

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**ESTUDO E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE ERVA-
CIDREIRA BRASILEIRA (*Lippia alba*) COM BASE
NA PRODUÇÃO, ESTABILIDADE E QUALIDADE
DO ÓLEO ESSENCIAL**

Carlos Henrique Nascimento Soares

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA
PRODUÇÃO VEGETAL**

**ESTUDO E SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE ERVA-CIDREIRA
BRASILEIRA (*Lippia alba*) COM BASE NA PRODUÇÃO,
ESTABILIDADE E QUALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL**

CARLOS HENRIQUE NASCIMENTO SOARES

Sob a Orientação do Professor
Pedro Côrrea Damasceno Junior

e Co-orientação do Professor
Marco André Alves de Souza

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Fitotecnia**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de Concentração em Produção Vegetal.

Seropédica, RJ
Março de 2017

SS676e Soares, Carlos Henrique Nascimento, 1993-
Estudo e seleção de genótipos de erva-cidreira
brasileira (*Lippia alba*) Com base na produção,
estabilidade e qualidade do óleo essencial / Carlos
Henrique Nascimento Soares. - Seropédica, 2017.
66 f.: il.

Orientador: Pedro Corrêa Damasceno Junior.
Coorientador: Marco André Alves de Souza.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Fitotecnia,
2017.

1. *Lippia alba*. 2. parâmetros genéticos. 3.
interação genótipo versus época. I. Junior, Pedro
Corrêa Damasceno , 1973-, orient. II. Souza, Marco
André Alves de , 1975-, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós-Graduação em
Fitotecnia. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

CARLOS HENRIQUE NASCIMENTO SOARES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Fitotecnia** no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Produção Vegetal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM -----/-----/-----

Pedro Corrêa Damasceno Junior. DSc. UFRRJ

Marilene Hilma dos Santos. DSc. UFRRJ

Carlos Augusto de Freitas Peregrino. DSc. UFF

AGRADECIMENTOS

A Deus pela Sua misericórdia e direção, ignorando meus defeitos. Por abrir meus olhos e me amar infinitamente mais do que mereço, sendo sempre fiel.

A Jesus Cristo por ter salvo minha vida, por me remir e me livrar de uma vida de pecados. A Ele todo o louvor da terra.

Ao Espírito Santo pelo conforto e ensinamentos, pelas reflexões que me acalmavam em momentos difíceis.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001” (PORTARIA Nº 206, DE 4 DE SETEMBRO DE 2018 DA CAPES).

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por me acolher e possibilitar minha formação, fornecendo todo o suporte para realização deste trabalho.

A toda comunidade científica que possibilitou o presente trabalho.

A FAPERJ pela ajuda financeira concedida.

A todos os professores e a todo o colegiado da pós-graduação em fitotecnia, pelos ensinamentos e pelo estímulo passado.

Ao meu orientador Pedro Corrêa Damasceno Junior que me conduziu e ensinou em todo momento, me educando e se preocupando em passar sua experiência.

Ao meu co-orientador Marco André Alves de Souza, que tão prontamente se dispôs até mesmo em suas férias para me ajudar na conclusão do trabalho.

Aos meus eternos amigos Carlos Augusto, Endy, Jeferson, Jenny, Saulo, Nádia e Felipe e Lorena, pelo apoio e suporte durante toda essa jornada. Vocês fizeram as coisas serem mais fáceis, minha vida mais alegre.

Ao amor da minha vida, minha futura esposa, Lorena. Por me ajudar incondicionalmente neste trajeto, sendo muito compreensiva em todos os momentos. Eu amo muito você e sou muito sortudo por ter tido você ao meu lado. Não seria possível sem você.

A minha querida mãe Carminha, que nunca mediu esforços para tornar possíveis meus sonhos e anelos, sendo paciente e me dando exemplo de como ser uma pessoa calma. A senhora é a melhor mãe do mundo.

A toda a minha família e amigos, pelo auxílio e carinho.

A minhas grades amigas Fernanda, Isabela, Janaina, Tatiana e Amanda, e ao meu grande amigo Leônidas, que me deram todo suporte e confiança ao longo dessa caminhada. Devo tudo a vocês, nunca conseguirei retribuir toda a ajuda. Além disso, sua companhia foi um prazer. Tenho certeza que os laços dessas amizades vão permanecer.

As amigas Tatiana e Eliane, por toda prontidão e ajuda na resolução de diversos problemas.

Aos técnicos e amigos do campo Evando, Jorge, Reginaldo, Pedro, Onar e Henrique.

A Isabel e a Ivana por toda a ajuda e companhia. Também devo muito a vocês.

Aos compositores da banca, Professora DSc. Marilene Hilma dos Santos, professor DSc Carlos Augusto de Freitas Peregrino e ao professor DSc. Pedro Corrêa Damasceno Junior, por terem prontamente aceitado o convite para esse evento.

A todos, muito obrigado. Tudo isso não seria possível sem vocês.

RESUMO GERAL

SOARES, Carlos Henrique Nascimento. **Estudo e seleção de genótipos de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) com base na produção, estabilidade e qualidade do óleo essencial**. 2017. 66p, Dissertação (Mestrado em Fitotecnia, Produção Vegetal). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2017.

A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) é uma espécie com potencial de produção de diversos princípios ativos em seu óleo essencial, utilizada para fins medicinais no Brasil. A seleção de genótipos com elevada produção de óleo essencial e estabilidade, tanto quantitativa quanto qualitativamente ao longo do ano, é crucial para se definir cultivares comerciais para a espécie. O presente trabalho teve por objetivo avaliar e selecionar genótipos de erva-cidreira brasileira, de quimiótipo citral, com base em suas características relacionadas a produção e a estabilidade de óleo essencial. O trabalho foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, buscou-se conhecer as características morfológicas e as relacionadas à produção dos genótipos. Para tal, nove genótipos de erva-cidreira brasileira foram organizados em delineamento de blocos casualizados em agosto de 2015 e avaliados em duas épocas distintas. As avaliações ocorreram em fevereiro e agosto de 2016. Foram mensuradas 13 variáveis morfológicas e de produção, os dados foram submetidos a ANOVA e teste de média. Estimaram-se também parâmetros genéticos e coeficientes de correlação entre as variáveis. Na segunda etapa do trabalho buscou-se conhecer a estabilidade química do óleo essencial dos mesmos genótipos de erva-cidreira brasileira avaliados em duas épocas diferentes. Para tal, o óleo essencial de oito genótipos, obtido também em fevereiro e agosto de 2016, foi quantificado e caracterizado por CG/DIC. Os metabólitos foram submetidos ao teste *t* para comparação entre as épocas de avaliação. Os resultados obtidos nas duas etapas destacaram um genótipo (UFRRJ ECB005) como o mais produtivo e com maior estabilidade química entre as duas épocas de avaliação, podendo produzir, em média, 0,31g de óleo essencial por planta, em cada coleta. O citral compôs, em média, 70,15% do óleo essencial desse genótipo, o que não variou estatisticamente entre as épocas. A primeira fase do trabalho também indicou que a influência genética prevaleceu no rendimento de óleo essencial dos genótipos ($H^2 = 96,33\%$), enquanto que quanto a biomassa foi mais influenciada pelo ambiente. Além do rendimento, os genótipos também se diferiram quanto a produção de óleo, diâmetro de ramo principal e tamanho de folha. O rendimento de óleo essencial, no geral, caiu em agosto (inverno) em relação à fevereiro (verão). Na segunda etapa do trabalho observou-se que o citral não variou entre as épocas para nenhum dos oito genótipos. Todos os genótipos apresentaram o citral constituindo acima de 65% do seu óleo essencial, ocorrendo diferença estatística entre eles. A porcentagem de citral no óleo essencial foi moderadamente influenciada pelo genótipo das plantas ($H^2 = 61,84\%$). No geral, observou-se baixa diversidade química entre os genótipos avaliados.

Palavras-chave: *Lippia alba*, parâmetros genéticos, interação genótipo *versus* época.

ABSTRACT

SOARES, Carlos Henrique Nascimento. **Introduction and selection of bushy matgrass genotypes (*Lippia alba*) based on production, stability and quality of essential oil.** 2017. 66p, Dissertation (Masters in Plant Science, Plant Production). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2017.

The bushy matgrass (*Lippia alba*) is a species with potential to produce several compounds in essential oil, used for medicinal purposes in Brazil. Selection of genotypes with high oil yield and stability, both quantitatively and qualitatively throughout the year, is crucial to define commercial cultivars for the species. The present work had the objective of evaluate and select bushy matgrass genotypes, based on their characteristics related to production and stability of essential oil. The research was carried out in two stages. In the first stage, the morphological characteristics and the characteristics related to production were studied. For this purpose, nine genotypes of bushy matgrass were organized in a randomized randomized blocks design in August 2015 and evaluated in two different periods. The evaluations occurred in February and August of 2016. Was measured 13 morphological and production characteristics, the data were submitted to ANOVA and mean test. Genetic parameters and correlation coefficients between the variables were also estimated. In the second stage of the research was attempted to know the chemical stability of essential oil of the same genotypes of bushy matgrass, evaluated at two different periods. For this, the essential oil of 8 genotypes, obtained also in February and August of 2016, was quantified and characterized by GC/FID. The metabolites were submitted to the t-test for compare the periods of evaluation. The results obtained in the two stages pointed a genotype (UFRRJ ECB005) as the most productive and with greater chemical stability between the two evaluation periods, producing an average of 0.31g of essential oil per plant, in each gathering. The citral composed an average of 70.15% of the essential oil of this genotype, which did not vary statistically between the periods. The first stage of the the research also indicated that the genetic influence prevailed on the essential oil yield of the genotypes ($H^2 = 96.33\%$), while the biomass was more influenced by the environment. Besides the yield, the genotypes also differed for oil production, main branch diameter and leaf size. The yield of essential oil in general fell in August (winter) in relation to February (summer). In the second stage of the research showed that the citral did not vary between the periods for any of the eight genotypes. All genotypes presented citral constituting over 65% of their essential oil, occurring statistical difference between them. The percentage of citral in the essential oil was moderately influenced by the plant genotype ($H^2 = 61.84\%$). In general, low chemical diversity was observed among the evaluated genotypes.

Keywords: *Lippia alba*, genetic parameters, genotype *versus* environment interaction.

LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

ALT	Altura de planta
CV(%)	Coeficiente de variação
CVg(%)	Coeficiente de variação genético
IV	ndice de variação
BFP	Biomassa fresca (g)
BSP	Biomassa seca (g)
CFO	Comprimento de folha
COP	Diâmetro de copa
DRP	Diâmetro de ramo principal
EQG(%)	Estabilidade química do genótipo
H ²	Coeficiente de determinação gentpico
LFO	Largura de folha
NR10	Número de ramos  10 cm de altura
NR50	Número de ramos  50cm de altura
NRB	Número de ramos na base
NS	Não há diferença estatística significativa
PRO	Produção de óleo essencial (g)
RCL	CFO/LFO.
REN	Rendimento de óleo essencial (%)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Características Gerais e Aspectos Agronômicos em Erva-Cidreira Brasileira	4
2.2 Centros de Diversidade e Distribuição	6
2.3 Importância Econômica	7
2.4 Melhoramento genético	9
2.4.1 Aspectos gerais	9
2.4.2 Parâmetros genéticos na seleção de plantas	11
2.5 Histórico do Programa de Melhoramento Genético de Erva- Cidreira Brasileira da UFRRJ	13
2.6 Fatores Ambientais e Produção de Óleo Essencial	15
3 TRABALHOS	17
3.1 Rendimento e Produção de Óleo Essencial em Genótipos Citral de Erva-Cidreira Brasileira	17
3.1.1 Resumo	17
3.1.2 Abstract	18
3.1.3 Introdução	19
3.1.4 Material e métodos	20
3.1.5 Resultados e discussão	25
3.1.6 Conclusões	35
3.1.7 Referências bibliográficas	36
3.2 Variação na Composição e Estabilidade do Óleo Essencial em Genótipos de Erva-Cidreira Brasileira	39
3.2.1 Resumo	39
3.2.2 Abstract	40
3.2.3 Introdução	41
3.2.4 Material e métodos	42
3.2.5 Resultados e discussão	45
3.2.6 Conclusões	56
3.2.7 Referências bibliográficas	56
4 CONCLUSÕES GERAIS	59
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown) é uma espécie pertencente a família das Verbenáceas sendo amplamente distribuída na América do Sul e Central (EHLERT, 2003). A espécie é popularmente conhecida como: erva-cidreira brasileira, erva-cidreira-do-campo, falsa-melissa, alecrim-do-campo, alecrim-selvagem, cidreira-brava, entre outros, de acordo com a região onde é encontrada (BARBOSA *et al.*, 2006). A erva-cidreira brasileira se caracteriza como um arbusto que pode alcançar até 2 metros de altura, apresenta muitas ramificações de hastes quebradiças e por vezes pendentes, de coloração marrom ou esverdeada (CÂMELO *et al.*, 2011; HARUCHI & DE CARVALHO, 2010; MAMUN-OR-RASHID *et al.*, 2013). As folhas apresentam, em média, 8 cm de comprimento, e são inteiras, opostas, de bordos serrados e ápice agudo, sendo revestidas por tricomas (CASTRO *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2004).

As Inflorescências da erva-cidreira brasileira são capituliformes de eixo curto, apresentando coloração arroxeadada, suas flores são hermafroditas sendo que a planta pode apresentar diversos níveis de ploidia, tal como diploide ($2n = 30$), tetraploide ($4n = 60$), e mixoploide ($2n$ variando entre 12 - 60), o que está correlacionado com o quimiótipo (PIERRI *et al.*, 2011). A erva-cidreira brasileira é amplamente utilizada na medicina popular brasileira pois suas folhas possuem propriedades medicinais e são recomendadas para o tratamento de problemas de saúde como hipertensão, cólica estomacal, gripe e como calmante pela medicina popular (OLIVEIRA & MENINI NETO, 2012; VASQUÉZ *et al.*, 2014), além de possuir propriedades aromáticas (MAYNARD, 2011), sendo utilizadas as suas folhas na forma de chás, infusão, tinturas e por inalação.

Devido à diversidade de quimótipos que podem ser encontrados na espécie, o óleo essencial presente principalmente nas folhas pode ser aproveitado por diversos ramos industriais, sendo alguns deles a perfumaria, a indústria de defensivos, de solventes e de aromatizantes. O óleo essencial da erva-cidreira brasileira é principalmente encontrado nos parênquimas paliçádico e lacunoso do mesófilo foliar (PEÑUELA, 2010, TAVARES *et al.*, 2011). A espécie tem como alguns dos seus componentes químicos majoritários mais comuns o citral, limoneno, cineol, linalol, carvona, mirceno e β -cariofileno (BARROS *et al.*, 2009; JANNUZZI *et al.*, 2011). Segundo Ehlert (2003), a produção do óleo essencial,

produto originado do metabolismo secundário, depende essencialmente de três fatores: produção de biomassa, rendimento de óleo essencial e composição do óleo.

