consumidor, como a toxicidade e possíveis adulterações, ainda mais se combinadas a outras drogas, levando a um sério problema de saúde pública (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Por isso se faz necessária a correta identificação da espécie e o conhecimento acerca dos seus princípios ativos (CEOLIN *et al.*, 2009).

As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são principiantes (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005), é por isso que, para que ocorra a liberação do registro de um fitoterápico, a

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) requisita a identificação botânica, abordando as análises macro e microscópicas do vegetal, incluindo as características das estruturas anatômicas, e que seja comprovada a segurança e efetividade pela demonstração do uso da planta na literatura técnico-científica (BRASIL, 2014).

Zanetti, Manfron e Hoelzel (2004) também defendem que os parâmetros anatômicos são uma ferramenta para o controle de qualidade de fitoterápicos, pois permitem a correta identificação botânica e separação de uma determinada espécie vegetal de outras semelhantes. Os autores ainda afirmam que dentre os estudos anatômicos destacam-se os relativos à histoquímica, técnica que possibilita a localização de certos compostos bioativos com potencial terapêutico presentes na espécie vegetal. Tem-se conhecimento, ainda, de que as plantas possuem estruturas armazenadoras de óleos essenciais, reforçando a importância de realizar análises anatômicas e histoquímicas, para identificar a natureza e onde estes compostos estão armazenados (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Dentre as muitas espécies vegetais com potencial medicinal destacam-se as da família Verbenaceae (BRAGA *et al.*, 2009). Pertencente a essa família encontra-se o gênero *Aloysia*, que é constituído por cerca de 31 espécies (O'LEARY *et al.*, 2016), conhecidas por seus óleos essenciais que são extensivamente estudados no Brasil e Argentina, ainda, outro aspecto interessante do gênero é a grande diversidade de composições químicas encontradas em suas folhas (SOLER *et al.*, 1986). Compostos do óleo essencial de *Aloysia gratissima* têm sido submetidos a estudos e observou-se diferenças em seus constituintes dependendo da região de cultivo, surgindo variações nas propriedades da espécie em diferentes países (SANTOS *et al.*, 2009).

*Aloysia gratissima* é muito utilizada na medicina popular brasileira para tratar diversas enfermidades (CEOLIN *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2004). Segundo notas de Mentz, Lutzemberger e Schenkel (1997) acerca da tese de D'Ávila, publicada em 1910, sobre o levantamento da flora medicinal do Rio Grande do Sul, a espécie já era citada como planta medicinal de uso recorrente pela população no início do século XX.

A espécie que é popularmente conhecida como “alfazema-do-Brasil”, “garupá” e “erva-da-colônia”. É um arbusto com inflorescência bem conhecida pelo seu caráter aromático, que apresenta distribuição tropical e subtropical (SOARES *et al.*, 2004). No Rio Grande do Sul é utilizada para o tratamento de dores de cabeça, problemas

digestivos (SOARES *et al.*, 2004) e transtornos respiratórios, além de apresentar atividade antibacteriana (SOUZA; WIEST, 2007) e anti-inflamatória (VANDRESEN *et al.*, 2009).

Segundo Battisti *et al.* (2013) as folhas e caule de *A. gratissima* são comumente utilizadas para o consumo de chá, tanto por infusão quanto por decocção. Souza e Wiest (2007) observaram que o extrato da planta fresca apresentou maior atividade bacteriana se comparado ao extrato da planta seca, possivelmente devido à perda de princípios ativos durante o processo de secagem.

Existem algumas publicações que tratam das propriedades do óleo essencial de *A. gratissima* e poucas referentes a fisiologia da espécie (SANTOS, 2007). Zeni (2011) também afirma que seu uso popular não vem acompanhado por estudos que poderiam garantir um uso com mais qualidade e segurança. Sendo assim, surge a necessidade de investir em estudos científicos a fim de obter informações acerca de substâncias bioativas que possam ser empregadas com segurança na medicina tradicional e na produção de medicamentos (COUTINHO *et al.*, 2002).

Em *Aloysia gratissima* realizaram-se estudos anatômicos caulinares, referente à origem e desenvolvimento da periderme (BONZANI; FILIPPA; BARBOZA, 2003). Ainda, em outros representantes do gênero, foram realizados estudos em folhas e caule, onde identificou-se a organização do complexo estomático e os tipos de tricomas presentes (BONZANI; FILIPPA; BARBOZA, 1997; CALZADA-SÁNCHEZ *et al.*, 2014; GATTUSO *et al.*, 2008).

Observando a necessidade de contribuir no processo de monitoramento de qualidade de potenciais fitoterápicos, o presente trabalho objetiva descrever a estrutura anatômica de folhas de *A. gratissima*, assim como serão realizados testes histoquímicos com a finalidade de apurar substâncias produzidas pela planta que possuem algum potencial fitoterápico, tudo isso será relacionado a trabalhos existentes na literatura.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS

Verbenaceae é uma família monofilética, pertencente à ordem Lamiales, e que possui distribuição cosmopolita (FLORA DO BRASIL, 2019). Na família inclui-se aproximadamente 36 gêneros e 1000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2012). No Brasil ocorrem 16 gêneros e 285 espécies, do gênero *Aloysia* são encontradas 10 espécies no país (FLORA DO BRASIL, 2019).

De acordo com O'Leary *et al.* (2016, tradução nossa) “o gênero *Aloysia* compreende cerca de 31 espécies distribuídas pelas Américas, isso de acordo com a nova circunscrição onde houve a inclusão da maioria das espécies de *Acantholippia* e de *Xeroaloyisia*, assim como a exclusão de várias espécies norte-americanas que se inseriram nos gêneros *Lippia* e *Lantana*”. 28 espécies do gênero são encontradas na América do Sul. *Aloysia gratissima* é a única espécie do gênero que é encontrada nas Américas do Norte e do Sul (O'LEARY *et al.*, 2016). No Rio Grande do Sul, estão presentes quatro tribos de Verbenaceae, Citharexyleae, Lantaneae, Verbeneae e Petreae. A tribo Lantaneae agrupa os gêneros *Aloysia*, *Bouchea*, *Lantana*, *Lippia*, *Phyla* e *Stachytarpheta* (CRESPAM, 2010).

*Aloysia gratissima* é uma espécie nativa do Brasil e muito utilizada com finalidade fitoterápica, é conhecida popularmente como “alfazema-do-Brasil”, “garupá”, “erva-da-colônia” (SOARES *et al.*, 2004), “erva de nossa senhora”, “erva da graça” (ALICE *et al.*, 1995) e “erva santa” (CASTRO; CHEMALE, 1995). Sua distribuição no Brasil ocorre no Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, e apresenta como sinônimos *Aloysia meyeri*, *Aloysia schulziana*, *Aloysia sellowii* e *Aloysia uruguayensis* (FLORA DO BRASIL, 2019). Além de medicinal, a planta é considerada ornamental e melífera por sua floração intensa e aroma agradável (CARDOSO, 2005).

Castro e Chemale (1995) descrevem que *Aloysia gratissima* “é uma planta perene, arbustiva, com altura de 1,5 a 3,0 metros, caule ereto, longo e fino, de casca áspera, acinzentada ou verde oliva. As folhas são simples, opostas, elíptico-lanceoladas. Suas flores são pequenas, hermafroditas, muito perfumadas e o florescimento ocorre de agosto a fevereiro quando apresenta pequenas flores brancas.” (Figura 1). Tais características também foram reforçadas por Flora do Brasil (2019) e acrescentadas venações foliares broquidódromas.

Figura 1. Aspecto geral da planta de *Aloysia gratissima*.



Fonte: Machado, 2018.

## 2.2 ESTUDOS ANATÔMICOS EM ESPÉCIES DE VERBENACEAE

Verbenaceae possui diversos representantes de importância na produção de compostos com potencial aromático e medicinal, e por esse motivo realizaram-se estudos anatômicos nesses representantes a fim de exercer um controle de qualidade mais adequado (BONZANI; FILIPPA; BARBOZA, 1997). Entre as Verbenaceae de reconhecido valor medicinal destacam-se os gêneros *Aloysia*, *Lantana*, *Lippia* e *Verbena* (FAVORITO, 2009).

As particularidades anatômicas se estabelecem como uma ferramenta eficaz para a verificação da identidade das plantas de potencial medicinal, servindo de controle de qualidade botânico (BONZANI; FILIPPA; BARBOZA, 2003).

Bonzani, Filippa e Barboza (1997) comprovaram, através de observações da anatomia de folhas e caules que em representantes dos gêneros *Aloysia*, *Lantana* e *Lippia*, há uma organização variada do complexo estomático. Calzada-Sánchez *et al.*

(2014) também identificaram os tipos de tricomas presentes em espécies de *Aloysia*, *Lantana*, *Lippia* e *Verbena*.

As folhas de espécies do gênero *Lippia* também foram analisadas perante aspectos anatômicos por Argyropoulou *et al.* (2010) e por Favorito (2009), que determinaram a presença e tipos de tricomas glandulares. O gênero *Verbena* também foi objeto de estudo de Arrambari *et al.* (2013), que verificaram as hastes de *Verbena litoralis* e *V. montevidensis* e detectaram amido nas células-guarda dos estômatos, no parênquima cortical e na endoderme. Folhas e caules de *Aloysia citriodora* foram estudadas por Gattuso *et al.* (2008) e observadas a organização dos estômatos e tipos de tricomas presente nas espécies.

Em *Aloysia gratissima* realizaram-se estudos anatômicos caulinares, referente à origem e desenvolvimento da periderme (BONZANI; FILIPPA; BARBOZA, 2003), descreveu-se brevemente os tipos de tricomas secretores e determinou-se que a espécie apresenta características xerofíticas e estômatos elevados protegidos por tricomas. Arambari *et al.* (2006) também analisaram as folhas de *A. gratissima*, entre outras espécies de Verbenaceae, e verificaram a presença de cristólitos na face adaxial da epiderme associados à tricomas não glandulares.

### 2.3 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS EM VERBENACEAE

Diversos estudos farmacológicos foram realizados com representantes de Verbenaceae. No que se refere ao o gênero *Aloysia*, Zeni (2011) investigou o extrato aquoso de *Aloysia gratissima* como possível agente terapêutico. A autora demonstrou que o extrato da espécie apresentou substâncias conhecidas como antioxidantes, além de ser um promissor agente terapêutico em doenças neurológicas/neurodegenerativas que envolvem excitotoxicidade. Vandresen *et al.* (2009) isolaram e identificaram 12 substâncias das folhas de *A. gratissima* comprovando sua atividade anti-inflamatória, antiedematogênica e antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*.

Souza e Wiest (2007), por meio dos extratos alcoólico, hidroalcoólico e decocto, observaram uma maior atividade antibacteriana de *A. gratissima* para as bactérias *Rhodococcus equi* e *Pasteurella multocida*, ambas relacionadas a casos de pneumonia e outros quadros respiratórios. Ainda quanto à atividade antibacteriana da espécie, em outro estudo demonstrou-se que o óleo essencial da flor de *A. gratissima*

foi mais eficaz do que o da folha frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, principal causadora de pneumonia e meningite em humanos, e *Candida albicans* (SANTOS *et al.*, 2013).