Em plantas medicinais no geral, não se deve priorizar apenas a produção quantitativa de biomassa, deve-se também levar em consideração o rendimento e a riqueza dos princípios ativos contidos no óleo essencial (STEFANINI *et al.*, 2002), posto que o valor comercial das plantas medicinais e seus produtos é determinado por sua qualidade (SCHEFFER *et al.*, 1991). Dessa forma, diversos aspectos devem ser levados em consideração na produção da erva-cidreira brasileira. Em programas de melhoramento de plantas medicinais, é necessária a seleção de genótipos com estabilidade na produção de princípios ativos e com elevado rendimento de óleo essencial durante o ano.

Apesar do potencial para produzir diversos princípios ativos em vários quimiótipos, cultivares comerciais de erva-cidreira brasileira ainda não estão disponíveis. Entre as dificuldades de se estabelecer cultivares comerciais de erva-cidreira brasileira está a falta de estabilidade quantitativa e qualitativa na produção do óleo essencial, posto que, a qualidade e quantidade do óleo essencial, além de serem determinadas pelo genótipo da planta, também são influenciados por fatores ambientais bióticos e abióticos (GOBBONETO & LOPES, 2007; MORAIS, 2009). Alguns dos fatores ambientais que influenciam a síntese de voláteis nas plantas podem variar muito ao longo do ano, como a temperatura, precipitação pluviométrica, umidade e a intensidade luminosa (MORAIS, 2009). Diversos trabalhos com erva-cidreira brasileira demonstraram que a espécie apresenta tendências de variação no rendimento e na qualidade do óleo essencial de acordo com a época de colheita (BARROS *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2002; TAVARES *et al.*, 2005).

A instabilidade na composição química dos óleos essenciais resulta em dificuldades na implantação de agroindústrias e lavouras, tornando tal característica um desafio a ser vencido por melhoristas para tornar a espécie interessante para o cultivo (YAMAMOTO, 2006). A previsibilidade de produção é um aspecto importante a ser alcançado em espécies vegetais potencialmente úteis para a agricultura comercial. Para que um genótipo de erva-cidreira brasileira se mostre promissor para produção de óleo essencial ele deve apresentar estabilidade de rendimento de óleo essencial nas colheitas realizadas ao longo do ano (BOTTIGNON, 2009), além de apresentar elevada produção de biomassa. Nesse sentido é necessário conhecer o potencial de produção que pode ser encontrado na espécie, e, dessa forma, realizar a seleção de genótipos promissores.

O presente trabalho tem por objetivo selecionar genótipos de erva cidreira com produção e qualidade estável e satisfatória ao longo do ano no município de Seropédica, RJ. Para tal foi realizado um experimento com 9 genótipos de erva cidreira quimiótipo citral, avaliados em duas épocas do ano, fevereiro (representando o verão) e agosto (representando o inverno) onde foi possível avaliar e quantificar a variabilidade genética presente num mesmo quimiótipo da espécie. O trabalho foi dividido em duas etapas, a primeira consistiu na caracterização morfológica e produtiva dos genótipos, onde foi realizada a fenotipagem e a quantificação da produção de óleo essencial dos genótipos. Estimou-se, também na primeira etapa, os parâmetros genéticos para todas as variáveis fenotípicas e de produção avaliadas, o que permitiu a comparação dos genótipos quanto a sua capacidade de produção de óleo essencial. Na segunda etapa foi realizada a caracterização química do óleo essencial para as duas épocas de avaliação, e, dessa forma, foram analisadas as diferenças significativas encontradas entre as duas épocas, o que permitiu a comparação dos genótipos quanto a sua estabilidade qualitativa. Dessa forma, pretendeu-se conhecer o potencial produtivo e a estabilidade do perfil desses genótipos criando bases para produção e para programas de melhoramento na espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características Gerais e Aspectos Agronômicos em Erva-Cidreira Brasileira

A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba* (Mill) N.E. Brown) é um arbusto semi-perene pertencente à família das verbenáceas, sendo reconhecida pela sua utilização na medicina popular e pela capacidade de produção de vários tipos químicos de óleos essenciais (PASCUAL *et al.*, 2001). Tal espécie possui diferentes nomes populares de acordo com a região, sendo alguns deles erva-cidreira brasileira, falsa melissa, alecrim do campo, alecrim selvagem e cidreira brava (BARBOSA *et al.*, 2006). A erva-cidreira brasileira está presente em basicamente todo o território nacional, sendo utilizada pela população na forma de chás, infusões ou tinturas, pois possui propriedades calmantes, anti-espasmódicas, anti-inflamatórias e analgésicas (MAMUN-OR-RASHID *et al.*, 2013; PASCUAL *et al.*, 2001; TAVARES *et al.*, 2003;)

A erva-cidreira brasileira apresenta tamanho variando entre 1 a 2m de altura, sendo muito ramificada (CASTRO, 2001) (Figura 1). O caule é pouco lenhoso e apresenta cor castanho clara sendo seus ramos finos e quebradiços, as brotações novas eretas tendem a ficar arqueadas com o crescimento, até que, chegando a o solo, podem enraizar e formar novas arbustos (BOTTIGNON, 2009).

As folhas de erva-cidreira brasileira podem medir entre 4 a 10 cm de comprimento (CÂMELO *et al.*, 2011) e o seu tamanho pode estar relacionado com o rendimento de óleo essencial e os princípios ativos produzidos pela espécie (JANNUZZI *et al.*, 2010). Estas possuem formato peciolado e margem serrada, com, geralmente, duas folhas opostas por nó, sendo revestidas por tricomas (CASTRO, 2001). O óleo essencial da cultura é encontrado principalmente nas folhas, nas células do parênquima paliçádico e lacunoso. (JANNUZZI *et al.*, 2011; YAMAMOTO, 2006). As flores da espécie são hermafroditas de cor azul arroxeadas e dispostas em inflorescências axilares capituliformes de eixo curto e tamanho variável. As inflorescências apresentam um pequeno disco central de flores ainda não desenvolvidas rodeado por entre três a cinco flores liguladas (MATOS, 1998). As sementes da erva-cidreira brasileira, que são drupas globosas, podem apresentar dormência e baixa taxa de germinação (YAMAMOTO, 2006).

Uma das características que torna a espécie *Lippia alba* promissora para diversos ramos industriais é a diversidade de princípios ativos que podem ser obtidos no seu óleo



Figura 1. Plantas de erva-cidreira brasileira em crescimento vegetativo.

essencial (YAMAMOTO, 2006). Essa diversidade na composição química do óleo essencial da espécie pode apresentar variação quantitativa e qualitativa e está relacionada a fatores genéticos e ambientais (BOTTIGNON, 2009). Tal diversidade permite o agrupamento em tipos químicos dentro da espécie com base nos compostos majoritariamente presentes no óleo essencial, definindo os diferentes quimiótipos que podem ser encontrados na espécie (TAVARES *et al.*, 2005). Os quimiótipos, além de se diferirem na composição do óleo essencial, também podem apresentar diferentes características morfológicas (BOTTIGNON, 2009).

Entre os quimiótipos de erva-cidreira brasileira mais comuns podem ser encontrados o linalol, limoneno, citral (geranial e neral), germacreno, β -cariofileno e o mirceno (BARBOSA *et al.*, 2006; HENNEBELLE *et al.*, 2006; JANNUZZI *et al.*, 2011) (Figura 2). A composição química do óleo essencial da espécie é diretamente afetada por diversos fatores ambientais como temperatura, intensidade luminosa, precipitação pluviométrica, estresses, horário de coleta e nutrição do solo (CASTRO *et al.*, 2002; EHLERT, 2003; EHLERT *et al.*, 2013; TAVARES *et al.*, 2005).

Yamamoto (2006) afirma que o potencial industrial da erva-cidreira brasileira também está associado à rapidez de colonização pela propagação vegetativa, pelo vigor, e por vegetar boa parte do ano. A espécie também apresenta adaptação para vários ambientes



Figura 2. Ramos de erva-cidreira brasileira de quimiótipo citral com inflorescências.

(plasticidade fenotípica) devido às alterações morfológicas e fisiológicas (PEÑUELA, 2010). A capacidade de brotação da erva-cidreira brasileira permite que seja realizada diversas colheitas de biomassa ao longo do ano (BARROS *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2002; TAVARES *et al.*, 2005). A biomassa utilizada para extração do óleo essencial normalmente é seca, e o rendimento de óleo essencial pode variar consideravelmente, podendo ser encontrados valores normalmente variando entre 0,1 a 1% (TAVARES *et al.*, 2005; YAMAMOTO *et al.*, 2008).

Santos & Innecco (2004), ao realizarem um estudo das características agronômicas da erva-cidreira brasileira, concluíram que a adubação não influenciou significativamente a produção de biomassa e o rendimento de óleo essencial, no entanto, Ming (1992), verificou um aumento na produção de biomassa e uma queda no rendimento de óleo essencial a partir de adubação orgânica na espécie. Ventrella (2000) estudando a relação entre a maturação das folhas e o seu rendimento constatou que folhas mais jovens de erva-cidreira brasileira produzem mais óleo do que folhas mais velhas.

A erva-cidreira brasileira, por não ser uma espécie domesticada (BOTTINGNON, 2009; RUFINO, 2010) não possui referências muito bem definidas para caracteres como espaçamento de cultivo e recomendações de adubação. Peñuela (2010) utilizou espaçamento

de 1,00 x 1,00 e estimou obter 945 Kg. há⁻¹ de massa seca. Jannuzzi *et al.* (2010) utilizaram espaçamento de 4,00 x 4,00m e, apesar de suas plantas produzirem, em média, mais biomassa seca que as plantas utilizadas por Peñuela (2010), a produção de biomassa seca estimada ficou em 562 Kg. há⁻¹, por conta do espaçamento utilizado. Quanto à produção de óleo essencial, Ehlert *et al.* (2013) obtiveram estimativa de produzir 2,86 L.ha⁻¹ de óleo essencial trabalhando com erva-cidreira brasileira de quimiótipo limoneno-carvona.

2.2 Centros de Diversidade e Distribuição

A família Verbenaceae está incluída no clado Asteridae e ordem Lamiales, sendo constituída por 36 gêneros e 480 espécies de distribuição neotropical, onde o Brasil reúne a maior riqueza da família, com 16 gêneros e 290 espécies, sendo 191 endêmicas (SALIMENA & MÚLGURA, 2015). Diversos gêneros dentro da família têm se destacado por suas funções medicinais e ornamentais, sendo alguns deles *Aloysia*, *Lantana* e principalmente o gênero *Lippia* com 88 espécies na flora brasileira, sendo 68 endêmicas. *Lantana* e *Lippia* pertencem à tribo *Lantaneae* Endl., que inclui cerca de 80% das Verbenaceae (SALIMENA & MÚLGURA, 2015).

O gênero *Lippia* L. reúne aproximadamente 254 taxa, incluindo espécies e variedades, a maioria concentrada no Brasil, Paraguai e Argentina, havendo poucas espécies endêmicas na África. No Brasil, os principais centros de diversidade específicos desse gênero estão localizados na Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais, e na Chapada Diamantina, na Bahia (PIMENTA *et al.*, 2007). Quanto a espécie erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*), além de ser encontrada nas Américas do Sul e Central, também pode estar presente no sul dos Estados Unidos, na Índia e na Austrália e na África (MAMUN-OR-RASHID *et al.*, 2013). Rufino (2010) declara a erva-cidreira brasileira como uma espécie normalmente em solos arenosos e nas margens de corpos de água, em regiões de clima tropical, subtropical e temperado.

2.3 Importância Econômica

O potencial econômico da erva-cidreira brasileira gira em torno do seu óleo essencial. A erva-cidreira brasileira apresenta capacidade de produção de diferentes compostos químicos em elevada concentração, devido a diversidade de quimiótipos que podem ser encontrados na espécie. Esses quimiótipos podem ter interesses industriais muito diferentes.

A produção comercial do óleo essencial basicamente depende de três fatores: da produção de biomassa, do rendimento de óleo e da sua composição química, os quais são relatados na literatura como características bastante variáveis (YAMAMOTO, 2006). Os óleos essenciais são normalmente obtidos a partir das partes não lenhosas de plantas, particularmente da folhagem, através de métodos de extração como arraste a vapor ou hidrodestilação.

A composição química dos óleos essenciais é uma mistura complexa composta principalmente por terpenóides, podendo ser monoterpenos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅), que determinam o aroma e o odor característico da planta, bem como as estruturas físicas do óleo. Em sua composição os óleos essenciais podem apresentar também uma variedade de fenóis, óxidos aromáticos, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas (BATISH, 2008; CRAVEIRO *et al.*, 1993). Os óleos essenciais constituem um dos grupos de matéria prima mais importantes para as indústrias de perfumaria, alimentícia e farmacêutica, sendo, porém, pobremente explorados no Brasil quanto a sua diversidade (BATISH, 2008; JUNIOR & PASTORE, 2007). Apesar do Brasil estar entre os quatro maiores exportadores de óleo essencial do mundo, ele se destaca somente na exportação de óleo essencial de citros (BIZZO *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, a produção biotecnológica de compostos aromáticos tem se desenvolvido pela crescente demanda do mercado por produtos rotulados como naturais. O emprego medicinal das plantas também pode ser explorado, posto que a eficácia medicinal de algumas espécies está comprovada (EHLERT, 2003, MAMUN-OR-RASHID *et al.*, 2013). Estudos sobre a utilização fitoterápica de plantas medicinais no Brasil são favorecidos pela ampla biodiversidade existente, e pelo pouco conhecimento científico sobre tal biodiversidade (EHLERT, 2003).

Os quimiótipos encontrados na erva-cidreira brasileira podem ser explorados por diversos ramos indústria. Os princípios ativos presentes em quantidades majoritárias no óleo essencial da espécie podem ser muito distintos quanto a sua atividade biológica e características químicas. O limoneno, princípio ativo majoritário encontrado em diversos genótipos de erva-cidreira brasileira (BLANK *et al.*, 2015; JANNUZZI *et al.*, 2010; MESA-ARANGO *et al.*, 2009), é um terpeno cíclico que pode ser usado como matéria prima na perfumaria, na reconstituição de aromas e em produtos domésticos, por conta do seu aroma cítrico agradável. O limoneno também pode ser usado na produção de álcoois e cetonas terpênicos (BERTOLLINI, 1999), como desengordurante, aromatizante, bactericida e antifúngico (ESPINA *et al.*, 2013). O limoneno está normalmente presente em elevada

concentração no óleo essencial de cítricos, podendo compor até 90% do óleo essencial destes (BERTOLINI, 1999)

O linalol é um monoterpene acíclico que é considerado uma das substâncias mais importantes na indústria farmacêutica e de cosméticos, sendo utilizado como fixador de fragrâncias. Aproximadamente 70 % dos compostos produzidos pelas indústrias farmacêuticas contêm linalol em sua fórmula, sendo que os produtos e perfumes mais refinados utilizam somente o linalol natural (CAMARGO *et al.*, 2015). O linalol também é um dos terpenos mais utilizados como agente flavorizante (BERTOLINI, 1999). Jannuzzi *et al.* (2010) encontraram um genótipo de erva-cidreira brasileira cujo óleo essencial apresentou 89% de sua composição sendo linalol.

O Citral é classificado como terpeno acíclico levemente amarelado, apresenta dois isômeros, o geranial (E-citral) e o neral (Z-citral) (Figura 3), sendo que, ao se avaliar o óleo essencial de plantas medicinais, esses dois constituintes são somados para se obter a porcentagem total de citral. O geranial, constituinte do citral normalmente encontrado em maior concentração é responsável pelo odor cítrico do princípio ativo. O neral é responsável pelo odor adocicado do princípio ativo e, geralmente, representa menor parcela na composição do citral. O princípio ativo citral, quanto isolado, é utilizado pela indústria alimentícia na obtenção de agentes flavorizantes e como matéria prima de outros terpenóides (como mentol e iononas) e de vitamina A (BERTOLINI, 1999). Algumas propriedades bactericidas e fungicidas do citral também já foram demonstradas (FAN *et al.*, 2013; ONAWUNMI, 1989). O citral geralmente é associado às propriedades tranquilizantes das plantas de onde é extraído (BERTOLINI, 1999).

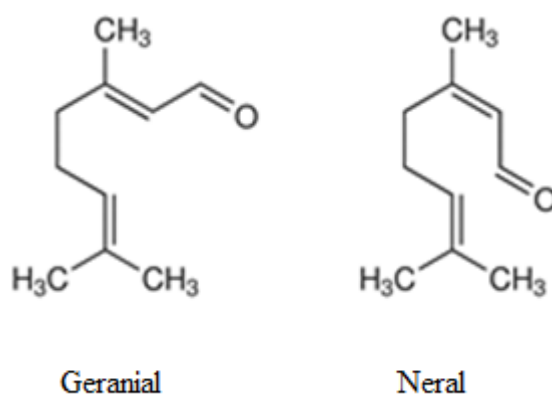


Figura 3. Moléculas de geranial e neral, isômeros que constituem o princípio ativo citral.

2.4. Melhoramento Genético

2.4.1. Aspectos gerais

Segundo Cruz *et al.* (2006), o objetivo de qualquer programa de melhoramento genético é aumentar ou diminuir a média de uma população para um caráter de interesse, identificando, acumulando e perpetuando genes favoráveis, o que pode ser generalizado pela equação:

$$\mu_s = \mu_0 + GS$$

Sendo μ_s a média da população melhorada, μ_0 a média da população normal e GS o ganho por seleção. Logo, para que a média da população melhorada se apresente superior à média normal é necessário que o ganho por seleção seja adequadamente expresso por meio de uma técnica seleção. Esse ganho depende da estrutura da população e dos efeitos gênicos dos alelos.

As características genéticas a serem melhoradas em uma espécie agrícola, podem ser de dois tipos, qualitativas ou quantitativas. Os caracteres qualitativos são governados por um ou poucos genes, denominados de variáveis discretas por apresentarem classes fenotípicas facilmente separáveis umas das outras. No entanto, grande parte das características agrônomicas estudadas apresentam herança quantitativa, que não pode ser estudada da mesma maneira que as variáveis discretas. Assim, a área da genética que estuda este tipo de herança é chamada de genética quantitativa, e ela é essencial em programas de melhoramento genético, posto que estes dependem da manipulação de caracteres quantitativos através de endogamia, cruzamentos e seleções (CRUZ *et al.*, 2003; (FALCONER *et al.*, 1996).

Segundo Cruz *et al.* (2006) A importância da caracterização do fenótipo na genética quantitativa se dá pelo fato da grande parte da identidade de um genótipo ser determinada por genes múltiplos que amplamente influenciados pelo ambiente. Essa influência é consequência da interação do genótipo com o ambiente na manifestação um determinado fenótipo. Portanto, na genética quantitativa procura-se determinar qual a proporção da variação fenotípica que se refere ao genótipo e ao ambiente, sendo assim:

$$\text{Fenótipo (F)} = \text{Fatores genéticos (G)} + \text{Fatores do Ambiente (A)}$$

Como também:

$$\text{Variância do Fenótipo } (\alpha^2_F) = \text{Variância Gênica } (\alpha^2_G) + \text{Variância Ambiental } (\alpha^2_A)$$

A variância genética pode ser decomposta em subcomponentes, como a variância resultante dos efeitos genéticos aditivos (σ^2_A), a variância resultante dos efeitos de dominância (σ^2_D), sendo devida aos efeitos genéticos das interações entre alelos de um mesmo locus, e a variância derivada dos efeitos genéticos da interação entre alelos em diferentes loci, isto é, resultantes da epistasia (σ^2_E)

Dessa forma:

$$\sigma^2G = \sigma^2A + \sigma^2D + \sigma^2E$$

Os caracteres quantitativos ou poligênicos são aqueles governados por múltiplos genes, sendo que cada gene segrega segundo as leis de Mendel e distribuição contínua de fenótipos, ou seja, entre os tipos extremos de indivíduos de uma população, há inúmeros fenótipos de difícil separação em classes distintas. Outra característica dos caracteres poligênicos, refere-se ao fato de serem influenciados pela variação do ambiente, o que dificulta a identificação dos genótipos com base apenas no fenótipo observado (FALCONER *et al.*, 1996). Desta forma, para avançar em um programa de melhoramento genético, é necessário conhecer dos níveis e da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações para caracteres agrônômicos e químicos, herdabilidades e a presença de correlações entre os caracteres (RUFINO, 2010).

Em programas de melhoramento de espécies medicinais, alguns dos caracteres de maior relevância são a produção de biomassa e rendimento de óleo essencial, que são basicamente os componentes da produção de óleo essencial (YAMAMOTO, 2006). No entanto, não se deve deixar de dar atenção especial à caracterização química e à estabilidade do óleo essencial, posto que o valor comercial das plantas medicinais e seus produtos é determinado por sua qualidade (STEFANINI *et al.*, 2002)

2.4.2. Parâmetros genéticos na seleção de plantas

A estimativa de parâmetros genéticos é importante em programas de melhoramento pois permite conhecer a estrutura genética das populações para fins de seleção, além das estimativas de herdabilidade, o que fornece subsídios para definição das estratégias de seleção, bem como auxiliam a predição de ganhos obtidos (FALCONER *et al.*, 1996). A obtenção de estimativas de parâmetros genéticos é fundamental por permitir identificar a atividade genética envolvida no controle dos caracteres quantitativos além de possibilitar a avaliação da eficiência de diferentes estratégias de melhoramento para obtenção de ganhos genéticos (CRUZ *et al.*, 2006; FALCONER *et al.*, 1996). É necessário dimensionar as

magnitudes das variâncias de origem genética comparando-as com as variâncias devido ao ambiente, para que seja possível estimar de o potencial de seleção da população (FALCONER *et al*, 1996; HALLAUER *et al.*, 2010). Os fatores do ambiente que contribuem para a formação do fenótipo de um indivíduo não serão repassados para sua descendência, nesse sentido, um dos parâmetros genéticos de maior importância para que um indivíduo contribua na sua população é a herdabilidade.

A herdabilidade (h^2), assim como o coeficiente de determinação genotípica (H^2), expressa a confiabilidade do valor fenotípico como estimador do valor genético. O resultado da seleção baseada no fenótipo dos indivíduos de uma geração é função do grau de associação da variância genética destes com a variância genética da geração seguinte, o que expressa a herdabilidade (FALCONER *et al*, 1996). A herdabilidade é um importante parâmetro para o melhoramento, pois mostra a proporção da variação fenotípica total que é atribuída ao efeito médio dos genes. Quando genitores são escolhidos com base em seu fenótipo, o sucesso na alteração das características da população poderá ser predito através do conhecimento sobre grau de relação entre o valor fenotípico e o genético, que é medido pela herdabilidade (FALCONER *et al*, 1996).

Nos casos em que os genótipos são fixos (toda a população é conhecida), a herdabilidade é substituída pelo coeficiente de determinação genotípica. Isto ocorre por não existir uma variância genética propriamente dita, mas apenas uma variabilidade entre os genótipos, denominada "variabilidade genética" (ϕ_g), sendo o componente quadrático que expressa a variação entre os genótipos (GRIFFITHS, 2008; IDE, 2008).

A partir das variâncias fenotípica (σ^2_F), genética (σ^2_G) e aditiva (σ^2_a), podem-se obter o coeficiente de variação genética ($CV_{G\%}$), coeficiente de variação ambiental ($CV_{E\%}$), índice de variação genético (IV), coeficiente de determinação genotípico (H^2), e herdabilidade no sentido restrito (h^2). A herdabilidade no sentido restrito é importante pois, os genes dominantes para uma característica, quando presentes, podem mascarar a informação genética dos indivíduos, fazendo com que indivíduos de genes diferentes expressem valores genotípicos semelhantes. Dessa forma, a variância aditiva (σ^2_a), é de maior interesse para estudos de evolução e melhoramento genético, pois reflete a proporção da variância genética que responde a seleção natural e artificial, expressando a superioridade que pode ser transmitida à descendência (CRUZ *et al*, 2006; FALCONER *et al*, 1996). A variância aditiva também merece destaque por expressar a similaridade entre indivíduos aparentados, sendo um dos componentes que determina a covariância. Sendo assim, a variância aditiva é

fundamental para um programa de melhoramento que se baseia na covariância existente entre o material experimental avaliado e o material genético repassado para novos ciclos de melhoramento. Tal variância permite inferir sobre os diferentes graus de similaridade entre indivíduos, o que pode ser usado pelos métodos de melhoramento (CRUZ *et al.*, 2006).

O ganho genético depende da herdabilidade do caráter sob seleção, da intensidade de seleção praticada e do controle das condições ambientais. Quanto maior o nível da variabilidade genética em relação ao ambiente e quanto mais a proporção desta variabilidade genética for devida na sua maior parte a efeitos aditivos, maiores serão os ganhos estimados para a geração seguinte (BOTTIGNON *et al.*, 2009; CRUZ *et al.*, 2006).

Sabendo-se que a variação encontrada em uma determinada espécie (variação fenotípica) pode ser de duas origens: variação devido ao ambiente e variação devido a diferenças genéticas, entende-se que a existência de variação genética é um pré-requisito para o melhoramento de plantas (BOTTIGNON *et al.*, 2009). Portanto, torna-se importante quantificar a proporção da variação fenotípica que corresponde ao ambiente e a variação correspondente ao genótipo, para se poder estimar com melhor precisão experimental a resposta dos genótipos nos ambientes testados. Dessa forma, o entendimento das consequências genéticas derivadas de manipulação constitui um importante papel da pesquisa na genética quantitativa (GRIFFITHS, 2008).

É importante ressaltar que ao se efetuar um programa de melhoramento genético, não se deve extrapolar os resultados para populações diferentes da amostra do experimento nem para outras condições de clima (IDE, 2008). Quando as interações do genótipo com o ambiente são significativas, é possível avaliar a estabilidade e adaptabilidade dos genótipos nos diferentes ambientes testados através de modelos biométricos (CRUZ & REGAZZI, 1997).

2.5. Histórico do Programa de Melhoramento Genético de Erva-Cidreira Brasileira da UFRRJ

No Brasil, algumas instituições de pesquisa têm desenvolvido trabalhos de melhoramento genético com a erva-cidreira brasileira. Dentre estas pode-se citar o CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Universidade Federal de Sergipe (UFS) e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

O Programa de melhoramento genético da erva-cidreira brasileira da UFRRJ se iniciou no ano de 2012, com um único objetivo: gerar cultivares comerciais de erva-cidreira brasileira para o Estado do Rio de Janeiro. Inicialmente, após coletas de genótipos em municípios que compõe a região metropolitana do Rio de Janeiro, estruturou-se a primeira coleção de germoplasma da espécie na referida instituição. Esta coleção abrigava apenas 20 clones de erva-cidreira brasileira, organizados em delineamento estatístico em blocos ao acaso com três repetições e seis plantas por parcela. Após caracterização química da coleção, identificou-se nove genótipos de quimiótipo citral entre os 20 existentes. Entre os anos de 2013 e 2014, a coleção foi duplicada, inserindo mais 20 genótipos de erva-cidreira brasileira na coleção, coletados no Estado de Minas Gerais. Além de genótipos do Rio de Janeiro e Minas Gerais, a coleção ainda agrega, atualmente, 3 genótipos provenientes do Espírito Santo. Atualmente, em 2017, a coleção possui 43 genótipos de erva-cidreira brasileira. A duplicação da referida coleção foi parte de uma proposta de projeto de doutorado de Janaína Gonçalves Gomes, discente do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia da UFRRJ. Atualmente, a coleção vem sendo extensamente caracterizada e avaliada, em relação a diversos aspectos morfológicos, agrônômicos, moleculares, reprodutivos, citogenéticos e químicos. No ano de 2015, foi proposto mais um trabalho acadêmico, vinculado ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. Este trabalho resultou na dissertação de mestrado de Carlos Henrique Nascimento Soares. O objetivo foi conhecer o comportamento de nove genótipos de quimiótipo citral quanto ao rendimento, qualidade e produção de óleo essencial, avaliados em duas épocas do ano de 2016. No ano de 2016, mais um trabalho ao nível de doutorado foi agregado ao programa de melhoramento genético da erva-cidreira brasileira na UFRRJ. As atividades propostas na tese, conduzida por Tatiana de Oliveira Pinto, buscam conhecer as causas das barreiras de hibridações existentes na espécie, e por fim, efetuar as recomendações necessárias para a produção de híbridos na cultura. Até o momento, março de 2017, são desenvolvidas duas teses de doutorado, uma dissertação de mestrado (em fase de conclusão) e duas iniciações científicas, financiadas pelo CNPq e FAPERJ.

O grupo de pesquisa em melhoramento genético de erva-cidreira brasileira da UFRRJ conta com o apoio dos seguintes laboratórios de pesquisa: Laboratório de Biologia Molecular e Melhoramento de Plantas (LBMP), sob coordenação do Prof. Pedro Corrêa Damasceno Junior; Laboratório de Extração de Óleos Essenciais, sob coordenação dos Prof.



Figura 4. Genótipos de erva-cidreira brasileira, quimiótipo citral, em delineamento de blocos ao acaso no campo experimental do Departamento de Fitotecnia, pertencente à UFRRJ, em Seropédica, RJ.