Também houve outros estudos em *A. gratissima* relacionados a atividade antibacteriana, que foi comprovada por Cáceres *et al.* (1993), além da atividade sedativa (BENOVIT, 2012), antioxidante (ROSAS-ROMERO; SAAVEDRA, 2005) e ação fungitóxica (PINTO *et al.*, 2007).

Em outros representantes de Verbenaceae também foram realizados estudos farmacológicos, como, por exemplo, no gênero *Lantana*, onde observou-se, por meio da análise de seu óleo essencial, que algumas de suas espécies inibiram o crescimento de bactérias e fungos (MONTANARI, 2011). Ainda, há registros de estudos realizados com o gênero *Lippia*, onde foram identificadas substâncias de potencial citotóxico e antimicrobiano (LIMA *et al.*, 2019).

## 2.4 SÍTIOS DE ARMAZENAMENTO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

As plantas produzem variados tipos de secreções, sendo algumas apenas soluções constituídas de sais, aminoácidos e açúcares, e outras podendo ser compostas por metabolitos primários e secundários, sendo que muitos destes compostos são substâncias biologicamente ativas (ASCENÇÃO, 2000). Ainda segundo Ascensão (2000), “as secreções vegetais são sintetizadas ou simplesmente acumuladas e eliminadas em células especializadas, que ocorrem isoladas (idioblastos secretores) ou que constituem estruturas glandulares altamente diferenciadas”. Os idioblastos são células que contêm mucilagens ou resinas, constituídas de polissacarídeos, e óleos essenciais, e a identificação correta desses tipos de substâncias secretadas é feita através de testes histoquímicos (ASCENÇÃO, 2000).

Os tricomas, que são apêndices epidérmicos, possuem diversas morfologias, podendo ser classificados de muitas maneiras, a classificação mais simples consistindo em tectores ou não-glandulares e glandulares (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

Há uma enorme variedade de tricomas glandulares, quanto à forma, número de células e função, tornando difícil sua classificação. “O método de classificação mais

adequado é o teste histoquímico para que seja identificado os tipos de produtos secretados ou absorvidos” (ASCENÇÃO, 2000).

A produção e a secreção de óleos essenciais e resinas por tricomas glandulares é característica de diversas famílias, entre elas, de Verbenaceae (FAVORITO, 2009). Souza e Lorenzi (2012) também afirmam que as espécies de Verbenaceae apresentam um grande número de tricomas glandulares, que são os principais sítios de formação e acúmulo de metabólitos, característica de plantas de uso medicinal.

## 2.5 PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DOS VEGETAIS

Brandelli e Vieira (2017) definem uma substância bioativa como um composto que pode interagir com células ou tecidos vivos e resultar em os mais variados efeitos. Ainda, segundo os autores, “o termo “substâncias bioativas” está sendo bastante usado para descrever compostos encontrados em vegetais, frutas e hortaliças que protegem o organismo e melhoram a qualidade de vida. Esses compostos são substâncias não essenciais para o organismo, porém, se ingeridos, podem prevenir doenças” (BRANDELLI; VIEIRA, 2017).

Estas substâncias não apresentam ligação direta com o crescimento e o desenvolvimento vegetal, mas participam de funções importantes à sua sobrevivência, como, por exemplo, a atração de polinizadores e dispersores e a defesa contra herbívoros e patógenos (LOPES; KATO; COSTA, 2017).

Quando a planta possui constituintes bioativos e está presente nas farmacopeias, adquire o *status* de “medicinal”, podendo ser usada para tratamentos terapêuticos (CUNHA *et al.*, 2017).

Os compostos bioativos obtidos de material vegetal possuem muitas atividades biológicas e podem pertencer ao metabolismo primário, funcionalmente essencial à vida, e ao metabolismo secundário, que produz substâncias que não são necessariamente vitais ao organismo produtor (BRANDELLI, 2017). As pectinas e os lipídios são alguns exemplos de substâncias do metabolismo primário, quanto ao metabolismo secundário há os terpenos, óleos essenciais, alcaloides, flavonoides, entre outros.

### 2.5.1 Pectinas

As pectinas são componentes da parede celular vegetal, presentes em diferentes partes do vegetal, tendo maiores concentrações nas cascas de frutas cítricas. Em solução aquosa apresentam a capacidade de produzir soluções viscosas, utilizadas na indústria farmacêutica como excipiente na liberação de fármacos (SEYFRIED *et al.*, 2016).

As pectinas são muito utilizadas como regularizadoras do sistema gastrointestinal, têm ação sobre o controle da glicemia, da elevação patológica do colesterol e na prevenção de doenças cardiovasculares (CUNHA *et al.*, 2017).

### 2.5.2 Lipídios

Os lipídios destacam-se a ação pro vitamínica D e a capacidade de ligação a receptores hormonais humanos, podendo ser utilizados como alternativa à terapia hormonal de substituição, também apresentam caráter anfotérico e poder reativo, apresentando interesse biológico (CUNHA *et al.*, 2017).

Geralmente, no vegetal, os lipídios encontram-se sob a forma de gotículas dispersas no citoplasma. As ceras e as cutículas são ricas em compostos lipídicos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

### 2.5.3 Terpenos

Os terpenos podem ser classificados em Monoterpenos e Sesquiterpenos, ambos denominados “óleos essenciais”, que apresentam ação antibacteriana e antifúngica, em Diterpenos e em Triterpenoides, este último conhecido por ser precursor de hormônios esteroides em mamíferos, plantas e insetos (BRANDELLI, 2017).

Segundo Figueiredo *et al.* (2007), “os terpenoides acumulam-se preferencialmente em estruturas glandulares especializadas (tricomas, idioblastos, canais, bolsas e laticíferos)”.

#### 2.5.4 Óleos essenciais

Os monoterpenos, devido a seu baixo peso molecular, são substâncias voláteis, sendo denominados “óleos essenciais” (BRANDELLI, 2017). Os óleos essenciais possuem um odor característico e apresentam muitas funções à planta, como, por exemplo, comunicação química com outras espécies vegetais, meio de defesa contra animais (atividade inseticida), inibidores de germinação e crescimento de outras plantas, antimicrobianos e atrativos a polinizadores (MELO; CROTTI, 2017). Segundo Melo e Crotti (2017), “a produção desses óleos ocorre em estruturas de secreção especializadas, podendo permanecer armazenados em vários órgãos da planta, como folhas, flores, caules, raízes, frutos e sementes”.

Melo e Crotti (2017) também descrevem que os óleos essenciais possuem ação antinociceptiva, impedindo a transmissão de impulsos dolorosos, o que alivia a sensação de dor, ação anti-inflamatória, ação antiparasitária, tendo como exemplo na literatura a atividade no combate a Leishmaniose, Esquistossomose, Giardíase e Tricomoníase, ação antibacteriana e antifúngica, ação antioxidante e, ainda, ação citotóxica, utilizada no tratamento contra tumores desde a década de 1990.

#### 2.5.5 Alcaloides

Esses compostos são dotados de importante atividade farmacológica, mas também apresentam elevada toxicidade. Podem, portanto, ter diversas ações em um organismo, tais como as funções colinérgica, vasodilatadora, analgésica e ansiolítica, antiarrítmica, estimulante, psicotrópica, amebicida, anestésica local, diurética, antitumoral e antifibrilantes. (CUNHA *et al.*, 2017).

No vegetal, os alcaloides, atuam na defesa contra organismos patogênicos e contra herbívoros (LOPES; KATO; COSTA, 2017). Segundo Figueiredo *et al.* (2007), “os alcaloides acumulam-se nos vacúolos, particularmente em células epidérmicas e hipodérmicas e laticíferos. Muitas vezes acumulam-se longe do local de síntese.”

### 2.5.6 Flavonoides

Os flavonoides estão amplamente distribuídos nas plantas e podem estar localizados nos vacúolos ou na cera cuticular (FIGUEIREDO et al., 2007).

Esses compostos demonstram ação anti-inflamatória, hormonal, anti-hemorrágica, antialérgica, antifúngica, auxiliam na absorção da vitamina C e possuem propriedades tanantes (BRANDELLI; VIEIRA, 2017). Também apresentam atividade antioxidante e contribuem para “proteger as células de danos provocados por radicais livres que podem levar a doenças graves, como câncer, mal de Alzheimer, doença de Parkinson e outras.” (HIRUMA-LIMA et al., 2017). Além disso, esses compostos podem apresentar um aspecto toxicológico que diz respeito à ação mutagênica (CUNHA et al., 2017).

Uma outra função aparece em algumas isoflavonas que têm efeito estrogênico por apresentarem semelhança estrutural com os hormônios estrogênicos (HIRUMA-LIMA et al., 2017), sendo assim conhecidas por sua ação no alívio de sintomas causados pela menopausa, melhorando a saúde dos ossos e reduzindo o risco de câncer de mama. (BRANDELLI; VIEIRA, 2017).

## 3 METODOLOGIA

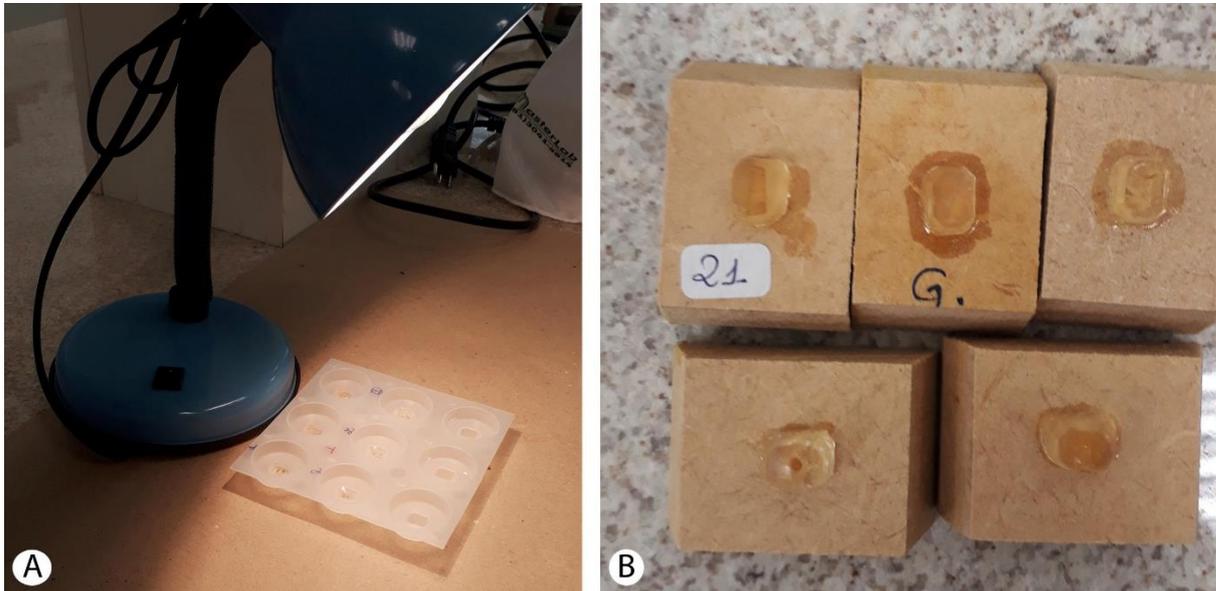
### 3.1 COLETA DO MATERIAL

Para a coleta das folhas de *Aloysia gratissima* foram realizadas excursões a campo em locais com populações da espécie nos municípios de Cerro Largo (-28.141662, -54.733772), São Paulo das Missões (28°02'50.6"S 54°55'18.2"W) e Guarani das Missões (28°08'04.4"S 54°36'18.8"W).