Marco André Alves de Souza; e do Laboratório de Análises Químicas, localizado no Instituto de Tecnologia da UFRRJ. Fontes financiadoras como a CAPES, CNPq e FAPERJ tem contribuído para o desenvolvimento da pesquisa em melhoramento genético de erva-cidreira brasileira da UFRRJ.

2.6 Fatores Ambientais e Produção de Óleo Essencial

Os óleos essenciais são compostos voláteis provenientes do metabolismo secundário de plantas, sendo conhecidos também como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Os constituintes químicos mais frequentes na composição de óleo essenciais são os monoterpenos (C_{10}) e os sesquiterpenos (C_{15}). Esses terpenóides são substâncias vegetais que se originam do ácido mevalônico, cuja molécula base são isoprenos (C_5H_8) (EHLERT 2003). As características fenotípicas relacionadas à produção de óleo essencial nas plantas são respostas do controle genético (fatores genéticos), de fatores bióticos e abióticos e da interação entre esses fatores. As diferentes respostas fenotípicas frente a mudanças nas condições ambientais resultam em comportamentos distintos dos genótipos, caracterizando a interação entre o genótipo e o ambiente (YAMAMOTO 2006).

As variações ambientais em que a planta é submetida podem redirecionar sua rota metabólica, ocasionando mudanças na quantidade e na qualidade da biossíntese de metabólitos secundários, como o óleo essencial (GOBBO-NETO & LOPES; 2007, MORAIS, 2009). Alguns dos fatores ambientais que influenciam o rendimento de óleo essencial nas plantas podem variar muito ao longo das estações do ano em uma mesma região, o que pode levar a uma alteração na composição e quantidade do óleo essencial produzido pelas plantas (MORAIS, 2009). Entre os fatores ambientais que influenciam a produção de metabólitos secundários está a temperatura em que as plantas são cultivadas. Lima *et al.* (2003) citam que plantas medicinais tendem a aumentar o rendimento de óleo essencial quando submetidas a temperaturas mais elevadas, além de sofrerem modificações na sua composição química. Morais (2009) também afirma que o rendimento de óleos essenciais é beneficiado por temperaturas mais elevadas, apesar de, plantas expostas a temperaturas extremas podem sofrer perdas de rendimento. A influência da temperatura e da iluminação sobre o rendimento de óleo essencial se deve à atividade fotossintética exercida pelas plantas, pois a interação destes fatores garante um ambiente ideal para o processo fisiológico (KERBAUY, 2004; MORAIS, 2009).

O horário em que é realizada a coleta é um aspecto relevante na produção de óleos essenciais. Ehlert *et al.* (2013) constataram que genótipos de erva-cidreira brasileira apresentaram mudanças significativas na composição química do óleo essencial de acordo com o horário em que era realizada a coleta da biomassa para extração. Nascimento *et al.*, (2006) encontraram efeitos significativos do horário de corte sobre o rendimento do óleo essencial do capim-limão (*Andropogon sp.*), bem como sobre o teor de citral, componente majoritário do seu óleo essencial. Lopes *et al.* (1997), estudando a espécie *Virola sutinamensis* encontraram o pico de produção de monoterpenos às 6:00h e às 21:00h.

A disponibilidade de água pode afetar a produção e o acúmulo dos óleos essenciais em plantas medicinais. Sua falta e seu excesso podem causar efeitos severos no desenvolvimento vegetal. Vários fatores fisiológicos sofrem alterações quando o vegetal é submetido a estresse hídrico, o que pode gerar, conseqüentemente, alterações no metabolismo secundário (KERBAUY, 2004). O excesso de água no solo pode alterar processos químicos e biológicos, limitando a quantidade de oxigênio e acelerando a formação de compostos tóxicos à raiz. Morais (2009) afirma que o estresse hídrico geralmente induz um aumento na produtividade de alguns terpenóides.

3. TRABALHOS

3.1 Rendimento e Produção de Óleo Essencial em Genótipos Citral de Erva-Cidreira Brasileira

3.1.1 Resumo

A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) apresenta potencial de produção de diversos princípios ativos em seu óleo essencial. No entanto, ainda não há genótipos comerciais disponíveis para o plantio. O presente trabalho teve por objetivo conhecer o potencial de produção de genótipos de erva-cidreira brasileira, quimiótipo citral, em duas épocas do ano, em Seropédica, RJ. Também buscou-se estimar parâmetros genéticos e correlação entre variáveis de importância agrônômica. Para tal, nove genótipos de erva-cidreira brasileira foram plantados e organizados em delineamento de blocos casualizados em agosto de 2015. As avaliações ocorreram em fevereiro e agosto de 2016. Foram mensuradas 13 variáveis: altura de planta (ALT), diâmetro de copa (DCO) e ramo principal (DRP), número de ramos na base de planta (NRB), a 10 (NR₁₀) e 50 (NR₅₀) cm de altura na planta, comprimento (CFO) e largura (LFO) de folha e sua relação (RCL), biomassa fresca (BFP) e seca (BSP), rendimento (REN) e produção (PRO) de óleo essencial. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de média. Estimaram-se parâmetros genéticos e coeficientes de correlação entre as variáveis. Para genótipos, houve diferença estatística para DRP, CFO, LFO, REN e PRO. Para época de avaliação, todas as variáveis diferiram, e para interação, apenas a variável REN diferiu. O rendimento e a produção de óleo essencial tiveram determinação genotípica, enquanto que a biomassa foi mais influenciada pelo ambiente. Genótipos com folhas mais largas (LFO) apresentaram menor REN. O genótipo UFRRJ ECB005 destacou-se pelo seu alto rendimento e produção de óleo essencial.

Palavras-chave: *Lippia alba*, melhoramento genético, parâmetros genéticos, coeficientes de correlação, interação genótipo *versus* época.

3.1.2 Abstract

The bushy matgrass (*Lippia alba*) has the potential to produce several active ingredients in its essential oil. However, commercial genotypes are not available. The present work had the objective of know the potential of genotypes of bushy matgrass genotypes, citral chemotype, in two seasons of the year, in Seropédica, RJ. Also was estimated the genetic parameters and correlation between variables of importance. For this purpose, nine genotypes of bushy matgrass were planted and organized in a randomized blocks design in August of 2015. Evaluations occurred in February and August of 2016. Thirteen variables were measured: plant height (ALT), crown (COP) and main branch (NRB) diameter , number of branches in plant base (NRB) at 10 (NR10) and 50 (NR50) cm of height, leaf length (CFO) and leaf width (LFO) and their relationship (RCL), fresh biomass (BFP) and dry matter (BSP), yield (REN) and essential oil production (PRO). Data were submitted to ANOVA and mean test. Genetic parameters and correlation coefficients between the variables were estimated. For genotypes, there was statistical difference for DRP, CFO, LFO, REN and PRO. For the evaluation period, all variables differed, and for interaction, only the REN variable differed. The yield and production of essential oil had genotypic determination, while the biomass was more influenced by the environment. Genotypes with larger leaves (LFO) presented lower REN. Genotype UFRRJ ECB005 stands out for its high yield and essential oil production.

Keywords: *Lippia alba*, Genetic improvement, genetic parameters, correlation coefficients, genotype *versus* environment interaction.

3.1.3 Introdução

O mercado mundial de óleos essenciais movimentou em 2015 um montante superior a 6 bilhões de dólares em produtos destinados às indústrias de alimentos, de cosméticos, de perfumaria e de higiene pessoal (GRAND VIEW RESEARCH, 2016). O Brasil é o quarto maior exportador de óleo essencial no mundo (BIZZO *et al.*, 2009). Porém, grande parte desta produção está fundamentada no óleo essencial de apenas uma única espécie, a laranja. Diante do crescimento pela demanda deste produto no mundo (GRAND VIEW RESEARCH, 2016) e pela reduzida diversificação da exportação brasileira, observa-se uma excelente oportunidade de negócios na cadeia de produção de óleo essencial.

Uma das espécies aromáticas mais utilizadas para a produção de óleo essencial no mundo é a erva-cidreira brasileira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown) (FRANZ & NOVAK, 2010). Esta espécie pertence à família Verbenaceae, e caracteriza-se por ser um pequeno arbusto, alógamo, semi-perene, via de regra, muito ramificado, com folhas cujo tamanho variam conforme o genótipo. Suas folhas possuem propriedades medicinais e são recomendadas na medicina popular para o tratamento de problemas de saúde como hipertensão, cólica estomacal, gripe e como calmante (OLIVEIRA & MENINI NETO, 2012). Dentro da espécie observa-se uma elevada variabilidade genética quanto ao perfil químico de seu óleo essencial (BLANK *et al.*, 2015; HENNEBELLE *et al.*, 2008). De acordo com Hennebelle *et al.* (2008) podem ser encontrados seis diferentes quimiótipos em erva-cidreira brasileira. Essa diversidade química proporciona a erva-cidreira diferentes destinos para o seu óleo essencial, como para indústrias químicas, farmacêuticas, de domissanitários, de cosméticos e para a população em geral. Sem dúvida um dos quimiótipos mais importantes e comuns na erva-cidreira brasileira é o citral. Além desta espécie, o citral ocorre em várias outras espécies, como por exemplo, capim-limão (*Cymbopogon citratus*), eucalipto (*Eucalyptus staigeriana*), manjeriço (*Ocimum* sp.) e citros (*citrus* spp.) (SELL, 2010).

De acordo com Bizzo *et al.* (2009), no geral, a produção de óleo essencial no Brasil apresenta oscilações quanto ao seu padrão de qualidade. Essas variações podem estar relacionadas tanto com o rendimento quanto a qualidade em relação ao seu perfil químico. De acordo com Stefanini *et al.* (2002), programas de melhoramento de espécies medicinais, no geral, não se devem priorizar somente a produção quantitativa de biomassa por hectare, mas também deve-se levar em consideração principalmente o rendimento e a riqueza dos princípios ativos contidos no óleo essencial. Variações em relação ao seu rendimento durante

as épocas do ano são comuns, já que a produção de óleo essencial apresenta uma forte interação genótipo *versus* ambiente (BARROS *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2002; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2005;).

Neste sentido, a seleção de genótipos de erva-cidreira brasileira estáveis para rendimento de óleo essencial durante o ano é primordial para se alcançar ou manter a qualidade da produção de óleo essencial no Brasil. Aliado a isso, a estabilidade para produção de biomassa nos genótipos selecionados com alto rendimento de óleo é também uma variável que deve ser considerada nos programas de melhoramento da espécie. A biomassa é um dos principais componentes de produção na espécie. Apesar do grande potencial agrícola da erva-cidreira brasileira, não há até o momento, no Brasil, materiais genéticos recomendados para o plantio (MAPA, 2017).

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foi avaliar genótipos de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) pertencentes ao quimiótipo citral quanto a produção e a estabilidade de produção de óleo essencial em duas épocas distintas do ano, fevereiro e agosto de 2016. Objetivou-se também, através da estimação de parâmetros genéticos e coeficientes de correlação, conhecer a variação, a relação e a estabilidade das variáveis utilizadas na avaliação dos genótipos estudados.

3.1.4 Material e métodos

Local da pesquisa e material vegetal

Toda a pesquisa foi conduzida nas dependências do Departamento de Fitotecnia, pertencente ao Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), *campus* de Seropédica, RJ. O material vegetal trabalhado correspondeu a genótipos citral selecionados a partir da coleção de germoplasma de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) do referido departamento.

Os genótipos citral de erva-cidreira brasileira utilizados foram: UFRRJ ECB001, UFRRJ ECB002, UFRRJ ECB005, UFRRJ ECB011, UFRRJ ECB012, UFRRJ ECB015, UFRRJALA18, UFRRJ ECB019 e UFRRJ ECB020.

Condições experimentais e épocas de coleta de dados

O experimento foi instalado em delineamento em blocos ao acaso com nove tratamentos (genótipos UFRRJ), três repetições e 6 plantas por parcela. O espaçamento utilizado foi 1,2 x 1,2 metros. A área experimental possui solo classificado como planossolo

háplico, com 83% de areia, 4% de argila e 13% de silte. De acordo com a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw, com alternância entre a estação chuvosa no verão e seca durante o inverno.

Ao todo, foram realizadas duas coletas de dados. A primeira ocorreu na segunda quinzena de fevereiro de 2016, após 180 dias de plantio. A segunda coleta, foi realizada na primeira quinzena de agosto do mesmo ano, após 370 dias do plantio. A primeira coleta representou o verão, e a segunda, o inverno. A Figura 5 reflete algumas condições climáticas durante o período de condução do presente experimento. No decorrer do experimento foram realizadas 7 capinas manuais, sendo 3 antes da primeira avaliação e 4 entre a primeira e a segunda avaliação. Realizou-se também adubação química NPK (10:10:10) em 4 momentos, a saber: 40 dias antes do plantio, 40 dias antes de cada uma das duas avaliações e 40 dias depois da primeira avaliação.

Variáveis analisadas

No presente trabalho foram avaliadas variáveis relacionadas aos aspectos morfológicos e de produção. As relacionadas à morfologia das plantas foram: altura de planta (ALT) – distância medida em centímetros entre a base do caule e o ramo mais alto na planta; diâmetro de copa (COP) – distância medida em centímetros entre os dois ramos mais distantes na copa da planta; diâmetro do ramo principal (DRP) – diâmetro medido em centímetros na base do caule; número de ramos na base da planta (NRB) – contou-se o número de ramos na base da planta; número de ramos a 10 cm de altura (NR₁₀) – contou-se o número de ramos a uma altura de 10 centímetros da base da planta; número de ramos a 50 cm de altura (NR₅₀) – contou-se o número de ramos a uma altura de 50 centímetros da base da planta; comprimento da folha (CFO) – distância medida em centímetros entre a base do pecíolo e a extremidade mais aguda da folha. O CFO por planta foi calculado a partir da média de 10 folhas na planta; largura da folha (LFO) – distância medida entre uma extremidade e outra da folha. O LFO por planta é calculado a partir da média de 10 folhas na planta; relação comprimento *versus* largura de folha (RCL) – foi calculado dividindo-se o CFO pela LFO.

As variáveis relacionadas às análises de produção foram: biomassa fresca por planta (BFP) – para tal foram colhidas e pesadas todas as folhas e flores de todas as seis plantas na parcela experimental. BFP, em gramas por planta, foi obtido dividindo-se o peso da

biomassa fresca, em gramas, por seis; biomassa seca por planta (BSP) – após pesagem da

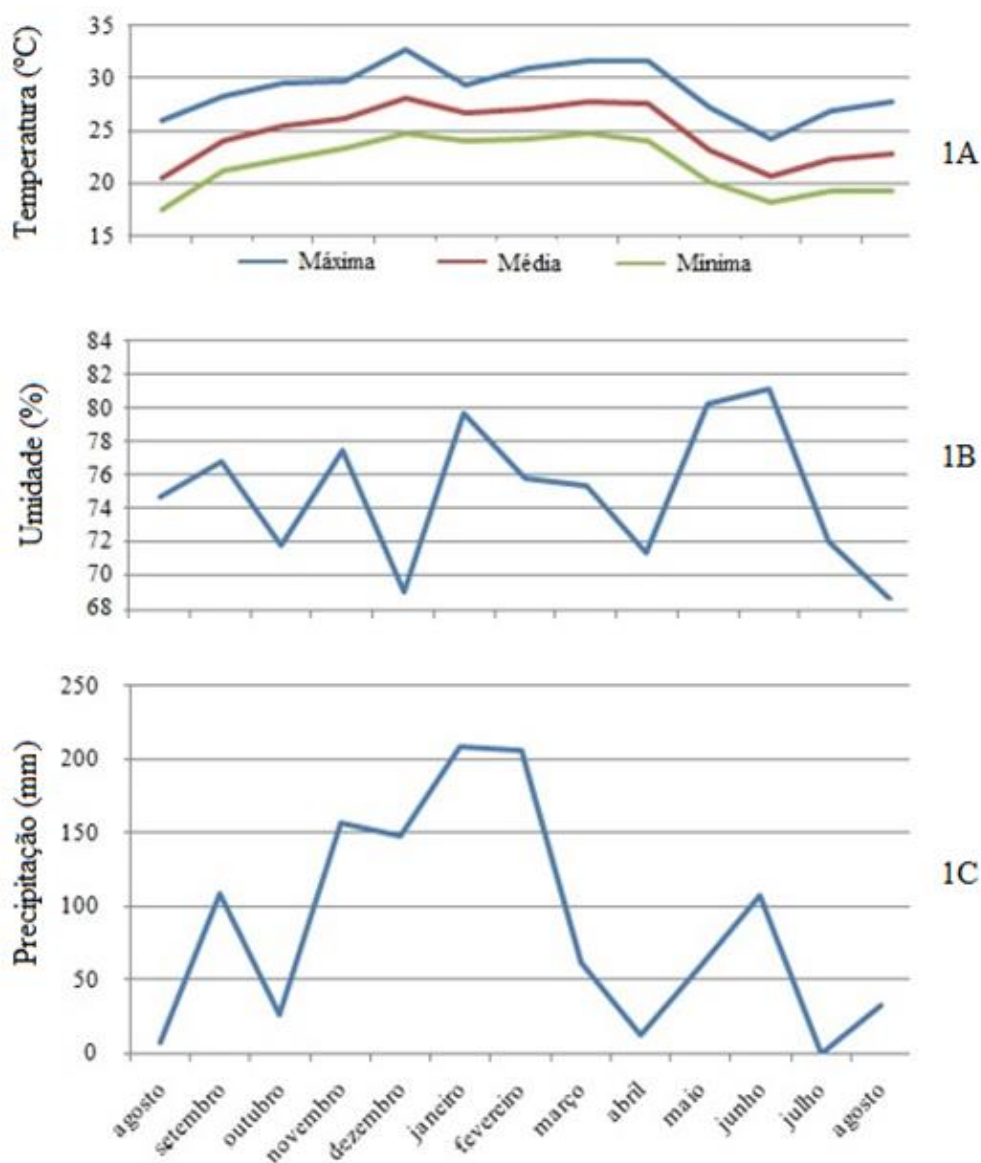


Figura 5. Dados meteorológicos referentes ao período de agosto a dezembro de 2015 e janeiro a agosto de 2016, obtidos a partir das estações convencional (83741) e automática pertencentes ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), no de Seropédica (22°45'13''S e 43°40'23''W), RJ. Figura 1A: temperaturas mínimas, médias e máximas; Figura 1B: umidade relativa em porcentagem; Figura 1C: precipitação em milímetros.

biomassa fresca por planta (BFP), todo o material vegetal foi colocado para secar em estufa com circulação forçada de ar (Eletrolab EL 402, Brasil) à 37 °C por 48h, até verificação de peso constante do material vegetal a partir de pesagens constantes de 12 em 12 horas. BSP, em gramas por planta, foi obtido dividindo-se o peso da biomassa seca, em gramas, por seis; porcentagem de rendimento de óleo essencial (REN) – inicialmente, separou-se três alíquotas de 30 gramas de massa seca de folhas por parcela dentro de genótipo, assim como

feito para BSP. Em seguida, essas alíquotas foram submetidas a extração de óleo essencial via hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado durante uma hora e meia (1:30 horas). Após esse tempo, o perfil do óleo essencial juntamente com o hidrolato foi retirado do equipamento usando-se 10 mL do solvente diclorometano. A fase orgânica (solvente mais óleo essencial) foi filtrada em sulfato de sódio anidro, e o solvente foi posteriormente eliminado com o auxílio de fluxo de gás nitrogênio. Frascos previamente pesados e identificados foram utilizados para se aferir o peso do óleo essencial resultante da secagem por diferença de peso em balança de precisão (Shimadzu AUX, Japão). Após a pesagem os frascos foram lacrados e armazenados em freezer (Brastemp FrostFree, Brasil) à -4°C. REN, em porcentagem, foi obtido dividindo-se o peso do óleo essencial resultante da extração pelo peso de massa seca utilizado na extração, cujo resultado foi multiplicado 100; produção de óleo essencial por planta (PRO) – foi obtido multiplicando-se BSP por REN dividido por 100. Todos os dados obtidos foram trabalhados em média por blocos.

Análises estatísticas

Inicialmente, todas as variáveis foram submetidas ao teste Lilliefors para verificação de normalidade. Após os testes, verificou-se que apenas a variável diâmetro de copa (DCO) não seguiu distribuição normal. Por isso, esta foi transformada pelo estimador $(1/x).100$, sendo “x”, cada valor de DCO. Em seguida, todas as variáveis foram submetidas à análise da variância (ANOVA), com modelo fixo ajustado para o delineamento em blocos ao acaso no esquema fatorial, contendo 9 tratamentos (genótipos), duas épocas de avaliação (fevereiro e agosto de 2016) e três repetições (blocos). Conforme necessidade, aplicou-se o teste de média DMS_t (Diferença Mínima Significativa). Segue abaixo o modelo estatístico utilizado:

$$Y_{ijk} = \mu + b_k + g_i + a_j + ga_{ij} + e_{ijk}, \text{ onde:}$$

Y_{ijk} = valor observado referente ao i-ésimo genótipo do j-ésimo nível (ambiente) na k-ésimo repetição.

μ = constante geral;

b_k = efeito da k-ésima repetição

g_i = efeito fixo do i-ésimo genótipo;

a_j = efeito fixo da j-ésima época

ga_{ij} = efeito da interação do i-ésimo genótipo com a j-ésima época

e_{ijk} = erro experimental associado à observação Y_{ijk} .

Quadro 1. Esquema da análise de variância das características referentes a 9 genótipos da espécie *Lippia alba* avaliadas em duas épocas (verão e inverno) em Seropédica, RJ.

FV	GL	QM	E(QM)	F
Blocos	b-1	QMb	$\sigma^2 + g.e.\sigma_b^2$	
Genótipo (G)	g-1	QMg	$\sigma^2 + e.r.\phi_g$	QMg/QMr
Época (E)	e-1	SQe	$\sigma^2 + g.r.\phi_e$	QMe/QMr
G x E	(g-1) x (e-1)	SQge	$\sigma^2 + r.\phi_{ge}$	QMge/QMr
Resíduo	(g x e-1) x (b-1)	QMr	σ^2	

A partir das estimativas obtidas na análise de variância estimaram-se os seguintes parâmetros genéticos para cada uma das variáveis morfológicas e de produção:

. Coeficiente de variação experimental:

$$CV = (100\sqrt{\sigma^2})/\mu$$

. Coeficiente de variação genotípico:

$$CVg = (100\sqrt{\sigma_g^2})/\mu$$

. Coeficiente de determinação genotípico:

$$H^2 = \frac{(QMg - QMr)}{QMg}$$

. Índice de variação genético:

$$IV = CVg/CV$$

A partir da covariância e do desvio padrão das variáveis foi obtida a correlação de Pearson entre todas as variáveis morfológicas e de produção. Segue abaixo o estimador:

$$r = \frac{Cxy}{Sx*Sy}, \text{ onde:}$$

r = Coeficiente de correlação de Pearson

Cxy = Covariância das variáveis x e y

S_x = Desvio padrão da variável x

S_y = Desvio padrão da variável y

Todas as análises foram realizadas no Programa GENES, versão 2007.0.0 (CRUZ, 2007).

3.1.5 Resultados e discussão

Com base nas análises de variância (Tabela 1), observa-se que para a fonte de variação tratamento, as variáveis rendimento de óleo essencial (REN), produção de óleo essencial por planta (PRO), diâmetro de ramo primário (DRP), comprimento de folha (CFO), largura de folha (LFO) e relação comprimento *versus* largura de folha (RCL) foram estatisticamente distintas pelo Teste F. Por outro lado, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos quando consideradas as variáveis biomassa fresca (BFP), biomassa seca (BSP), diâmetro de copa (COP), número de ramos contados à 10 cm de altura (NR_{10}), número de ramos contados à 50 cm de altura (NR_{50}) e número de ramos contados na base da planta (NRB). Portanto, características relacionadas à produção de biomassa (BFP e BSP), ao porte ou arquitetura da planta (ALT e COP) e ao número de ramos (NR_{10} , NR_{50} e NRB) não foram estatisticamente diferentes entre os genótipos, independente da época de avaliação. Para variáveis relacionadas à produção de óleo essencial (REN e PRO), folha (CFO, LFO e RCL) e diâmetro de ramo (DRP) houve diferença estatística entre os genótipos.

Considerando o efeito de época nota-se que para todas as variáveis houve diferença estatística pelo Teste F (Tabela 1). Vale destacar que as plantas colhidas na primeira época de avaliação (fevereiro de 2016) apresentaram vigor inferior ao da segunda época (agosto de 2016). Além da influência de questões relacionadas ao clima, o vigor superior na segunda colheita pode ter sido ocasionado também pela poda drástica realizada durante a primeira colheita, resultante do próprio procedimento de colheita da biomassa. Essa poda pode ter favorecido uma maior emissão de ramos e, portanto, maior produção da biomassa e maior produção de óleo na segunda época de avaliação (Tabela 1). Portanto, a referida poda pode ter contribuído de forma decisiva no desenvolvimento das plantas no campo.

Na Tabela 1 pode-se observar que a média geral do número de ramos e da biomassa fresca e seca foi superior na segunda época de avaliação, quando comparado com a primeira. O número médio de ramos contados na base da planta (NRB), aos 10 cm de altura (NR_{10}),

Tabela 1. Resumo da ANOVA e parâmetros genéticos para 13 variáveis de 9 genótipos de *Lippia alba* pelo do modelo de fatorial.

FV	GL	Quadrados médios												
		BFP	BSP	REN	PRO	ALT	COP	DRP	NR ₁₀	NR ₅₀	NRB	CFO	LFO	RCL
Bloco	2	2927,40	37,97	0,002	0,005	490,77	3,22	0,17	10,56	3,38	1,51	0,08	0,04	0,004
Genótipo (G)	8	3746,90 ^{NS}	283,07 ^{NS}	0,069 ^{**}	0,025 ^{**}	360,75 ^{NS}	4,56 ^{NS}	0,22 ^{**}	2,53 ^{NS}	5,38 ^{NS}	1,74 ^{NS}	0,60 [*]	0,15 [*]	0,047 ^{**}
Época (E)	1	222667,43 ^{**}	17833,49 ^{**}	0,848 ^{**}	0,054 ^{**}	4816,47 ^{**}	31,47 ^{**}	0,40 [*]	43,43 ^{**}	15,11 [*]	48,18 ^{**}	15,60 ^{**}	0,40 ^{**}	0,614 ^{**}
G x E	8	3056,00 ^{NS}	262,24 ^{NS}	0,015 ^{**}	0,009 ^{NS}	172,23 ^{NS}	4,43 ^{NS}	0,05 ^{NS}	2,09 ^{NS}	3,65 ^{NS}	1,59 ^{NS}	0,09 ^{NS}	0,04 ^{NS}	0,017 ^{NS}
Resíduo	34	3380,88	239,45	0,002	0,005	204,55	2,99	0,06	2,35	2,57	1,19	0,22	0,05	0,013
Média geral		145,60	46,44	0,51	0,21	122,07	152,06	1,85	5,94	5,53	3,68	7,37	3,37	2,19
Média fevereiro		81,39	28,27	0,63	0,18	131,51	140,37	1,76	5,04	5,00	2,74	6,83	3,29	2,08
Media agosto		209,82	64,62	0,38	0,25	112,62	163,75	1,94	6,83	6,06	4,63	7,91	3,46	2,29
CV _(%)		39,93	33,31	9,90	34,49	11,71	24,99	14,00	25,80	28,97	29,60	6,37	6,64	5,30
H ² _(%)		9,76	15,40	96,33	78,52	43,29	33,66	69,64	7,16	52,22	31,74	63,44	66,95	71,41
CV _{g(%)}		5,36	5,80	20,73	27,31	4,17	7,28	8,66	2,92	8,24	8,24	3,42	3,86	3,42
IV _g		0,13	0,17	2,09	0,78	0,35	0,29	0,61	0,11	0,27	0,27	0,53	0,58	0,64

Legenda: ^{NS}: Não há diferença estatística significativa; ^{*}: Diferença estatística à 5%; ^{**}: Diferença estatística à 1%; CV_(%): Coeficiente de variação; H²: Coeficiente de determinação genotípico; CV_{g(%)}: Coeficiente de variação genético; IV: Índice de variação; BFP : Biomassa fresca (g); BSP : Biomassa seca (g); REN: Rendimento de óleo essencial (%); PRO: Produção de óleo essencial (g); ALT: Altura de planta; COP: Diâmetro de copa; DRP: Diâmetro de ramo principal; NR₁₀: Número de ramos à 10 cm de altura; NR₅₀: Número de ramos à 50cm de altura; NRB: Número de ramos na base; CFO: Comprimento de folha; LFO: Largura de folha; RCL: CFO/LFO.

e aos 50 cm de altura (NR₅₀), na primeira época e na segunda época, foram, respectivamente, de 2,74 e 4,63 ramos, 5,04 e 6,83 ramos, e 5,0 e 6,06 ramos. Quanto à biomassa fresca (BFP), na primeira e na segunda época, o peso médio foi estimado, respectivamente, em 81,39 e 209,82 gramas por planta. Para a biomassa seca (BSP), os valores foram de 28,27 e 64,62 gramas por planta, respectivamente. De acordo com Bottignon *et al.* (2011) a produção média de biomassa seca em genótipos linalol de erva-cidreira brasileira foi de 34 gramas por planta. Porém, Yamamoto *et al.* (2008) e Jannuzzi *et al.* (2011) observaram médias superiores de biomassa seca por planta, da ordem de, respectivamente, 95,6 e 198 gramas por planta.