### 3.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Após a coleta, as amostras das folhas foram fixadas em Formaldeído, Ácido acético e etanol 70% (FAA 70%) (JOHANSEN, 1940) e em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% (MCDOWELL; TRUMP, 1976), em tampão fosfato de sódio, 0,1M e pH 7,2, desidratado em série etílica e incluído em hidroxietilmetacrilato (historresina) (GERRITS; SMID, 1983) (Figura 1a,b).

Figura 2. A- inclusão com historresina. B- material vegetal incluído aderido em bloco de madeira.



Após a inclusão do material, as amostras foram seccionadas (5-10  $\mu\text{m}$ ) no plano transversal em micrótomo e posteriormente confeccionadas lâminas permanentes, utilizando como meio de montagem resina sintética. Como corante de rotina foi utilizado Azul de Toluidina (O'BRIEN; MCCULLY, 1981). Para o estudo da arquitetura foliar, as folhas foram diafanizadas de acordo com Fuchs (1963).

Para os testes histoquímicos foram realizadas seções transversais do material vegetal obtidas a mão livre em material embebido em determinados reagentes para identificação de diferentes constituintes celulares, conforme descritos na quadro 1.

Quadro 1. Testes histoquímicos realizados em *Aloysia gratissima*.

Compostos alvo	Reagente
Pectinas	Vermelho de Rutenio (Johansen 1940)
Lipídios Totais	Sudan IV (Johansen, 1940); Sudan Black (Pearse, 1980)
Mucilagens e Pectinas	Azul de Toluidina (Feder e O'Brien, 1968)
Alcaloides	Reagente de Wagner (Furr; Mahlberg, 1981)
Proteínas	Comassie Blue (Fischer, 1968)
Polissacarídeos	PAS (McManus, 1948)

As análises e captura das imagens foram realizadas com microscópio ótico (Olympus CX31), com câmera digital acoplada, e com estereomicroscópio (Digilab DI-152T).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANATOMIA DA FOLHA

A análise da arquitetura foliar de *Aloysia gratissima* mostra venações pinadas, camptódromas, broquidódromas, onde as nervuras secundárias terminam antes da margem foliar e se unem em arcos (HICKEY, 1973) (Figura 3a, 3b), assim como observado para *Aloysia citrodora* Palau por Gattuso *et al.* (2008). Em vista frontal, as células epidérmicas da face adaxial mostram paredes anticlinais retas (Figura 4b, 4c), característica também descrita para *A. citrodora* (GATTUSO *et al.*, 2008), e apresentam tricomas tectores não glandulares unicelulares do tipo gancho, cada um resultante de cystólitos na base (Figura 4a - 4c). Na face abaxial, em vista frontal, é possível observar uma grande densidade de tricomas não glandulares e glandulares.

Figura 3. Vista frontal da lâmina foliar de *Aloysia gratissima*. A- vista do padrão de nervação em estereomicroscópio. B- representação esquemática do padrão de nervação.

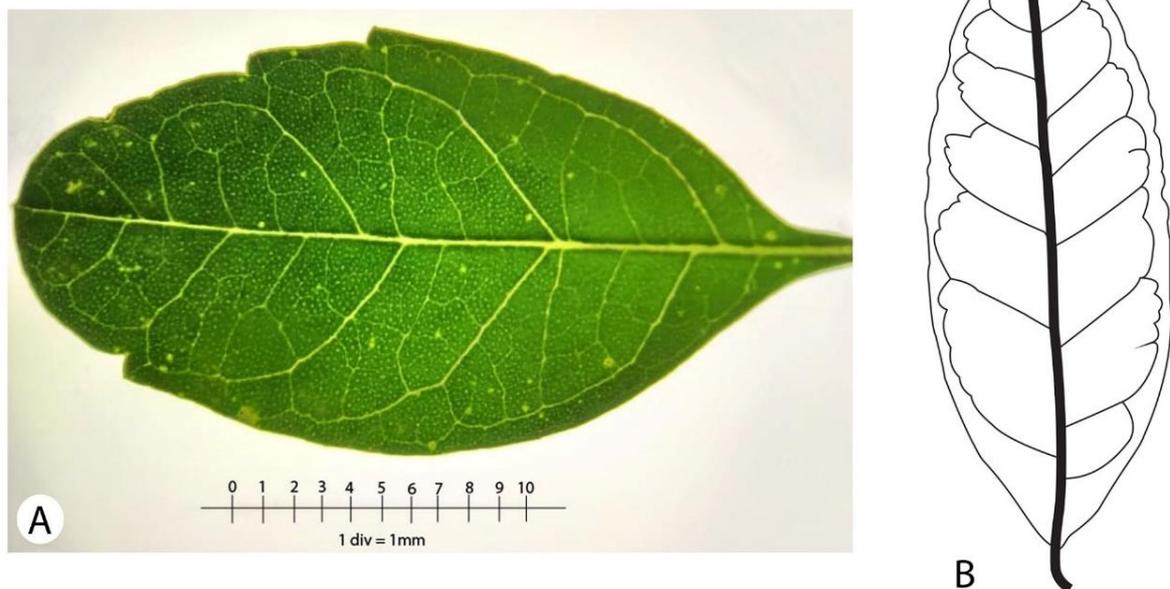
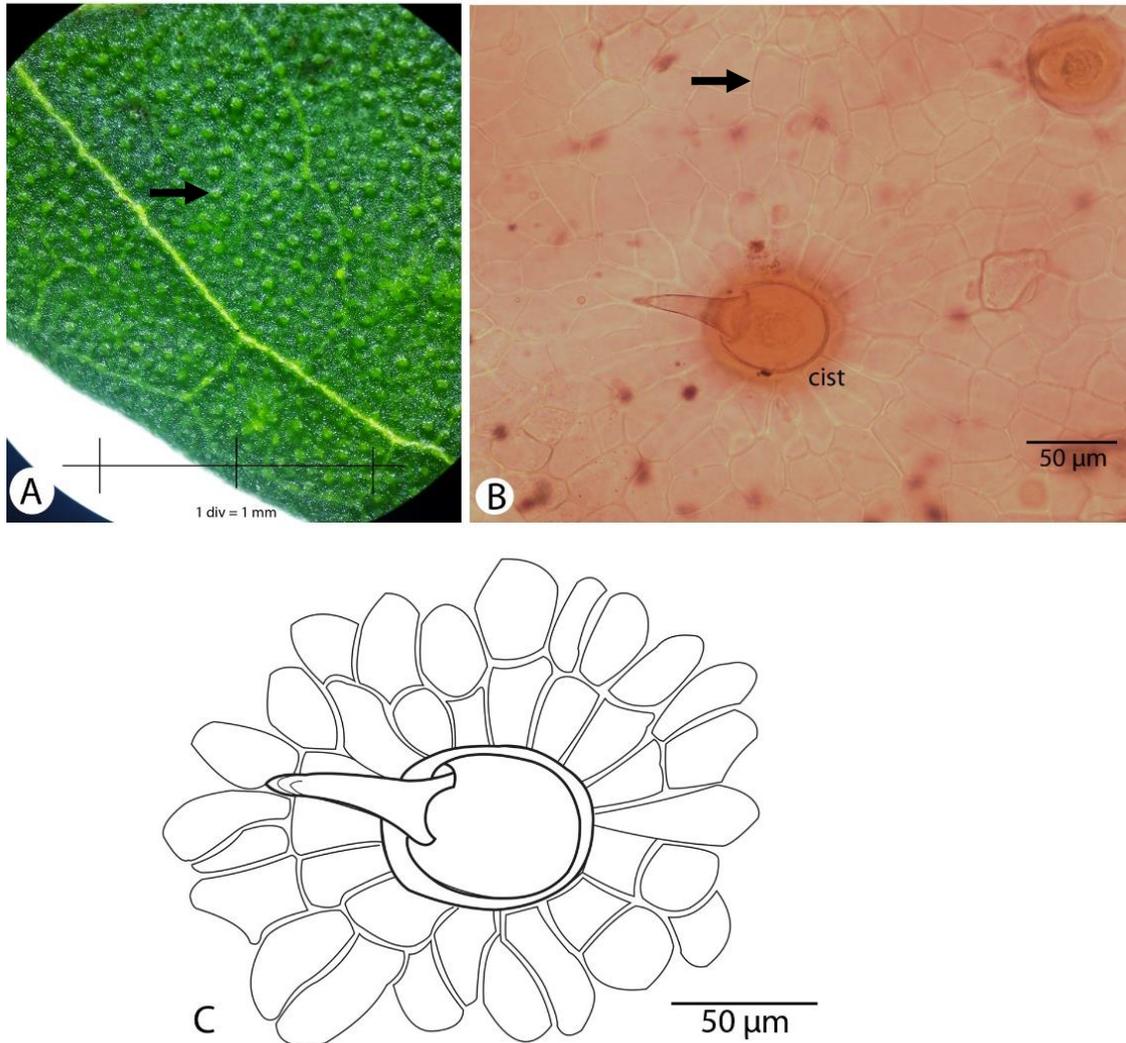


Figura 4. Vista frontal da face adaxial da lâmina foliar de *Aloysia gratissima*. A- distribuição dos tricomas em estereomicroscópio (seta). B- detalhe dos tricomas ligados aos cystólitos em microscópio ótico (diafanização) e células epidérmicas com paredes anticlinais retas (seta). C- representação esquemática do tricoma.



A análise da epiderme foliar de *A. gratissima* revela, em corte transversal, duas camadas de células epidérmicas, com cutícula estriada na parede pericinal externa (Figura 5a, 5b). A presença de cutícula estriada foi observada por Morcelle, Gattuso e Apostolo (2012) para algumas espécies de *Verbena* L. Observou-se, ainda, um espessamento da parede celular das células epidérmicas na borda foliar (Figura 5a, 5c). O limbo das espécies de Verbenaceae pode variar de dorsiventral a isobilateral (FAVORITO, 2009). O mesófilo de *A. gratissima* é dorsiventral (Figura 5d), assim como observado por Pinto *et al.* (2007), e em outras espécies de Verbenaceae, como *Boulchea fluminensis* (Vell.) Moldenke (MILANEZE-GUTIERRE; MELLO; DELAPORTE, 2003), *Aloysia citriodora* (GATTUSO *et al.*, 2008; LUCHIAN *et al.*,