No presente trabalho, a produção de óleo essencial (PRO) foi estimada em 0,18 e 0,25 gramas por planta, respectivamente, para nas avaliações de fevereiro e agosto (Tabela 1). É notório a presença de médias mais altas para a produção de óleo essencial, biomassa e número de ramos na segunda colheita (Tabela 1). Jannuzzi *et al.* (2011) observaram produção média de 0,47 gramas de óleo essencial por planta, em quimiótipos citral de erva-cidreira brasileira. Possivelmente, o alto incremento na produção se deve a alta produção de biomassa seca, citada anteriormente, já que a média de rendimento de óleo essencial informada por estes autores não foi alta (0,28%).

A altura de plantas também pode ser entendida como um componente relacionado ao vigor da planta. Porém, no presente caso, o aumento da média geral da altura da planta (variável ALT) (Tabela 1) foi maior na primeira época, e não na segunda, como notado para as variáveis BSP, BFP, NRB, NR₁₀, NR₅₀ e PRO. Na Tabela 1 é possível observar as médias gerais de ALT, respectivamente de 131,51 e 112,62 cm, em fevereiro e agosto. Possivelmente, a menor altura, numa época de maior vigor das plantas pode ser atribuída ao hábito arbustivo da espécie, que começou a se manifestar mais intensivamente quando na época em que as plantas atingiram maior vigor ou biomassa. Nesta situação, as plantas se prostraram após atingirem determinada altura, o que as fez, de forma geral, apresentar, simultaneamente, maior biomassa e menor estatura, resultando num porte mais acamado. Em se tratando de porte de planta em erva-cidreira brasileira, vale informar que o porte ereto é uma característica importante quando se busca a redução dos custos de produção na espécie. O porte ereto pode contribuir na redução ou eliminação da tutoragem das plantas, já que estas, na maioria das vezes, acamam. O porte ereto também pode contribuir na redução da incidência de doenças foliares, visto que, neste caso, os ramos tendem a não encostar-se

ao solo. Descritores que avaliam o porte das plantas em erva-cidreira brasileira, ainda precisam ser desenvolvidos.

Apesar dos efeitos de época ter sido visíveis, os genótipos comportaram-se de forma idêntica na primeira e segunda colheita, exceção apenas para a variável rendimento de óleo essencial (REN). Esta variável foi a única que apresentou diferença estatística significativa para o efeito de interação genótipo *versus* época (Tabela 1).

As médias gerais de REN foram estimadas em 0,63 e 0,38%, respectivamente, para a primeira e segunda época de avaliação, ou seja, em fevereiro e agosto de 2016 (Tabela 2). No caso de REN, as maiores médias foram observadas em fevereiro, ou seja, no verão. Tavares *et al.* (2005) encontraram rendimentos de óleo essencial variando entre 0,30 e 0,60% no verão, e 0,15 e 0,30%, no inverno em genótipos de erva-cidreira brasileira. Silva *et al.* (2006) relataram valores mínimos de 0,12 e máximo de 0,19% para o rendimento de óleo em genótipos citral de erva-cidreira brasileira. Jannuzzi *et al.* (2008) estimaram o rendimento de óleo em 0,28% em erva-cidreira brasileira pertencentes ao quimiótipo citral. Em quimiótipos linalol de erva-cidreira brasileira, Barros *et al.* (2009), também obtiveram maiores rendimentos de óleo essencial no verão, em São Luiz Gonzaga, RS. Silva *et al.* (2006), em Ilhéus, BA, também argumentam que, em quimiótipos citral de erva-cidreira brasileira, os maiores rendimentos de óleo essencial ocorreram no verão. Vale destacar novamente, que além do rendimento de óleo essencial (REN), apenas a variável altura de plantas (ALT) apresentou média superior no verão (Tabela 1).

De forma geral, quando se compara os resultados sobre o rendimento de óleo essencial aqui obtidos com os que são apresentados na literatura, observa-se que os rendimentos do presente trabalho foram relativamente altos. Verificou-se tendência inversa, ao comportamento de REN, nas variáveis produção de óleo essencial (PRO), biomassa (BSP e BFP) e número de ramos (NR₁₀, NR₅₀ e NRB), cujas médias superiores ocorreram no inverno, em agosto, e não em fevereiro, no verão.

O rendimento de óleo essencial (REN) apresentou elevado coeficiente de determinação genotípico ($H^2 = 96,36\%$) (Tabela 1), indicando que a influência genética prevalece sobre a de ambiente. Os valores dos coeficientes de determinação por época, fevereiro e agosto, indicaram a mesma tendência, sendo estimados, respectivamente, em 94,44 e 93,71% (Tabela 2). Bottignon *et al.* (2011) e Izadi-darbandi *et al.* (2013) também encontraram maior influência genotípica sobre o rendimento de óleo, respectivamente, em

Tabela 2. Resumo da análise de variância e parâmetros genéticos para a variável rendimento de óleo essencial (REN) nas duas épocas de avaliação, fevereiro (verão) e agosto (inverno).

FV	GL	Quadrados Médios	
		Fevereiro	Agosto
Bloco	2	0,004	0,001
Tratamento	8	0,044**	0,040**
Resíduo	16	0,002	0,002
Média		0,63	0,38
Máximo		1,00	0,68
Mínimo		0,44	0,20
CV _(%)		7,83	13,12
H ² _(%)		94,44	93,71
CV _g (%)		18,64	29,26
IV _g		2,38	2,22

Legenda: ** Diferença estatística à 1%; CV_(%) Coeficiente de variação; ϕ g Variabilidade genotípica; H² Coeficiente de determinação genotípico; CV_g(%) Coeficiente de variação genético; IV_(%) Índice de variação.

erva-cidreira brasileira e funcho (*Foeniculum vulgare*).

As variáveis produção de óleo essencial (PRO) (H² = 78,52%), relação comprimento *versus* largura de folha (RCL) (H² = 71,41%) e diâmetro de ramo principal (DRP) (H² = 69,64%) (Tabela 1) alcançaram estimativas para H² que demonstraram maior efeito genético sobre a característica. Além destas, as variáveis comprimento e largura do limbo foliar (respectivamente, CFO e LFO) apresentaram estimativas de H² indicando também maior influência genética sobre a característica, com H² estimados em 63,44 e 66,95%, respectivamente. A variável número de ramos acima de 50 cm (NR₅₀) teve o H² estimado em 52,22%. Porém, forte influência do ambiente foi notada para as variáveis altura de planta (ALT) (H² = 43,29%), copa da planta (COP) (H² = 33,66%), número de ramos contados na base da planta (NRB) (H² = 31,74%), biomassa fresca (BFP) (H² = 9,76%), biomassa seca (BSP) (H² = 15,40%) e número de ramos contados aos 10 cm de altura (NR₁₀) (H² = 7,16%) (Tabela 1).

Diante do exposto, supõe-se que existam boas perspectivas na seleção de plantas quando se pretende o aumento da produção de óleo essencial em erva-cidreira brasileira, visto que importantes variáveis diretamente relacionadas à produção foram mais

influenciadas por fatores genéticos do que ambientais. Entre estas variáveis estão a própria produção de óleo e o rendimento de óleo essencial. Exceção para a biomassa (BFP e BSP), que se mostrou bastante influenciada por questões relacionadas ao ambiente. De forma geral, as variáveis que influenciam diretamente na produção da biomassa também se apresentam com forte influência do ambiente. Como exemplo, cita-se a altura e diâmetro da copa de plantas, bem como as variáveis relacionadas ao número de ramos nas plantas (NRB e NR₁₀), exceção para o NR₅₀. Tais variáveis conduziram para a ocorrência de uma instabilidade na produção de folhas, juntamente com a biomassa fresca e seca. Vale lembrar que as folhas correspondem ao principal órgão da planta utilizado na extração do óleo essencial em erva-cidreira brasileira. Percebe-se que no caso das variáveis relacionadas diretamente às folhas (comprimento e largura, respectivamente, CFO e LFO), a influência genética foi maior que a do ambiente, porém, as estimativas de H² não foram tão altas quanto às variáveis relacionadas diretamente ao óleo essencial (Tabela 1).

As estimativas dos índices de variação (IV) indicaram que o rendimento de óleo essencial (REN) e a produção de óleo essencial (PRO) foram as características de maior variabilidade genética entre os genótipos estudados. Os índices foram estimados em 2,09 e 0,78, respectivamente. Vale informar que valores de IV próximos a zero indicam baixa variabilidade genética. Destaque deve ser dado ao rendimento de óleo essencial (REN), o qual exibiu alta variabilidade genética entre os genótipos. Neste caso, como houve efeito de interação genótipo *versus* ambiente, por isso, é razoável mencionar os índices de variação estimados tanto no verão quanto no inverno. Estas estimativas foram de 2,38 e 2,22%, respectivamente (Tabela 2). Aliado ao controle genético favorável a seleção de plantas - dado pelas altas estimativas de H² e altos IV's -, o rendimento de óleo essencial exibiu ampla oportunidade para o seu incremento. Portanto, a seleção de genótipos estáveis para alto rendimento de óleo essencial pode ser perfeitamente alcançada.

Considerando a variável rendimento de óleo essencial (REN), nota-se na Tabela 2 que houve diferença estatística significativa para o efeito de genótipo, tanto na primeira época de avaliação quanto na segunda, respectivamente, fevereiro e agosto de 2016. Observa-se na Tabela 3 que o genótipo UFRRJ ECB005, em fevereiro de 2016, foi estatisticamente superior aos demais para o rendimento de óleo essencial (REN). Já em agosto do mesmo ano, o genótipo UFRRJ ECB015 apresentou a maior média para REN. Porém, o UFRRJ ECB005, com maior média em fevereiro, não se diferenciou estatisticamente

Tabela 3. Teste de médias para 6 variáveis de 9 genótipos de *Lippia alba* avaliadas em duas épocas, fevereiro (verão) e agosto (inverno) em Seropédica, RJ, onde a variável REN foi a única que apresentou interação entre genótipo e ambiente.

	REN		PRO	DRP	CFO	LCF	RCL
	Fevereiro	Agosto					
UFRRJ ECB001	0,58bc	0,32cd	0,20cd	1,97abc	7,66a	3,44ab	2,22ab
UFRRJ ECB002	0,63b	0,37bcd	0,26abc	2,14a	7,72a	3,47ab	2,22ab
UFRRJ ECB005	0,91a	0,49ab	0,31a	1,54d	7,47ab	3,22bc	2,31 ^a
UFRRJ ECB011	0,62b	0,32cd	0,22bcd	2,09ab	7,56a	3,56a	2,12bc
UFRRJ ECB012	0,45c	0,22d	0,12e	1,69cd	7,13ab	3,37ab	2,12bc
UFRRJ ECB015	0,65b	0,63a	0,29ab	1,87abcd	6,89b	3,07c	2,25ab
UFRRJ ECB018	0,61b	0,34cd	0,15de	1,75bcd	7,5ab	3,29abc	2,27ab
UFRRJ ECB019	0,58bc	0,36bcd	0,17de	1,81abcd	7,51ab	3,55a	2,11bc
UFRRJ ECB020	0,66b	0,39bc	0,16de	1,76bcd	6,89b	3,37ab	2,05c
Médias	0,63	0,38	0,21	1,85	7,37	3,37	2,19

Legenda: Médias nas colunas seguidas da mesma letra não diferiram estaticamente ao nível 5% pelo teste Tukey, REN Rendimento de óleo essencial (%); PRO Produção de óleo por planta (g); DRP Diâmetro de ramo primário; CFO Comprimento de folha; LFO Largura de folha; RCL Relação entre comprimento e largura de folha.

do UFRRJ ECB015 em agosto, portanto, estatisticamente, o genótipo UFRRJ ECB005 (Figura 6) se manteve também em agosto, entre os mais altos rendimentos de óleo essencial entre os genótipos analisados. Na Tabela 3 é possível observar que o genótipo de menor rendimento (REN) em fevereiro apresentou 0,45%, o maior, 0,91%, respectivamente, para os genótipos UFRRJ ECB012 e UFRRJ ECB005. Em agosto, o genótipo de menor REN apresentou 0,22, e o de maior, 0,63%, respectivamente, para os genótipos UFRRJ ECB012

e UFRRJ ECB015. Como já mencionado anteriormente, Yamamoto *et al.* (2008), estimaram o rendimento de óleo essencial em 0,28% em erva-cidreira brasileira considerando diferentes quimiótipos. Porém, deve-se destacar que o menor valor para o rendimento de óleo encontrado pelos autores anteriormente citados foi 0,27%, e o maior, de 1,22%, respectivamente para os quimiótipos citral e linalol.

As características relacionadas à ramificação (DRP, NR₁₀ e NR₅₀) apresentaram coeficientes de correlação de 0,46, 0,43 e 0,54 com a biomassa seca (BSP) (Tabela 4). Espera-se sempre que a biomassa seca esteja altamente correlacionada com a produção de



Figura 6. Genótipo de erva-cidreira brasileira (UFRRJ ECB005) pertencente ao banco de germoplasma da UFRRJ com 150 dias de campo, em Seropédica, RJ.

ramos na planta. Porém, a presente pesquisa mostrou que o aumento do número de ramos na planta não resultou num aumento proporcional de biomassa (folhas) nas plantas. Dessa forma, análises relacionadas ao comprimento do internódio devem ser implementadas, pois, possivelmente, este seja um descritor que irá contribuir para um melhor entendimento na emissão de folhas no ramo das plantas de erva-cidreira brasileira. Deve se ter muito cuidado em se analisar plantas estioladas no campo. O estiolamento pode ser proveniente de plantas

que se desenvolvem sob ambiente de estresse, principalmente, por competição com plantas espontâneas.

Apesar de não significativo, vale informar que a correlação entre o número de ramos na base (NRB) com biomassa fresca (BFP e BSP), REN e PRO foram muito baixas. Interessante foi observar que genótipos com folhas mais largas (LFO) tenderam a apresentar uma redução no rendimento de óleo (REN). A correlação entre LFO e REN foi estimada em -0,45. A média geral para o LFO foi de 3,37 cm. Deve-se informar que os genótipos UFRRJ ECB011 e UFRRJ ECB019 apresentaram as maiores médias para o LFO, respectivamente de

Tabela 4. Correlação Fenotípica dos dados de época conjunta (verão e inverno) para 13 variáveis avaliadas em 8 genótipos de *Lippia alba*.