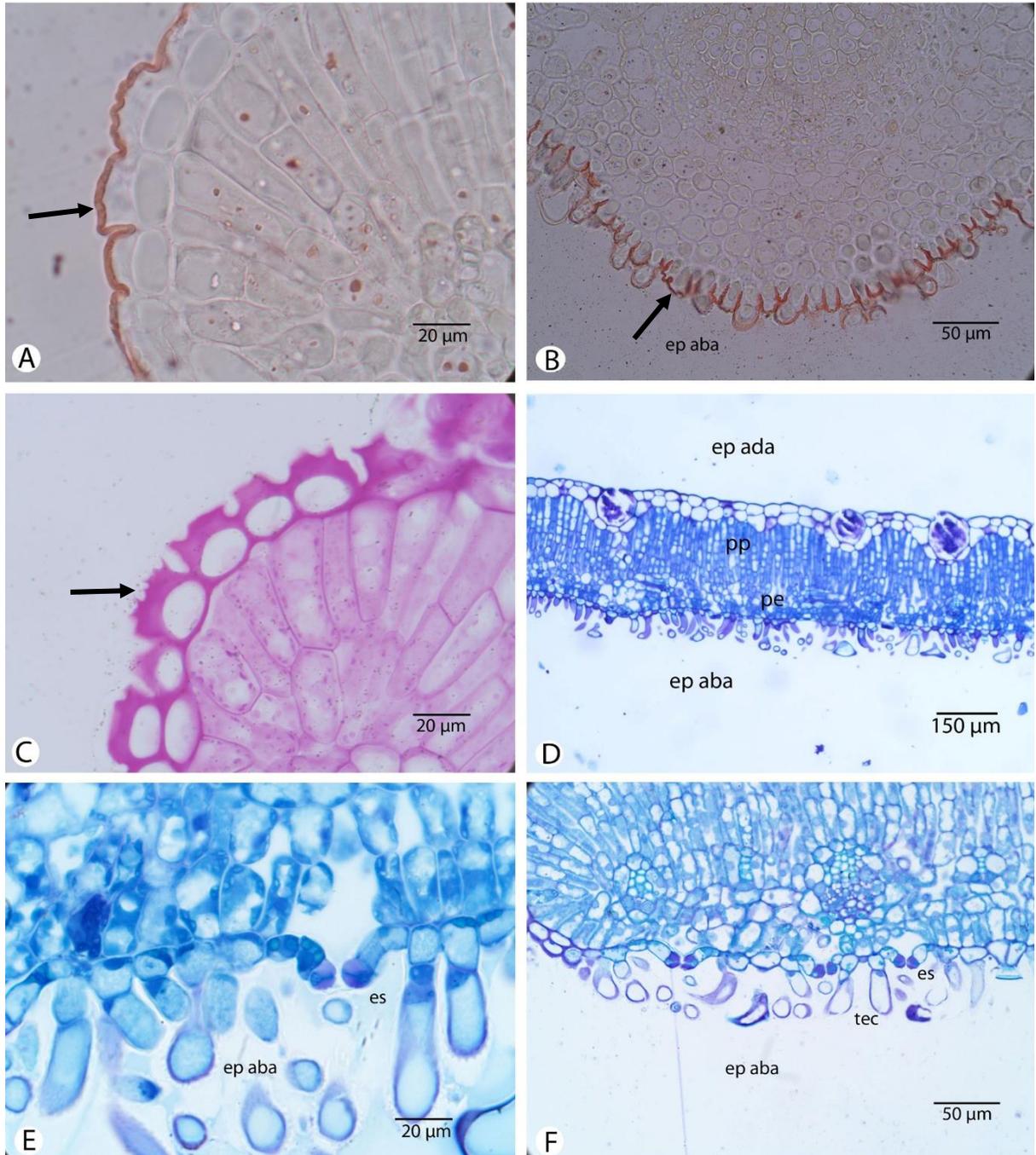
2018), *Lantana camara* L. e *Lantana radula* Sw. (PASSOS; MEIRA; BARBOSA, 2009). Pode-se observar que o mesofilo apresenta 3-4 camadas de parênquima paliçádico na face adaxial e 3-4 camadas de parênquima esponjoso na face abaxial (Figura 5d), assim como relatado para *Verbena litoralis* Kunth (MUNSIF *et al.*, 2007).

Os estômatos parecem estar restritos à face abaxial da epiderme, sendo a folha classificada como hipoestomática, e se encontram elevados em relação as demais células epidérmicas (Figura 5e), características também descritas para *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton (CALZADA-SANCHÉZ *et al.*, 2014), *Aloysia citriodora* (GATTUSO *et al.*, 2008) e *Lantana fucata* Lindl. (ALBA, 2016). Bonzani *et al.* (1997) ainda verificou que *A. gratissima* apresenta estômatos elevados por colunas isodiamétricas, estruturas resultantes de invaginações epidérmicas que elevam consideravelmente os estômatos sobre a superfície, e amplas câmaras subestomáticas, indicando uma possível função secretora. Características não verificadas no presente estudo.

A posição dos estômatos normalmente está relacionada ao ambiente, estômatos elevados ficam expostos às condições ambientais, aumentando a perda de água (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006), supondo, então, que a planta vive sob ótimas condições hídricas. Porém analisou-se que os estômatos estão protegidos por tricomas tectores não glandulares (Figura 5f), o que, segundo Bonzani *et al.* (2003), representa uma forte característica xerofítica, juntamente com as folhas reduzidas e seu caráter caducifólio.

Metcalf e Chalk (1988) afirmam que os estômatos da família Verbenaceae podem ser anomocíticos, paracíticos, anisocíticos e diacíticos. Neste trabalho não foi possível dissociar a epiderme para a observação do tipo de complexo estomático devido a densidade de tricomas tectores e glandulares presentes na face abaxial da epiderme da folha.

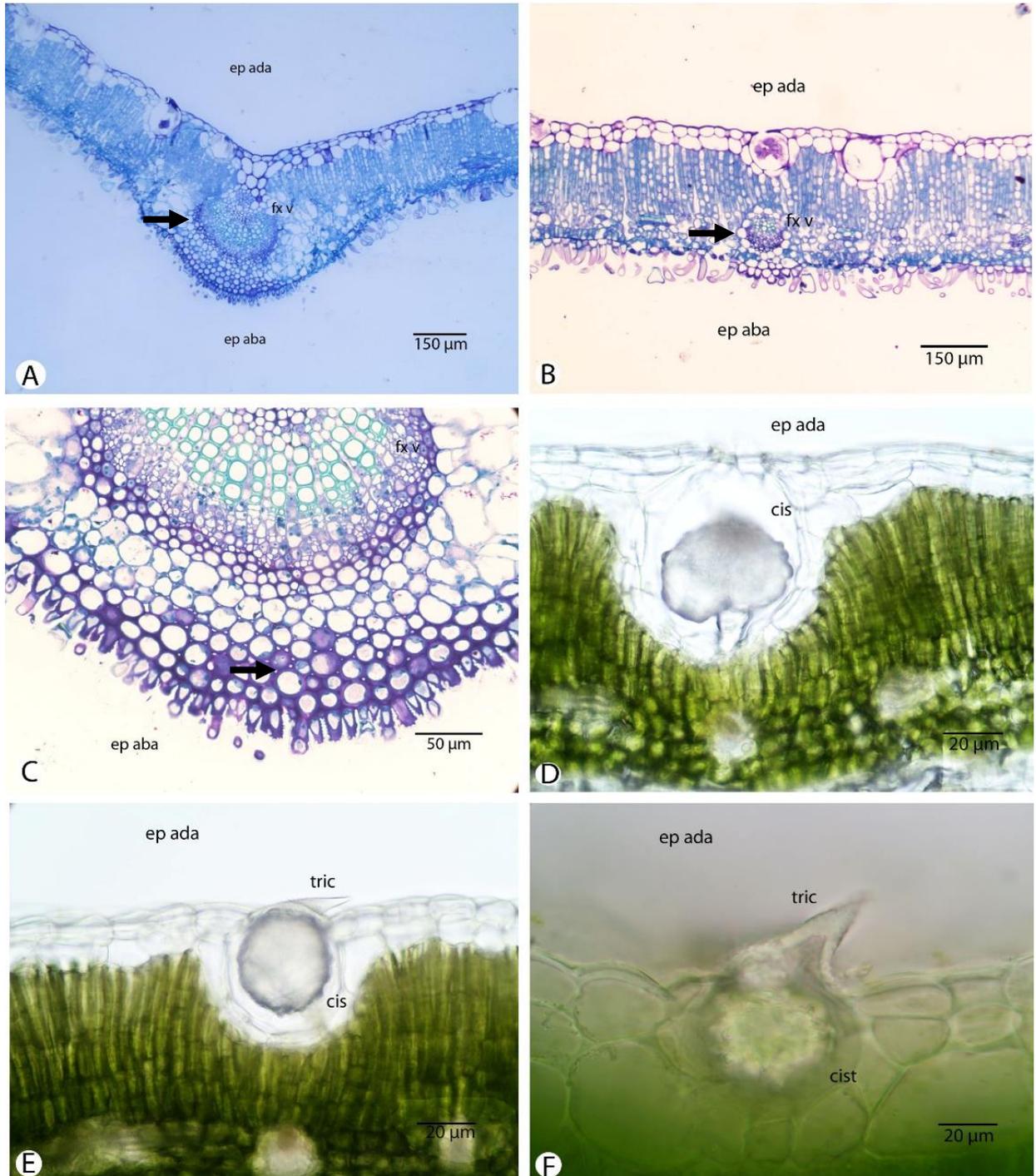
Figura 5. Cortes transversais da folha de *Aloysia gratissima*. A- células epidérmicas da borda da folha com parede espessa e cutícula estriada (seta) (Sudan IV). B- cutícula estriada (seta) (Sudan IV). C- borda foliar com espessamento de parede celular epidérmica (PAS). D- mesofilo dorsiventral. E- estômatos elevados. F- estômatos protegidos por tricomas. ep aba: face abaxial da epiderme; ep ada: face adaxial da epiderme; pp: parênquima paliçádico; pe: parênquima esponjoso; es: estômato; tec: tricoma tector não glandular.



Na região central da folha observa-se que o feixe vascular mediano é colateral e proeminente na face abaxial, organizado em formato de arco aberto (Figura 6a). A mesma organização foi encontrada em outros representantes da família, como em *Boulchea fluminensis* (MILANEZE-GUTIERRE; MELLO; DELAPORTE, 2003), *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson (VENTRELLA, 2000), *Lantana camara* e *Lantana radula* (PASSOS; MEIRA; BARBOSA, 2009). Os feixes de menor calibre também estão voltados para a face abaxial (Figura 6b). A proeminência do feixe vascular mediano em direção a face abaxial está relacionada a presença de colênquima do tipo anelar nesta face, conforme também documentado por Arambarri *et al.* (2006) para *A. gratissima* (Figura 6c).

Como já relatado, na face adaxial da epiderme é possível observar idioblastos epidérmicos de carbonato de cálcio, conhecidos como cistólitos (Figura 6d). Esses cistólitos vêm associados à tricomas gancho não glandulares (Figura 6e, 6f; 4b, 4c), que, segundo Arambarri *et al.* (2006), é uma característica diagnóstica para *Aloysia gratissima*, pois é um caráter restrito a um limitado número de espécies e famílias. Alguns autores sugerem uma possível relação entre os cistólitos e a fotossíntese, o que pode interferir no fornecimento de CO<sub>2</sub>, ou que os cistólitos podem ser produtos de um processo de desintoxicação vegetal (SETOGUCHI; OKAZAKI; SUGA, 1989).

Figura 6. Cortes transversais da folha de *Aloysia gratissima*. A- feixe vascular mediano em formato de arco aberto (seta). B- feixes de menor calibre voltados para face abaxial (seta). C- detalhe do feixe vascular mediano, evidenciando o colênquima anelar (seta). D- detalhe do cristólito de carbonato de cálcio. E,F- tricomas gancho associados aos cristólitos. ep aba: face abaxial da epiderme; ep ada: face adaxial da epiderme; fx v: feixe vascular; cis: cristólito; tric: tricoma gancho não glandular.