	BFP	BSP	REN	PRO	ALT	COP	DRP	NR ₁₀	NR ₅₀	NRB	CFO	LFO	RCL
BFP	1,0	0,84**	0,02	0,47*	0,29	0,24	0,23	0,20	0,49**	0,19	0,19	0,23	-0,06
BSP		1,0	0,05	0,67**	0,35	0,46*	0,46*	0,43*	0,54**	0,19	0,09	0,07	0,02
REN			1,0	0,72**	-0,27	0,46*	-0,18	0,03	-0,20	0,06	-0,12	-0,45*	0,41*
PRO				1,0	0,07	0,62**	0,30	0,36	0,25	0,11	-0,02	-0,33	0,38*
ALT					1,0	0,15	0,16	0,29	0,38	0,02	0,16	0,27	-0,14
COP						1,0	-0,02	0,44*	0,19	0,30	-0,11	-0,49**	0,44*
DRP							1,0	0,16	0,51**	-0,41*	-0,07	0,05	-0,13
NR ₁₀								1,0	0,57**	0,59*	-0,00	-0,20	0,24
NR ₅₀									1,0	0,18	0,21	0,23	-0,05
NRB										1,0	-0,06	-0,13	0,09
CFO											1,0	0,60**	0,38*
LFO												1,0	-0,51*
RCL													1,0

*Significativo ao nível de 5%; **Significativo ao nível de 1%; BFP Biomassa fresca por planta; BSP Biomassa seca por planta; REN Rendimento de óleo essencial; PRO Produção de óleo essencial; ALT Altura de planta; COP Diâmetro de copa; DRP Diâmetro de ramo principal; NR₁₀ Número de ramos à 10 cm de altura; NR₅₀ Número de ramos à 50cm de altura; NRB Número de ramos na base; CFO Comprimento de folha; LFO Largura de folha; RCL Relação entre comprimento e largura de folha.

3,56 e 3,55 cm (Tabela 3). Porém, vale ressaltar, que estes genótipos não diferiram estatisticamente de UFRRJ ECB001, UFRRJ ECB002, UFRRJ ECB012, UFRRJ ECB018 e UFRRJ ECB020. Os genótipos UFRRJ ECB015 e UFRRJ ECB005, com maior produção de

óleo essencial, apresentaram as menores larguras de folhas (LFO), respectivamente de 3,07 e 3,22 cm. Mas, estatisticamente, estes genótipos não diferiram de UFRRJ ECB018. Este fato corrobora com os resultados anteriormente apresentados, ou seja, genótipos com maior rendimento de óleo e mais produtivos apresentaram, de forma geral, folhas menores. Ainda em relação às folhas, problemas relacionados a doenças que incidem neste órgão se constituem em fator limitante para a produção da cultura em determinadas épocas do ano. Neste sentido, a redução no rendimento de óleo essencial será verdadeira.

Ao contrário do rendimento de óleo essencial, a biomassa foi um fator complicador na produção de óleo essencial nos genótipos de erva-cidreira brasileira estudados. Além de reduzidos H^2 (biomassa fresca e seca), a biomassa exibiu baixíssimas possibilidades de sucesso na seleção de genótipos vigorosos e exuberantes para a produção de folhas. Os índices de variação para biomassa fresca (BFP) e seca (BSP) foram estimados em 0,13 e 0,17, respectivamente. Portanto, existe uma baixa variabilidade genética para biomassa entre os genótipos estudados. Tal fato pode reduzir enormemente o sucesso na seleção de genótipos com alta produção de folhas. Aliado a esta condição, estimativas reduzidas de H^2 para BFP e BSP tendem ainda tornar a seleção instável para o caráter, pois, como já mencionado, a influência do ambiente foi realmente alta sobre tais variáveis. Conforme já mencionado e apresentado na Tabela 1, as biomassas fresca e seca não apresentaram diferenças estatísticas tanto para o tratamento quanto para a interação genótipo *versus* época. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos para os coeficientes de determinação genótipo e índices de variação para o BFP e BSP (Tabela 1) discutidos anteriormente.

Na Tabela 4 é possível observar os coeficientes de correlação entre as variáveis. Nota-se, como já esperado, que o rendimento de óleo essencial (REN) e a matéria seca (BSP) foram as características que mais influenciaram a produção de óleo, respectivamente, com estimativas da ordem de 0,73 e 0,67. A correlação entre matéria fresca (BFP) e produção foi estimada em 0,47. Esta estimativa pode indicar que grande parte da folha é formada por constituintes não pertencentes ao óleo essencial, como por exemplo, a própria água. Dessa forma, a matéria-seca se mostra um componente de produção mais importante do que a matéria fresca na estimação da produção do óleo essencial em erva-cidreira brasileira. Por isso, o desenvolvimento de descritores para a obtenção da matéria seca é primordial para o sucesso na seleção de plantas, bem como permitirá a comparação de resultados entre os vários grupos de pesquisa em melhoramento genético da erva-cidreira brasileira. Com base na Tabela 3, nota-se que os genótipos UFRRJ ECB005 e UFRRJ ECB015 apresentaram os

melhores resultados quanto à produção de óleo essencial (PRO), com razoável destaque para o primeiro genótipo citado.

Com base nos resultados aqui obtidos percebe-se a necessidade de se avaliar novos genótipos do quimiótipo citral, buscando-se aumentar a variabilidade genética disponível, principalmente às relacionadas a produção de biomassa. Incrementos na produção de óleo essencial devem apontar não somente para o rendimento do óleo essencial nas plantas, mas também para a biomassa. É possível observar na Tabela 4 que, praticamente, não houve correlação entre biomassa (BFP e BSP) e rendimento de óleo (REN) ($r = 0,02$ e $0,05$, respectivamente). Esses resultados indicam que o incremento na biomassa pode não afetar o rendimento de óleo. Porém, o incremento da biomassa é importante quando se pretende o aumento da produção. Vale dizer, que a falta de uma lista de descritores gerais e mínimos para a erva-cidreira brasileira se constitui também num fator complicador para a seleção de genótipos e para a comparação de dados entre as instituições de pesquisa no Brasil. De acordo com Allard (1971), coleções de germoplasmas podem ser assim denominadas quando são úteis ao melhorista, ou seja, quando se dispõe de genótipos devidamente caracterizados e avaliados na coleção. Neste sentido percebe-se a grande importância da confecção de uma lista de descritores para a cultura de erva-cidreira brasileira. A hibridação entre genótipos de interesse agrônomico também se faz muito importante no melhoramento da cultura. Explorar a heterose na erva-cidreira pode ser uma excelente estratégia quando se pretende o aumento da biomassa, conseqüentemente, da produção de óleo essencial. O melhoramento genético assistido por marcadores de DNA visando à obtenção de genótipos com superioridade agrônômica também deve ser praticado. A obtenção de genótipos F_1 permitirá, além de se explorar a heterose, a confecção de mapas genéticos úteis para a identificação de QTL's em erva-cidreira brasileira. Porém, não se pode deixar de mencionar que aspectos básicos da cultura ainda precisam ser aplicados ou elucidados, como, respectivamente, a seleção de genótipos com estabilidade reprodutiva e os fatores que levam a alogamia na espécie. A possibilidade de se autofecundar genótipos em erva-cidreira brasileira pode conduzir o melhoramento da espécie a ganhos de produção muito superiores aos apresentados atualmente na literatura disponível.

3.1.6 Conclusões

De forma geral, a produção de óleo essencial nos genótipos citral de erva-cidreira brasileira avaliados foi baixa. Porém, o genótipo UFRRJ ECB005 destacou-se, em relação

ao seu alto rendimento de óleo, mesmo na época mais sensível a expressão do caráter, no inverno. Esse genótipo também se destacou quanto a estabilidade de produção, já que se manteve entre os genótipos que alcançaram os maiores rendimentos nas duas épocas. O genótipo UFRRJ ECB005 foi o mais produtivo, porém, estatisticamente, este não diferiu do genótipo UFRRJ ECB015.

No geral, os maiores rendimentos de óleo essencial foram notados em fevereiro, no verão. Outros eventos como a poda na primeira época, pode ter influenciado positivamente a produção de óleo essencial na segunda época, em agosto.

A variável produção de óleo essencial mostrou ser mais influenciada pelo genótipo do que pelo ambiente. Porém, as variáveis que a compõem, divergiram quanto a esta questão. O rendimento de óleo foi altamente influenciado pelo genótipo, enquanto a produção de biomassa apresentou resultado inverso. Por isso, a estabilidade de produção e rendimento de óleo durante diferentes períodos do ano pode ser alcançada. De forma geral, as variáveis que contribuem para o aumento da biomassa nas plantas – número de ramos, altura de planta, diâmetro de copa e biomassa fresca e seca - foram muito impactadas por questões de ambiente.

No presente trabalho, a biomassa se mostrou um fator complicador na seleção de genótipos de erva-cidreira brasileira. Primeiramente, por ser altamente influenciada por aspectos de ambiente, e, em segunda lugar, por apresentar baixa variação entre os genótipos, a ponto de se não possível, no presente trabalho, identificar genótipos estatisticamente distintos para a produção de biomassa.

O aumento do número de ramos nas plantas não resultou num aumento proporcional de biomassa. Interessante observar que, no geral, o aumento da largura das folhas ocasionou um decréscimo no rendimento de óleo essencial.

3.1.7 Referências

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971.

BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. D. O.; HEINZMANN, B. M.; MALLMANN, C. A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BLANK, A. F.; CAMÊLO, L. C. A., ARRIGONI-BLANK, M. D. F., PINHEIRO, J. B., ANDRADE, T. M., NICULAU, E. D. S., & ALVES, P. B. Chemical diversity in *Lippia alba* (Mill.) NE Brown germplasm. **The Scientific World Journal**, v. 2015.

BOTTIGNON, M. R.; RUFINO, E. R.; MARQUES, M. O. M.; COLOMBO, C. A.; AZEVEDO FILHO; J. A. D.; LOURENÇÃO; A. L.; SIQUEIRA; W. J. Heterogeneity of linalool chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) NE Br., based on clonal half-sib progenies. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 4, p. 447-453, 2011.

CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 75-79, 2002.

CRUZ, C. D. (2007). Programa Genes, versão 2007. Universidade Federal de Viçosa, MG. CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. **Viçosa: UFV**, v.2, 585p. 2007.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; & SCHEFFER, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FRANZ, C.; NOVAK, J. Sources of Essential oils. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oil – Science, Technology and Applications**. CRC Press, USA. p. 39-82. 2010. ISBN 978-1-4200-6315-8. 2010

GRAND VIEW RESEARCH. **Essential Oil Market Analysis By Product (Orange, Corn Mint, Eucalyptus, Citronella, Peppermint, Lemon, Clove Leaf, Lime, Spearmint), By Application (Medical, Food & Beverage, Spa & Relaxation, Cleaning & Home) And Segment Forecasts To 2024**. 2016. Disponível em: <<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/essential-oils-market>>. Acesso em: 03 de mar. de 2017

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH; H.; BAILLEUL; F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 211-222, 2008.

IZADI DARBANDI, A.; BAHMANI, K.; SADAT NOORI, S. A.; JAFARI, A. A. (2013). Assessment of the genetic diversity in Iranian fennels by RAPD markers. **Journal of herbs, spices & medicinal plants**, 19(3), 275-285. 2013.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; BIZZO, H. R.; GRACINDO, L. A. Agronomic evaluation and identification of *Lippia alba* chemotypes from Distrito Federal, Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 412-417, 2010.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; SILVA, D. B.; GRACINDO, L. A. M.; VIEIRA, R. F. Avaliação agrônômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) NE Brown]-quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 258-264, 2011.

MAPA. **Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC**. 2017. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_protegidas.php> Acesso em 02 de fevereiro de 2017.

OLIVEIRA, E. R.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte–MG. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 14, n. 2, p. 311-320, 2012.

SELL, C. Chemistry of essential oils. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oil – Science, Technology and Applications**. CRC Press, USA. p. 121-150. 2010. ISBN 978-1-4200-6315-8. 2010

SILVA, N. A.; OLIVEIRA, F. F.; COSTA, L. C. B.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, R. A.. Caracterização química do óleo essencial da erva-cidreira (*Lippia alba* (Mill.) NE Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 52-55, 2006.

STEFANINI, M. B.; RODRIGUES, S. D.; MING, L. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. **Horticultura brasileira**, v. 20, n. 1, p. 18-23, 2002.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.

YAMAMOTO, P. Y.; COLOMBO, C. A.; AZEVEDO FILHO, J. A.; LOURENÇÃO, A. L.; MARQUES, M. O. M.; MORAIS, G. D. D. S.; SIQUEIRA, W. J. Performance of ginger grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 5, p. 481-489, 2008.

3.2 Variação na Composição e Estabilidade do Óleo Essencial em Genótipos de Erva-Cidreira Brasileira

3.2.1 Resumo

A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) é uma importante espécie usada para fins medicinais no Brasil. A seleção de genótipos com estabilidade na produção dos princípios ativos é fundamental para o sucesso agrícola da cultura. Portanto, objetivou-se avaliar genótipos de erva-cidreira brasileira, quimiótipos citral, em duas épocas do ano, para se conhecer a variação dos metabólitos secundários entre e dentro dos genótipos. O intuito foi identificar genótipos estáveis. Para tal, foram avaliados oito genótipos de erva-cidreira brasileira dispostos em delineamento em blocos casualizados. Foram extraídos o óleo essencial por genótipo/parcela em fevereiro e agosto de 2016. O extrato foi submetido ao CG/DIC e ao CG-EM, para identificação dos metabólitos no óleo. Os metabólitos majoritários foram submetidos a anova e teste de média. Em seguida, todos os metabólitos foram submetidos ao teste *t* a 5% de probabilidade, comparando as épocas de avaliação. Os dados de época também foram submetidos a análise de agrupamento via UPGMA. Foi proposto o índice Estabilidade Química do Genótipo (EQG) afim de conhecer a estabilidade de produção do metabólito dentro do genótipo em relação às épocas. O citral, e seus isômeros geranial e neral mostraram estabilidade durante a época, porém, seus percentuais foram menores em agosto. Ao todo foram notados 63 metabólitos no óleo essencial dos genótipos. Cerca de 80,95% dos metabólitos apresentaram-se em concentrações abaixo de 0,5%. No geral, observou-se baixa diversidade química entre os genótipos. De oito genótipos, apenas um (UFRRJ ECB005) destacou-se quanto à estabilidade na produção de metabólito entre as épocas. No geral, 23,81% dos metabólitos identificados apresentaram as mesmas concentrações em fevereiro e agosto. O índice EQG variou de 97,13 a 86,22%. Todas as análises indicaram maior estabilidade química para o genótipo UFRRJ ECB005.

Palavras-chave: *Lippia alba*, melhoramento genético, estatística multivariada.