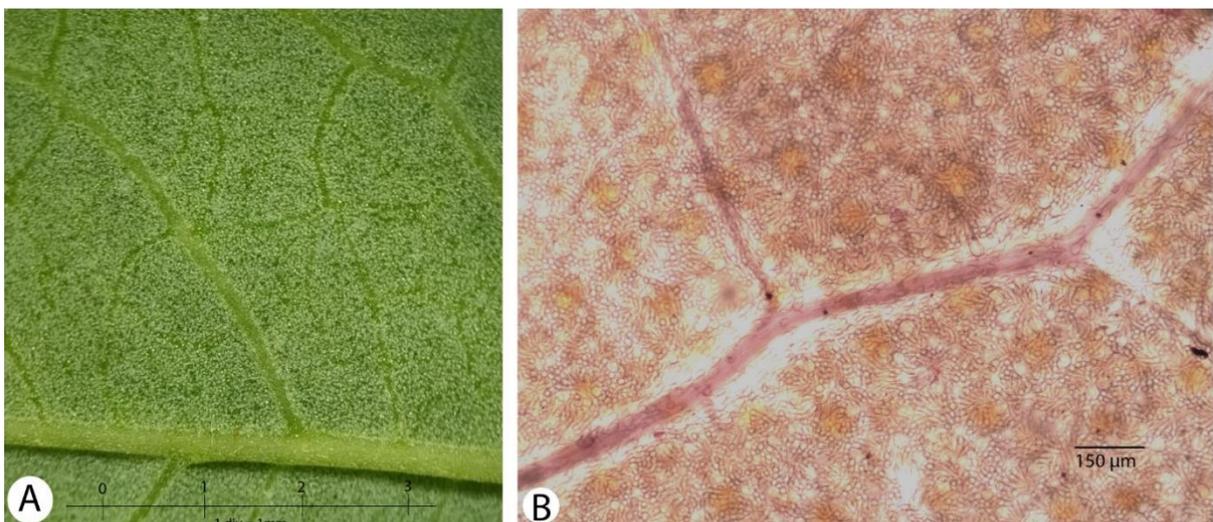


## 4.2 TRICOMAS

Os tricomas são apêndices epidérmicos muito variáveis quanto as formas e funções (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006). Sendo que a caracterização micromorfológica dos tricomas glandulares e algumas substâncias por eles produzidas têm valor taxonômico importante para a correta identificação das espécies (ASCENÇÃO, 2007). A presença de tricomas não glandulares e glandulares é comum na família Verbenaceae (FAVORITO, 2009).

*Aloysia gratissima* apresenta tricomas tectores não glandulares unicelulares que se distribuem ao longo de toda a extensão da face abaxial da epiderme (Figura 7a, 7b). Os tricomas são levemente elevados e possuem parede celular verrucosa e ápice agudo (Figura 8a, 8b). Os mesmos tricomas foram encontrados por Bonzani *et al.* (1997) em *A. gratissima*, que foram classificados como Tipo A, e por Santos (2003) em *Lippia alba*. Diferentemente dos tricomas glandulares, considera-se que os tricomas não glandulares não participam da produção, estocagem e/ou liberação de compostos químicos com atividades biológicas, sendo conhecidos pela sua função na proteção contra estresse abiótico ou biótico (WERKER, 2000). Apesar disso Tozin, Silva e Rodrigues (2016) detectaram, por testes histoquímicos, diferentes compostos nos tricomas não glandulares de espécies de Lamiaceae e Verbenaceae, alguns como proteínas, alcaloides, lipídios e proteínas, o que evidencia também sua atividade no processo secretor.

Figura 7. Vista frontal da lâmina foliar de *Aloysia gratissima*. A- vista da face abaxial da epiderme em estereomicroscópio exibindo a densidade de tricomas. B- vista da face abaxial da epiderme em microscópio óptico (diafanização).



Em *A. gratissima* os tricomas glandulares estão, de forma majoritária, distribuídos na face abaxial da epiderme, sua ocorrência na face adaxial é de forma isolada (Figura 8c). São multicelulares e foram classificados em três morfotipos de acordo com o formato da célula apical. Tipo I com a célula apical com formato trapezoidal (Figura 8d; 9a), Tipo II com a célula apical com forma clavada (Figura 8e; 9b) e Tipo III com a célula apical com forma globosa (Figura 8f; 9c). Os tricomas glandulares do tipo III de *A. gratissima* são compostos por uma célula basal, ao mesmo nível das demais células epidérmicas, uma célula do colar e a célula apical globosa unicelular, que é secretora, e são similares aos tricomas do Tipo II descrito por Favorito (2009) para *Lippia stachyoides*, e aos do Tipo C descritos por Argyropoulou *et al.* (2010) para *Lippia citriodora*. A mesma estrutura foi encontrada nos tricomas glandulares trapezoidais e clavados, uma célula basal, constituindo parte da epiderme, uma célula colar e a cabeça secretora unicelular em formato de trapézio ou clava, ambos semelhantes aos encontrados em *Aloysia citriodora* por Gattuso *et al.* (2008). Os tricomas do Tipo I também se assemelham aos tricomas glandulares classificados como subsésseis por Abu-Asab e Cantino (1987) encontrados em diversos representantes de Lamiaceae.

Metcalfe e Chalk (1988) afirmam que os tricomas glandulares da família Verbenaceae podem ser classificados em dois tipos, capitados ou peltados, identificando o tricoma capitado como todo tricoma em que o pedicelo é maior que a metade da altura da cabeça. Em tricomas peltados é observado uma haste curta e cabeça multicelular em formato de disco (FAVORITO, 2009). Como nenhum dos tricomas glandulares encontrados neste trabalho se enquadram em tais características, não se adotou este método de classificação.

Há também, nos tricomas glandulares, um amplo espaço subcuticular (8f), no qual a secreção é acumulada. A eliminação dessa secreção pode ocorrer pela ruptura da cutícula ou por meio de poros cuticulares (FAVORITO, 2009; ASCENÇÃO, 2007). Acredita-se que a ruptura da cutícula possa ser um processo espontâneo, influenciado pela pressão da secreção, ou possa ter relação com fatores bióticos, como a presença de predadores, e abióticos, como temperatura e umidade (ASCENÇÃO *et al.*, 1999).

Os tricomas glandulares estão envolvidos com a secreção de diversas substâncias (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006). Verificou-se a presença de algumas delas por meio dos testes histoquímicos.

Figura 8. Tricomas glandulares e não glandulares da folha de *Aloysia gratissima*. A- tricomas tectores não glandulares (seta) em corte a mão livre sem coloração. B- representação esquemática dos tricomas não glandulares. C- ocorrência isolada de tricomas glandulares na face adaxial (seta) (Sudan IV). D- tricoma glandular do Tipo I (seta) (PAS). E- tricoma glandular do Tipo II (seta) (Azul de toluidina). F- tricoma glandular do Tipo III, espaço subcuticular (seta) (Comassie Blue). ep aba: face abaxial da epiderme; cist: cistólito.

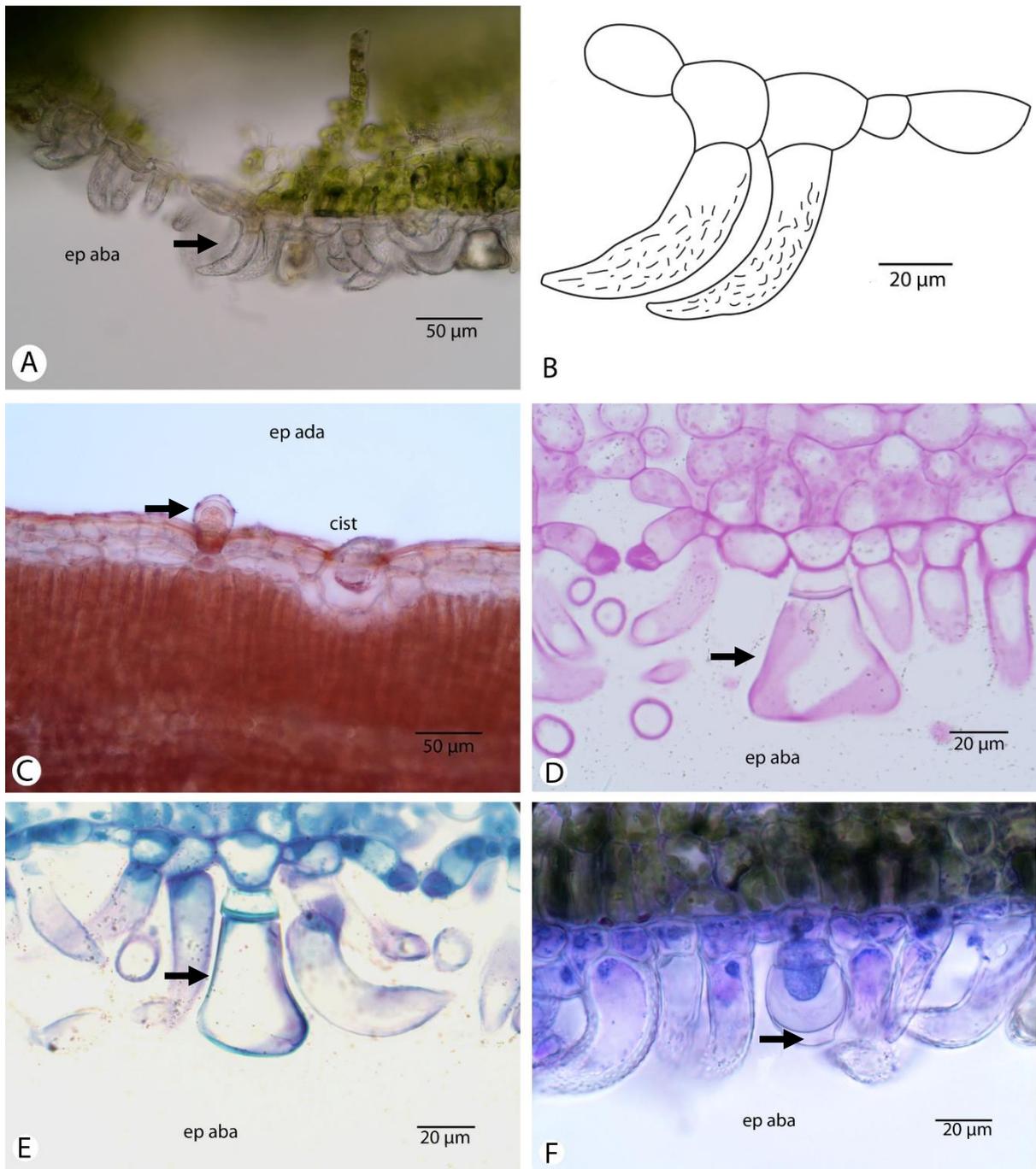
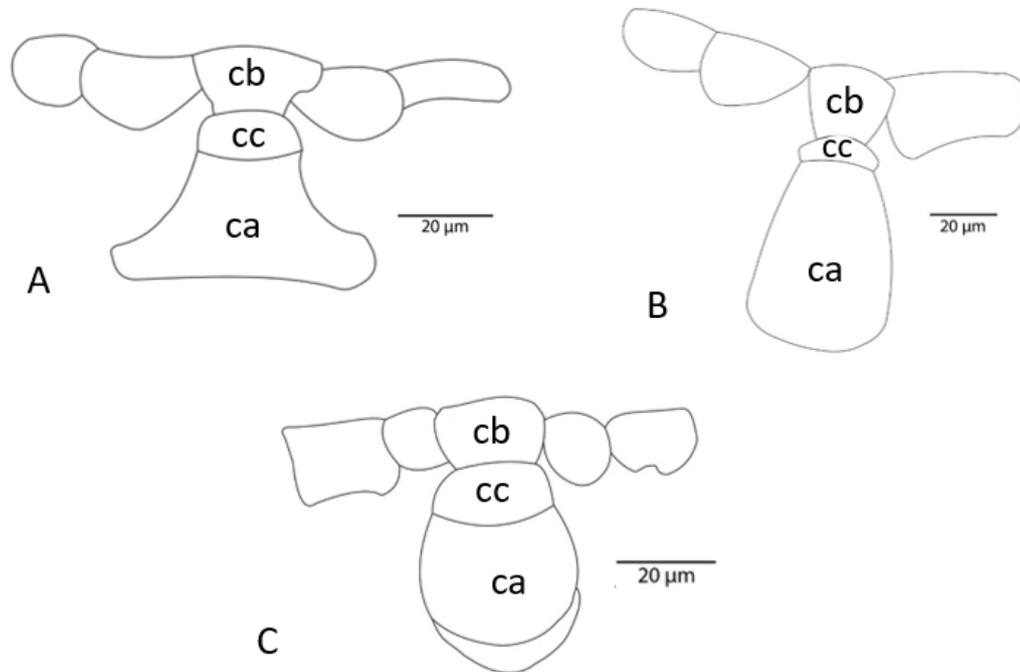


Figura 9. Representação esquemática dos diferentes tipos de tricomas glandulares encontrados em *Aloysia gratissima*. A- Tipo I. B- Tipo II. C- Tipo III. ca: célula apical; cc: célula do colar; cb: célula basal.



#### 4.3 TESTES HISTOQUÍMICOS

O conhecimento sobre a composição química dos tecidos vegetais pode anunciar o papel funcional das plantas (OLARANONT *et al.*, 2018), e o método de classificação mais adequado para isso é o teste histoquímico (ASCENÇÃO, 2000), que tem como objetivo localizar *in situ* os principais constituintes químicos presentes no material vegetal (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). A identificação destes compostos pode impulsionar futuros estudos sobre a síntese do composto ativo (HEINZMAN; BARROS, 2007).

A produção e a secreção de óleos essenciais e resinas, que são constituídas de polissacarídeos, por tricomas glandulares é característica de diversas famílias, entre elas, de Verbenaceae (ASCENÇÃO, 2000). Embora a família tenha atraído atenção, trabalhos relacionados à histoquímica são limitados (ARGYROPOULOU *et al.*, 2010). Não foram encontrados trabalhos em *A. gratissima* que identificaram a localização dos compostos bioativos no material vegetal.

Neste trabalho, foram realizados alguns testes histoquímicos e os resultados estão sumarizados no quadro 2.

Quadro 2. Testes histoquímicos realizados em folhas de *Aloysia gratissima*. Sinal (+) representa a presença do metabólito, sinal (-) representa a ausência.

Reagente	Composto	Presença			Outras regiões/tecidos	Figuras
		Conteúdo de tricomas glandulares				
		Tipo I	Tipo II	Tipo III		
Sudan IV	Lipídeos Totais	+	-	+	Cutícula	5a, 5b, 8c, 10a
Sudan Black	Lipídios Totais	-	-	+	-	10b
Vermelho de Rutênio	Pectinas	-	-	-	Parede células das células epidérmicas, dos tricomas não glandulares e glandulares, e do cistólito	10c, 10d
Comassie Blue	Proteínas	-	-	+	Parede celular de células epidérmicas, dos tricomas não glandulares e do cistólito	8f
Azul de Toluidina	Mucilagens e Pectinas	+	-	-	Maioria das células	8e, 10e
Reagente de Wagner	Alcaloides	+	-	+	-	10f, 11a
PAS	Polissacarídeos neutros	-	-	+	Maioria das células	5c, 11b

Nos tricomas glandulares o produto secretado/armazenado localiza-se no conteúdo da célula apical (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). A coloração com Sudan IV mostrou reação lipídica positiva nas células apicais do tricoma Tipo I (Figura 10a), do tricoma Tipo III (Figura 8c), e na cutícula (Figura 5a, 5b). Já o Sudan Black reagiu com a célula apical do tricoma Tipo III (Figura 10b). Lipídeos coram de azul negro com Sudan Black e de vermelho/alaranjado com o Sudan IV (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Argyropoulou *et al.* (2010) também encontraram lipídios nos tricomas de Tipo C de *Lippia citriodora*, e Favorito (2009) identificou um predomínio de substâncias lipídicas no tricoma Tipo II para *Lippia stachyoides*, ambas comparações que são semelhantes ao tricoma Tipo III deste trabalho. Favorito (2009) sugere que a produção lipídica ocorre na célula apical secretora, enquanto a produção de proteínas e alcaloides possa ocorrer na célula do colar.

Verificou-se reação do Vermelho de Rutênio com a parede celular da maioria das células (Figura 10c, 10d), corando de rosa/vermelho pectinas vegetais. Com o corante Comassie Blue, identifica-se a presença de proteínas na parede celular da

maioria das células, no conteúdo da célula apical dos tricomas do Tipo III e nos tricomas tectores não glandulares (Figura 8f), acordando com o trabalho de Tozin, Silva e Rodrigues (2016), onde os tricomas não glandulares possuem relação com o processo secretor.

Também para a detecção de mucilagens e pectinas, utilizou-se o corante Azul de Toluidina, que reagiu com a maioria das células vegetais. As paredes do xilema ficaram coradas de azul-esverdeado, Idioblastos e a parede das células epidérmicas coraram de rosa, o colênquima corou de vermelho-púrpura, indicando a presença dessas substâncias em grande parte dos tecidos do vegetal. Também houve reação com o conteúdo dos tricomas do Tipo I (Figura 10e).

Os alcaloides, únicos compostos do metabolismo secundário que foram identificados nas folhas de *A. gratissima* por meio de testes histoquímicos, reagem positivamente com o Reagente de Wagner, que são corados de castanho-avermelhado. Tal coloração foi evidenciada no conteúdo dos tricomas do Tipo I (Figura 10f) e Tipo III (Figura 11a). Favorito (2009) também identificou alcaloides nos tricomas de *L. stachyoides* semelhantes ao Tipo III, e sugeriu que esses compostos podem estar envolvidos na defesa química da planta, pois são tóxicos a muitos herbívoros. Ainda, Argyropoulou *et al.* (2010) verificaram a presença de alcaloides e pectinas em tricomas de estrutura globosa, muito semelhantes também aos do Tipo III de *A. gratissima*. Produtos do metabolismo secundário foram encontrados em estudos referentes ao extrato de *A. gratissima*, dentre eles, alguns compostos alcaloides (SILVA *et al.*, 2006; VANDRESEN *et al.*, 2010; ZENI *et al.*, 2013).

O PAS (*Periodic Acid-Schiff*) é considerado muito útil na detecção de todo material constituído por polissacarídeos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Houve reação positiva do PAS para a parede celular da maioria das células. O reagente também apresentou reação positiva para o conteúdo da célula apical secretora dos tricomas do Tipo III (Figura 11b).

Como *Aloysia gratissima* apresenta uma grande quantidade de tricomas glandulares, é preciso que se realizem testes histoquímicos adicionais para comprovar a composição química da secreção produzida/armazenada. Verificou-se que os tricomas glandulares, principalmente os de Tipo II, apresentam um conteúdo que não foi possível identificar com os testes histoquímicos realizados no presente estudo (Figura 11c, 11d). Por falta de reagentes mais específicos não foi possível realizar uma identificação completa do conteúdo do interior dos tricomas glandulares.

Figura 10. Testes histoquímicos realizados em *Aloysia gratissima*; A- conteúdo do tricoma glandular Tipo I (seta) (Sudan IV). B- conteúdo do tricoma glandular Tipo III (seta) (Sudan Black). C- parede celular (Vermelho de Rutênio). D- parede celular de cystólitos e células epidérmicas (Vermelho de Rutênio). E- conteúdo de tricoma glandular Tipo I (seta) (Azul de Toluidina). F- conteúdo de tricoma glandular Tipo I (seta) (Reagente de Wagner).

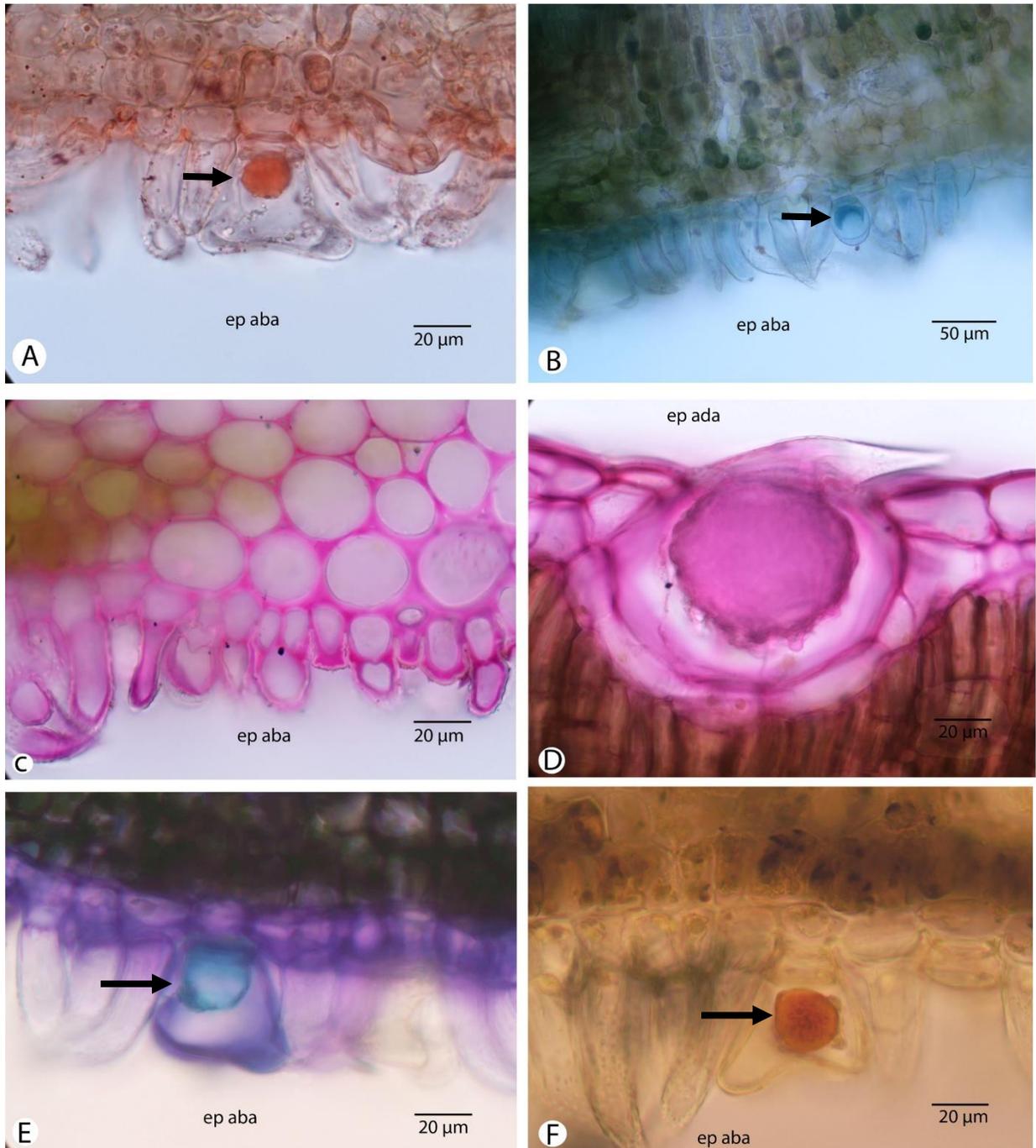
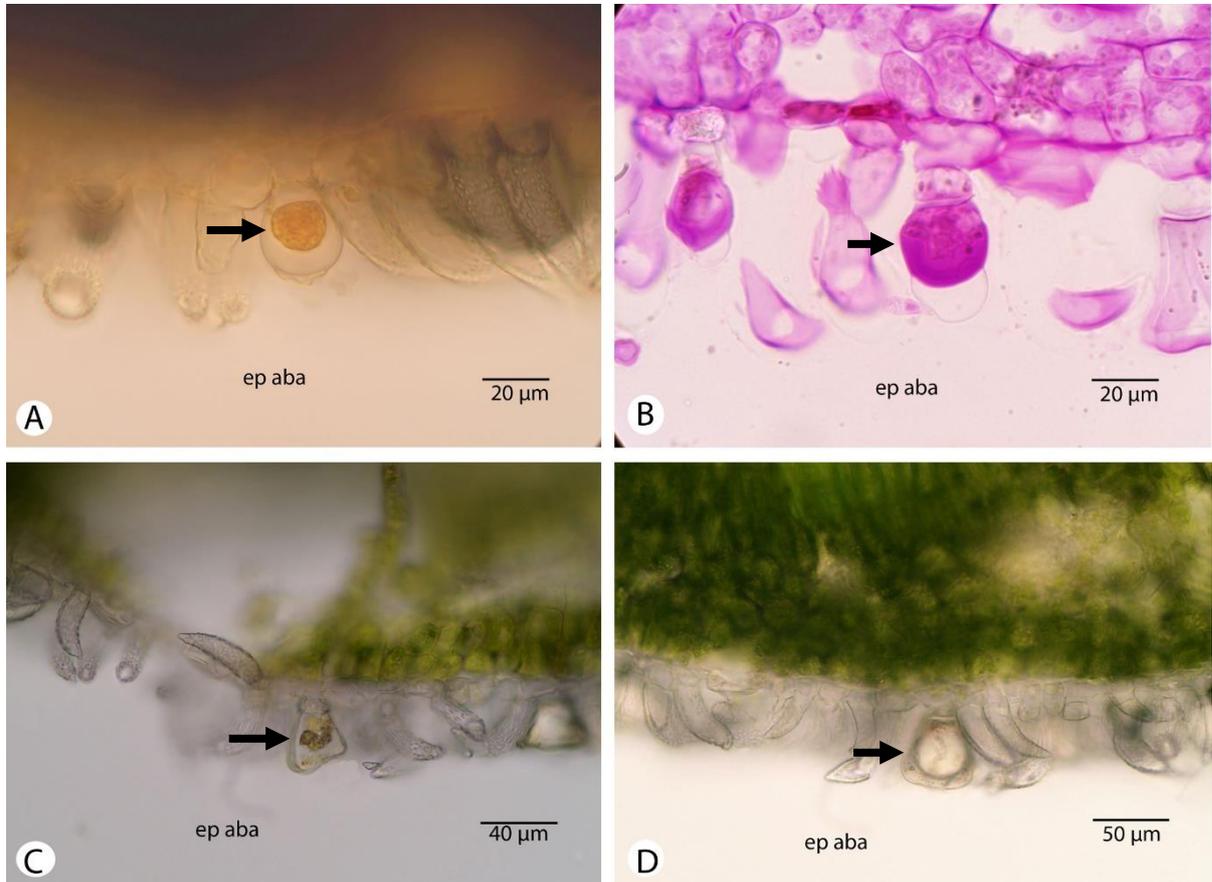


Figura 11. Testes histoquímicos realizados em *Aloysia gratissima*. A- presença de alcaloide no conteúdo do tricoma glandular Tipo III (seta) (Reagente de Wagner). B- Reação positiva para polissacarídeos no conteúdo da célula apical do tricoma glandular Tipo III (seta) (PAS). C,D- Tricomas glandulares, conteúdo não identificado (seta) (cortes a mão livre sem coloração).



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste trabalho foi possível caracterizar a anatomia de folhas de *Aloysia gratissima*, além de informar sobre a constituição histoquímica das estruturas analisadas, visto que são escassos os estudos existentes. Por meio dos testes histoquímicos realizados, verificou-se a presença de Pectinas, Lipídeos, Proteínas, Polissacarídeos e Alcaloides nas folhas da espécie.

Muitas das características encontradas em *Aloysia gratissima* são comuns àquelas descritas para a família, como a presença de numerosos tricomas glandulares e não glandulares e um mesofilo dorsiventral. A partir das análises anatômicas verificou-se características diagnósticas para a espécie que são essenciais na sua correta identificação, como, por exemplo, a presença de cistólitos associados a tricomas.

Ainda, este estudo pode servir como base no controle de qualidade de eventuais fitoterápicos que venham a ser desenvolvidos com a espécie, além de futuras pesquisas relacionadas à produção e manipulação de substâncias bioativas.

Como perspectivas futuras de continuação do trabalho para publicação, necessita-se realizar testes histoquímicos mais específicos para elucidar com clareza a natureza química dos compostos no interior dos tricomas glandulares. Além disso, submeter amostras da folha de *A. gratissima* a análises de microscopia eletrônica de varredura, para verificar a existência de outras estruturas que não foram observadas em microscopia óptica.

## 6 REFERÊNCIAS

ABU-ASAB, Mones S.; CANTINO, Philip D. Phylogenetic Implications of Leaf Anatomy in Subtribe Melittidinae (Labiatae) and Related Taxa. **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 68, n. 1, Jan. 1987.

ALBA, Thainara Marcotto. **Aspectos Morfo-Anatômicos e Histoquímicos de *Lantana Fucata* L. (Verbenaceae)**. 2016. 37 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas - Licenciatura, Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 2016. Disponível em: <<https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/360>>. Acesso em: 15 out. 2019.

ALICE, C.B. *et al.* **Plantas medicinais de uso popular: Atlas farmacognóstico**. Canoas: ULBRA, 1995. 205p.

ARAMBARRI *et al.* Leaf Anatomy of Medicinal Shrubs and Trees from Gallery Forests of the Paranaense Province (Argentina). Part 1. **Bol. Soc. Argent. Bot.** 41: p. 233-268. 2006.

ARAMBARRI *et al.* Anatomía de dicotiledóneas: Tallos de hierbas terrestres medicinales rioplatensis (Buenos Aires, Argentina). **Bonplandia**, v. 22, n.2, p. 107-130. 2013.

ARGYROPOULOU, C., *et al.* Leaf anatomy and histochemistry of *Lippia citriodora* (Verbenaceae). **Australian Journal of Botany** n. 58, p. 398-409. 2010.

ASCENSÃO, L. ESTRUTURAS SECRETORAS EM PLANTAS: Uma abordagem Morfoanatômica. In: FIGUEREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L.G. **Potencialidades e Aplicações de Plantas Aromáticas e Medicinais**. 3 ed. Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal. p. 19-28, 2007.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia Vegetal**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006.

BATTISTI, C.; GARLET, T.M.B.; ESSI, L.; HORBACH, R.K.; ANDRADE, A.; BADKE, M.R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 3, p. 338-348, jul./set. 2013.

BONZANI, N. E.; FILIPPA, E. M.; BARBOZA G. E. 2003. Estudio anatómico comparativo de tallo en algunas especies de Verbenaceae. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica** 74(1): 31-45.

BONZANI, N.E.; FILIPPA, E.M.; BARBOZA G.E. 1997. Particularidades epidérmicas en algunas especies de Verbenaceae. **Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica** 68:47-56. Disponível em: <http://www.revistas.unam.mx/index.php/bot/article/view/1903/1465>. Acesso em: 04 de julho de 2019.

BRAGA, J. M. F.; PIMENTEL, R. M. de M.; FERREIRA, C. P.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S. Morfoanatomia, histoquímica e perfil fitoquímico de *Priva lappulacea* (L.) Pers. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, 2009.

BRANDELLI, Clara Lia Costa. Metabolismo Vegetal. In: MONTEIRO, Siomara da Cruz; BRANDELLI, Clara Lia da Costa. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 43-57.

BRANDELLI, Clara Lia Costa; VIEIRA, Patrícia de Brum. Substâncias Bioativas. In: MONTEIRO, Siomara da Cruz; BRANDELLI, Clara Lia da Costa. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 59-70.

BRASIL. ANVISA. **Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico** - Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 123 p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2501251/Guia%2Bfinal%2Bdicol%2B180614+%282%29.pdf/f400c535-e803-4911-9ef8-100c0c2bb3c6>. Acesso em: 05 de junho de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** – Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 136 p.: il. – (Série C. Projetos, Programas e Relatórios). Disponível em: [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa\\_nacional\\_plantas\\_medicinais\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf). Acesso em: 05 de junho de 2019.

CALZADA-SÁNCHEZ, et al. Anatomía de hoja y tallo de verbenaceae medicinales Empleadas en México. **Botanical Sciences** 92 (4): 469-480, 2014. Disponível em: [http://www.botanicalsciences.com.mx/index.php/botanicalSciences/article/view/170/Calzada\\_S%C3%A1nchez%20et%20al](http://www.botanicalsciences.com.mx/index.php/botanicalSciences/article/view/170/Calzada_S%C3%A1nchez%20et%20al). Acesso em: 04 de nov. de 2019.

CARDOSO, J.C.W. **Níveis de luz e homeopatia sobre caracteres morfofisiológicos e óleo essencial e atividade fungitóxica do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (Gilles & Hook.) Tronc.** 2005. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CASTRO, L.O.; CHEMALE, V.M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo**. Guaíba: Agropecuária, 1995. 196p.

CEOLIN, T.; HECK, R. M.; BARBIERI, R. L.; SOUZA, A. D. Z. de; RODRIGUES, W. F.; VANINI, M. Plantas medicinais utilizadas como calmantes por agricultores ecológicos da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Enfermagem UFPE On Line**, v.3, n4, p. 1034-41, 2009.

COUTINHO, et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas em comunidades indígenas no estado do Maranhão – Brasil. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 7-12, Jan.-Jun./2002.

CRESPAM, Priscila Ceribola. **Estudos na família Verbenaceae no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-

graduação em Botânica, Instituto de Biociências. Departamento de Botânica, UFRGS, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <  
<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/132803/000760261.pdf?sequence=1> >. Acesso em: 10 maio 2019.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; COSTA, M.C.; ROQUE O.R.; CUNHA, H.P.; PORTUGAL, M.P. **Manual de Plantas Medicinais – Bases Farmacológicas e Clínicas**. Lisboa: Dinalivro. 2017.

FAVORITO, Shelly. **Tricomas secretores de *Lippia stachyoides* Cham. (Verbenaceae): estrutura, ontogênese e secreção**. 2009. 83 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/88132>. Acesso em: 05 de Junho de 2019.

FEDER; O'BRIEN. Plant microtechnique: some principles and new methods. **Amer. J. Bot.** 55: 123-142. 1968.

FERREIRA, S. H. (Org.). **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998, 131 p.

FIGUEIREDO, A.C.S.; BARROSO, J.M.G.; PEDRO, L.M.G; ASCENÇÃO, L. **Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos**, Lisboa, 1<sup>a</sup> Edição. Edição Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal. 2007.

FISCHER, D.B. Protein staining of ribboned Epon sections for light microscopy. **Histochemie** 16: 92-96. 1968.

FUCHS, C.H. Fuchsin staining with NaOH clearing for lignified elements of whole plants or plants organs. **Stain Technology** 38: 141-144. 1963.

FURR; MAHLBERG. Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **J. Nat Prod.** 44: 153-159. 1981.

GATTUSO, S. *et al.* Morpho-histological and quantitative parameters in the characterization of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau) from Argentina. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 7, n.4, p. 190-198. 2008.

GERRITS, P.O.; SMID, L. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **American Journal of Microscopy**. v. 132, p. 81-85. 1983.

HEINZMANN, B.M.; BARROS, F. M. C. de; Potencial de plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (mill.) N.E. BROWN (Verbenaceae). **Saúde**, Santa Maria. v.33, n1, p.43-48, 2007.

HERNANDEZ T.; CANALES, M.; AVILA, J.G. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 181-188. 2003.

HICKEY, Leo J. Classification of the Architecture of Dicotyledonous Leaves. **American Journal of Botany**, Vol. 60, No. 1. Washington, D. C., p. 17-33. jan. 2019. Disponível em:  
[http://www.u.arizona.edu/~bblonder/leaves/The\\_secrets\\_of\\_leaves/Making\\_skeleton\\_s\\_files/American%20Journal%20of%20Botany%201973%20Hickey%20Classification%20of%20the%20architecture%20of.pdf](http://www.u.arizona.edu/~bblonder/leaves/The_secrets_of_leaves/Making_skeleton_s_files/American%20Journal%20of%20Botany%201973%20Hickey%20Classification%20of%20the%20architecture%20of.pdf). Acesso em: 01 nov. 2019.

HIRUMA-LIMA, Cléia Akiko et al. Flavonoides. In: FURTADO, Nieve Araçari Jacometti Cardoso; VENEZIANI, Rodrigo Cassio Sola; AMBRÓSIO, Sérgio Ricardo (Ed.). **Farmacognosia**. Belo Horizonte: Atheneu, 2017. Cap. 19. p. 387-406.

JOHANSEN, D. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill, New York. 1940.

JUDD, W. S.; et al. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3 eds. Porto Alegre: Artmed, 2009.

LIMA, A.B.S. de; et al. Characterization and application of *Lippia alba* (Mill) and *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf. essential oils as natural sanitizers in coriander. **Food Sci. Technol**, Campinas, Ahead of Print, 2019.

LOPES, Adriana Aparecida; KATO, Massuo Jorge; COSTA, Fernando Batista da. Tópicos sobre a Biossíntese de Metabólitos Secundários Vegetais. In: FURTADO, Nieve Araçari Jacometti Cardoso; VENEZIANI, Rodrigo Cassio Sola; AMBRÓSIO, Sérgio Ricardo (Ed.). **Farmacognosia**. Belo Horizonte: Atheneu, 2017. Cap. 4. p. 39-69.

LUCHIAN, Vasilica et al. Morphological and Anatomical Investigation of *Aloysia citrodora* Palau - New Medicinal Plant Introduced. **Scientific Papers Series B. Horticulture**. Bucareste, Romênia, p. 643-648. jan. 2018. Disponível em:  
 <<http://horticulturejournal.usamv.ro/pdf/2018/Art106.pdf>>. Acesso em: 07 nov. 2019.

MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. R. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. 100:405-414. 1976.

MCMANUS, J.F.A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technol**. 23: 99-108. 1948.

MELO, Nathalya Isabel de; CROTTI, Antônio Eduardo Miller. Óleos Voláteis: Constituintes Químicos e Atividades Biológicas. In: FURTADO, Nieve Araçari Jacometti Cardoso; VENEZIANI, Rodrigo Cassio Sola; AMBRÓSIO, Sérgio Ricardo (Ed.). **Farmacognosia**. Belo Horizonte: Atheneu, 2017. Cap. 13. p. 247-269.

MENTZ, L. A.; LUTZEMBERGER, L.C.; SCHENKEL, E.P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a obra de D'avila (1910). **Caderno de Farmácia**, v.13, n.1, p- 25-48, 1997.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. 2 ed. London: Oxford University Press, v. 1, 1988.

MILANEZE-GUTIERRE, M. A.; MELLO, J. C. P.; DELAPORTE, R.H.; Efeitos da intensidade luminosa de *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae) e sua importância no controle de qualidade da droga vegetal. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.1, 2003.

MONTANARI, R. M.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, C. J.; CARVALHO, L. S.; ANDRADE, N. J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: alternative sources of (e)-caryophyllene and germacrene-d. **Química Nova**, v.34, n9, p.1550-1555, 2011.

MORCELLE, M. R.; GATTUSO, M. A.; APOSTOLO, N. M. Steam and leaf anatomy of six species of *Verbena* native to Buenos Aires Province, Argentina. **New Zeland Journal of Botany**, v. 50, n. 1, 2012.

MUNSIF, Shakira *et al.* Leaf Epidermal Anatomy as an Aid to the Identification of Genera *Lantana*, *Verbena* and *Vitex* of Family Verbenaceae from Pakistan. **Journal Of Agriculture & Social Sciences**. Islamabad, Paquistão, p. 43-46. mar. 2007.

Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/242234102\\_Leaf\\_Epidermal\\_Anatomy\\_as\\_an\\_Aid\\_to\\_the\\_Identification\\_of\\_Genera\\_Lantana\\_Verbena\\_and\\_Vitex\\_of\\_Family\\_Verbenaceae\\_from\\_Pakistan](https://www.researchgate.net/publication/242234102_Leaf_Epidermal_Anatomy_as_an_Aid_to_the_Identification_of_Genera_Lantana_Verbena_and_Vitex_of_Family_Verbenaceae_from_Pakistan). Acesso em: 11 nov. 2019.

O'BRIEN, T.O.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Australia, Thermancarphi Pty. Ltd. 1981.

OLARANONT, Y.; STAUFFER, F.W.; TRAIPEM, P.; STAPLES, G.W. Investigation of the black dots on leaves of *Stictocardia* species (Convolvulaceae) using anatomical and histochemical analyses. **Flora Journal** v. 249 (2018) pages 133–142.

O'LEARY, N.; LU-IRVING, P.; MORONI, P.; SIEDO, S. Taxonomic revision of *Aloysia* (Verbenaceae, Lantaneae) in South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 101: 568–609. Published on 27 April 2016.

PASSOS, J.L.; MEIRA, R.M.S.A.; BARBOSA, L.C.A. Foliar anatomy of the species *Lantana câmara* and *L. radula* (Verbenaceae). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.27, n.4, p.689-700, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pd/v27n4/07.pdf>. Acesso em: 10 de nov. de 2019.

PEARSE. **Histochemistry: Theoretical and applied**. 4th ed. Longman Group Limited. 1980.

PINTO, J. E. BP; CARDOSO, J. C. W.; CASTRO, E. M. de; BERTOLUCCI, S. K. V.; MELO, L. A. de; DOUSSEAU, S.; Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-Brasil em função dos níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, v.25, p.210-214, 2007.

- ROSA, C. DA; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da Fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.
- SANTOS, Fúlvia Maria dos. Aspectos ecofisiológicos de *Aloysia gratissima* (Gillies et Hook) Troncoso [Verbenaceae] associados à composição do óleo essencial e sua ação antimicrobiana. Lavras: UFLA, 2007. 116 p.: il.
- SANTOS, F.M.; PINTO, J.E.B.P.; BERTO LUCCI, S.K.V.; ALVARENGA, A.A.; ALVES, M.N.; DUARTE, M.C.T.; SARTOR ATTO, A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the leaves and flowers of *Aloysia gratissima*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.15, n.4, p.583-588, 2013.
- SANTOS, M.R.A. **Estudos agrônômicos e botânicos de erva cidreira (quimiotipo limoneno-carvona)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Departamento de Fitotecnia - UFC, Fortaleza, 2003.
- SETOGUCHI; OKAZAKI; SUGA. Calcification in Higher Plants with Special Reference to Cystoliths. **Origin, Evolution, and Modern Aspects of Biomineralization in Plants and Animals**. p. 409-418. New York. 1989.
- SEYFRIED, M. *et al.* Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, p.201-214, 2016.
- SILVA, Cleuza C. da. *et al.* Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill. Et Hook) Tronc. (Verbenaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34. P. 593-595, 2006.
- SOARES, E.L.C.; VENDRUSCOLO, G.S.; EISINGER, S.M.; ZÁCHIA, R.A. Estudo etnobotânico do uso dos recursos vegetais em São João do Polêsine, RS, Brasil, no período de outubro de 1999 a junho de 2001 I - Origem e fluxo do conhecimento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, p.69-95. 2004.
- SOLER, E.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Composition of *Aloysia gratissima* leaf essential oil. **Phytochemistry**, Vol. 25, p. 1343-1345, 1986.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2012. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3ª ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 2012, 768p.
- SOUZA, A. A., WIEST, J. M. Atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul - Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 23-29. 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER E.; **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed. 2004.
- TOZIN, Luiz Ricardo dos Santos; SILVA, Stefany Cristina de Melo; RODRIGUES, Tatiane Maria. Non-glandular trichomes in Lamiaceae and Verbenaceae species:

morphological and histochemical features indicate more than physical protection. **New Zealand Journal Of Botany**. p. 446-457. 25 jul. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/0028825X.2016.1205107>>. Acesso em: 6 nov. 2019.

VANDRESEN, F. et al. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 317-321. 2009.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, vol. 28, n.3, pp. 519-528, 2005.

VENTRELLA, Marília Contin. **Produção de folhas, óleo essencial e anatomia foliar quantitativa de Lippia alba (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita**. 2000. 95 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Faculdade de Ciências Agronômicas, Unesp, Campus de Botucatu, Botucatu - Sp, 2000. Disponível em: <[https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/103278/ventrella\\_mc\\_dr\\_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/103278/ventrella_mc_dr_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 16 nov. 2019.

VERBENACEAE *in* **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB246>>. Acesso em: 22 jun. 2019.

WERKER, E. Function of Essential Oil-Secreting Glandular Hairs in Aromatic Plants of the Lamiaceae – A Review. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 8, p. 249-255, 1993.

ZANETTI, G.D.; MANFRON, M.P.; HOELZEL S.C.S. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). **Iheringia, Série Botânica** v. 59, p. 173-178. 2004.

ZENI, Ana Lúcia Bertarello. **Estudo fitoquímico, toxicológico e dos efeitos neuroprotetor e tipo antidepressivo do extrato aquoso de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Troncoso (erva santa)**. 2011. Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ZENI, Ana Lúcia Bertarello *et al.* Phytochemical profile, toxicity and antioxidante activity of *Aloysia gratissima* (Verbenaceae). **Quím. Nova**. V. 36. N. 1 p. 69-73, 2013.