3.2.2 Abstract

The brushy matgrass is an important species for medicinal purposes in Brazil. The selection of genotypes with stability in production of components is fundamental for the success of the crop. Therefore, genotypes of bushy matgrass genotypes, citral chemotypes, were evaluated at two seasons of the year to analyze the variation of the secondary metabolites between and inside of the genotypes. The aim was to identify stable genotypes. For this purpose, eight genotypes of bushy matgrass arranged in a randomized blocks design were evaluated. The essential oil was extracted by genotype / plot in February and August of 2016. The extract was submitted to GC/FID to identify the metabolites in the oil. The major metabolites were submitted to anova and mean test. Afterwards, all metabolites were submitted to t test at 5% probability, comparing environments of evaluation. The environmental data were also submitted to cluster analysis via UPGMA. The Genotypic Chemical Stability index (EQG) was proposed in order to know the stability of production of the metabolite within the genotype in relation with environment. The citral and its isomers, geranial and neral, showed stability during the season, however, their percentages were lower in August. 63 metabolites were observed in the essential oil of the genotypes. About 80.95% of the metabolites presented concentrations below 0.5%. In general, there was low chemical diversity among the genotypes. Of eight genotypes, only one (UFRRJ ECB005) was noted for stability in the production of metabolite between the epochs. Overall, 23.81% of the metabolites identified had the same concentrations in February and August. The EQG index ranged from 97.13 to 86.22%. All analyzes indicated greater chemical stability for UFRRJ ECB005 genotype.

Keywords: *Lippia alba*, Genetic improvement, multivariate statistics.

3.2.3 Introdução

A erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*), pertencente à família Verbenaceae, é diplóide (BRANDÃO *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2007) com $2n = 30$ cromossomos (PIERRE *et al.*, 2011) e caracteriza-se por um pequeno arbusto bastante ramificado que apresenta flores hermafroditas e modo de reprodução preferencial alógamo. A espécie ocorre em praticamente todo território brasileiro. A erva-cidreira brasileira é bastante utilizada na medicina popular brasileira (PASCUAL *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2006), sendo recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) brasileira para o tratamento de quadros leves de ansiedade e insônia, como calmante suave (ANVISA, 2009). Hennebelle *et al.* (2008) relata que a erva-cidreira brasileira tem sido utilizada amplamente na pesquisa farmacológica como sedativo, no tratamento de doenças do trato respiratório, distúrbios digestivos e cardiovasculares, doenças da pele, anemia e enxaqueca. Além disso, possui atividades inseticida, antibacteriana e antifúngica (IBRAHIM *et al.*, 2001; ROZWALKA *et al.*, 2008).

A importância agrícola da espécie está na produção de seu óleo essencial, extraído por hidrodestilação ou arraste a vapor, o qual contém diferentes compostos. Alguns destes, via de regra, um, dois ou três, ocorrem em concentrações majoritárias no óleo, os quais definem o quimiótipo ou tipo químico dos genótipos na espécie. De acordo com Hennebelle *et al.* (2008), em erva-cidreira brasileira podem ser encontrados os seguintes quimiotipos: citral, linalol e β -cariofileno (quimiótipo I); tagetenona (quimiótipo II); limoneno e carvona (quimiótipo III); mirceno (quimiótipo IV); γ -terpeneno (quimiótipo V); cânfora-1,8 cineol (quimiótipo VI); e estragol (quimiótipo VII). Segundo Tavares *et al.* (2005), os compostos majoritários que constituem o quimiotipo de genótipos de erva-cidreira brasileira são mais influenciados por aspectos genéticos do que de ambiente. Neste sentido, a seleção de genótipos com alta performance agrônômica pode ser perfeitamente alcançada, desde que métodos de melhoramento apropriados sejam aplicados no processo de seleção.

Em programas de melhoramento de erva-cidreira brasileira, a seleção de genótipos que apresentem estabilidade na expressão dos metabólitos secundários no óleo essencial durante o ano, é especialmente importante. A estabilidade qualitativa e quantitativa do extrato vegetal é essencial para a manutenção da qualidade e eficiência da atividade biológica do extrato colhido durante o ano. A previsibilidade de produção é um aspecto importante a ser alcançado em espécies vegetais potencialmente úteis para a agricultura

comercial. Até o momento, no Brasil, cultivares de erva-cidreira brasileira não foram registrados e nem disponibilizados para o plantio (MAPA, 2017).

Diante do exposto, objetivou-se no presente trabalho avaliar durante duas épocas distintas do ano, fevereiro e agosto de 2016, oito genótipos de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*), quimiótipo citral, afim de se conhecer a variabilidade da composição do óleo essencial destes genótipos. Também buscou-se identificar os genótipos mais estáveis para produção de metabólitos secundários provenientes do óleo essencial destes, que apresentem, simultaneamente, alta concentração relativa dos metabólitos majoritários que definem o quimiótipo citral.

3.2.4 Material e métodos

Foram analisados oito genótipos de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) pertencentes a Coleção de Germoplasmas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada na área experimental do Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia da UFRRJ, no município de Seropédica (22° 45´ S; 43° 41´ W), Rio de Janeiro. Desta Coleção, foram selecionados oito genótipos previamente identificados como quimiótipo citral para compor o presente trabalho, a saber: UFRRJ ECB001, UFRRJ ECB002, UFRRJ ECB005, UFRRJ ECB011, UFRRJ ECB015, UFRRJ ECB018, UFRRJ ECB019 e UFRRJ ECB020.

Os genótipos foram plantados na área experimental da UFRRJ em espaçamento 1,2 x 1,2 metros, e dispostos num delineamento em blocos ao acaso com oito tratamentos, três repetições e seis plantas por parcela. A área do experimento está localizada ao nível do mar, com solo da classe dos planossolos háplicos. Conforme a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw, com alternância entre a estação chuvosa no verão e seca durante o inverno. As plantas foram colhidas em duas diferentes estações do ano, verão e inverno, respectivamente, na primeira e segunda quinzena dos meses de fevereiro e agosto de 2016. Conforme dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), a temperatura média nesses meses foi de 27,01 e 22,77° Celsius, respectivamente, com precipitação de 206 e 33 milímetros, e umidade relativa do ar de 75,75 e 68,50 %, respectivamente.

As folhas colhidas foram identificadas por genótipo, em cada parcela experimental (repetição), e secas em estufa com circulação de ar (Eletrolab EL 403, Brasil) a 37° Celsius durante 48 horas, tempo suficiente para se atingir o peso constante. Em seguida, separou-se por genótipo/parcela três alíquotas de 30 gramas de massa seca. Cada amostra foi submetida

à extração de óleo essencial por hidrodestilação, mediante o uso de aparelho Clevenger modificado em manta aquecedora (Fisatom, Brasil) durante uma hora e trinta minutos (1:30 horas). O produto da extração foi retirado da proveta do Clevenger utilizando-se 10 ml do solvente CHCl_2 . A fase apolar do extrato foi filtrada em Na_2SO_4 e o CHCl_2 foi eliminado com o auxílio de gás nitrogênio. Os óleos essenciais extraídos para cada genótipo em cada parcela foram depositados em frascos lacrados e armazenados em freezer a 4° Celsius até o momento da análise.

Para separar, detectar e quantificar os constituintes químicos, foi injetado 1 uL de amostra do óleo essencial de cada um dos genótipos em cromatógrafo gasoso (Hewlett-Packard 5890 Series II, USA), equipado com um detector ionização de chamas (CG-DIC) e um injetor no modo “Split” (1:20). As substâncias foram separadas em uma coluna capilar de sílica fundida modelo similar DB-5 com 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm (d.i.), gerando um cromatograma para cada genótipo estudado em cada bloco (Figura 7). Para separar e identificar as substâncias, 1 μL de amostra foi injetado em cromatógrafo gasoso-espectrômetro de massa (Shimadzu QP-2010 Plus, Japão). A identificação dos compostos voláteis no óleo essencial foi baseada nos índices de retenção linear (IRL) e os espectros de massas das amostras, comparando com o banco de dados NIST (2008) e com o índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007). O IRL foi calculado com base na injeção das amostras e a série de alcanos (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963).

Após análise, estruturou-se uma planilha contendo as concentrações de cada metabólito secundário (variáveis) para cada genótipo em cada uma de sua respectiva parcela (ou repetição). Comparou-se via ANOVA as concentrações de geranial, neral e citral para cada um dos genótipos estudados, considerando as duas épocas de avaliação do perfil químico do óleo essencial, fevereiro e agosto de 2016. Também, estimou-se os seguintes parâmetros genéticos: coeficiente de determinação genotípico (H^2), coeficiente de variação genético (CV_g) e índice de variação (IV_g). Todos os genótipos foram também submetidos ao teste DMS_t (Diferença Mínima Significativa) para comparação de médias em relação as concentrações das referidas variáveis.

Posteriormente, buscou-se conhecer a estabilidade de produção do metabólito em cada genótipo, considerando as épocas de avaliação. Para tal, pelo teste t para comparação de médias duas a duas, comparou-se, individualmente, ao nível de 5% de probabilidade, a média de cada metabólito produzido em fevereiro e agosto dentro de cada genótipo.

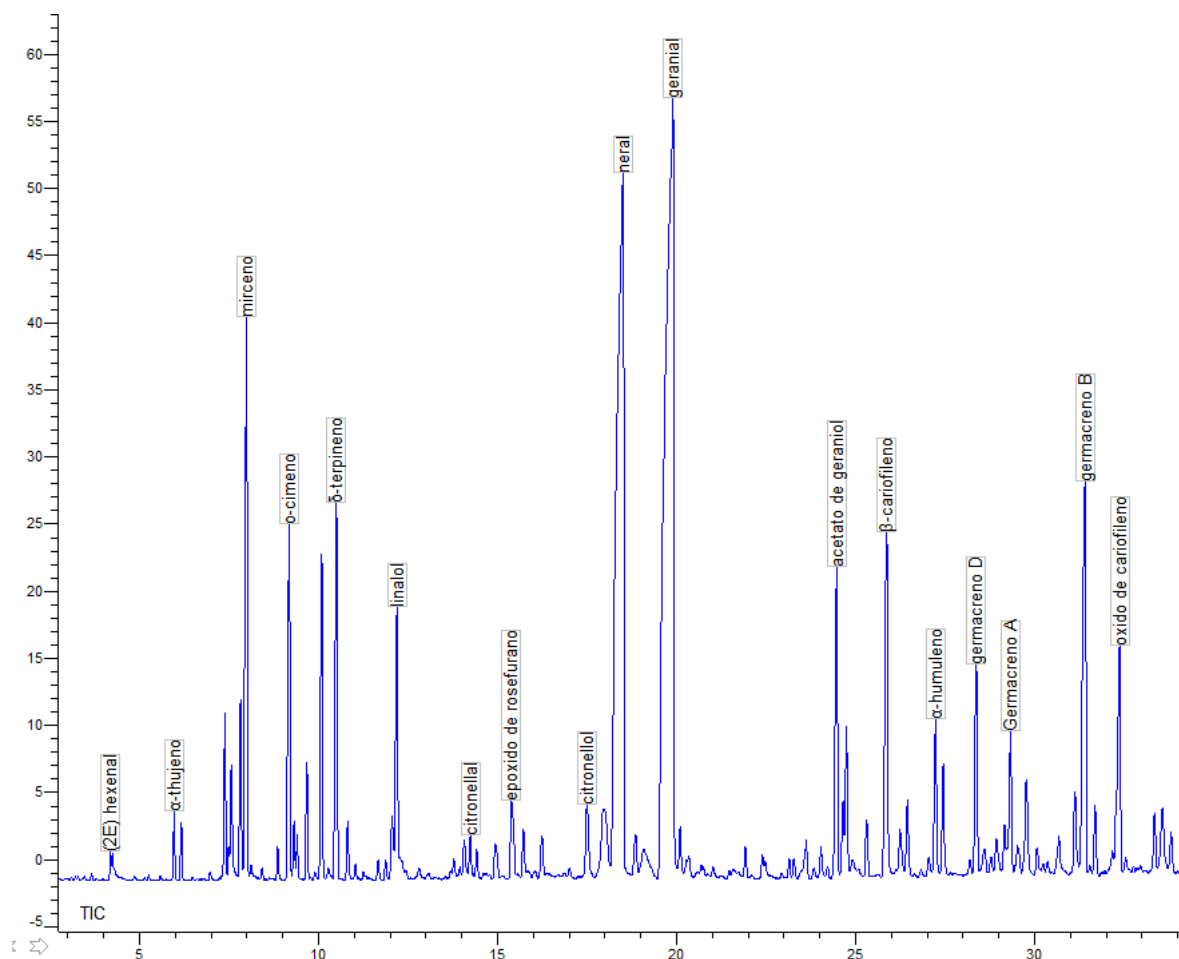


Figura 7. Análise de cromatografia gasosa (DIC) do óleo essencial extraído das folhas do genótipo de erva-cidreira brasileira UFRRJ ECB005.

Os resultados do teste *t* foram apresentados nas Figuras 8 e 9, juntamente com as plotagens do tipo radar. Cada radar correspondeu a um genótipo. Nas Figuras 8 e 9, foram apresentados os radares contendo metabólitos que tiveram, na média geral, concentrações relativas, respectivamente, acima e abaixo de 5%. Visualmente, os radares puderam indicar a estabilidade de produção dos metabólitos por genótipo. Para tal, quanto maior a sobreposição das médias do metabólito produzido em fevereiro e agosto – respectivamente, linha na cor preta e cinza –, maior foi a estabilidade.

Após as análises referentes à estabilidade dos metabólitos, buscou-se, neste momento, conhecer a estabilidade do genótipo quanto ao seu perfil químico considerando as duas épocas de avaliação. De posse dos resultados provenientes do teste *t*, foi possível criar o parâmetro Estabilidade Química do Genótipo quanto ao perfil químico de seu óleo essencial, denominada, EQG(%). Segue abaixo o estimador:

$$EQG_{(\%) } = 100 - \left[\frac{\sum(P_i^1 + P_i^2)}{2} \right], \text{ onde:}$$

$EQG_{(\%)}$: Porcentagem da Estabilidade Química do Genótipo;

P_i^1 : porcentagem relativa do princípio ativo i com média estatisticamente instável na época 1, desconsiderando os princípios ativos geranial e neral (citrál).

P_i^2 : porcentagem relativa do princípio ativo i com média estatisticamente instável na época 2 desconsiderando os princípios ativos geranial e neral (citrál)..

Esse parâmetro considera, simultaneamente, o número de metabólitos secundários instáveis no óleo essencial, e sua contribuição relativa neste mesmo óleo. A partir das estimativas da EQG os genótipos foram conhecidos quanto a estabilidade de seu perfil químico. Quanto maior for a estimativa da EQG, maior será a sua estabilidade.

Adicionalmente, análises de agrupamento também foram realizadas afim de conhecer a estabilidade dos genótipos quanto ao perfil químico de seu óleo essencial. Para tal, todas variáveis foram transformadas, dividindo-se cada valor por seu desvio-padrão. Foram analisados 16 vetores, ou seja, os perfis químicos de fevereiro e agosto de cada genótipo. Portanto, quanto menor for a distância observada no dendrograma entre a avaliação de fevereiro e agosto, no mesmo genótipo, maior será a estabilidade na composição do óleo essencial neste mesmo genótipo. Assim sendo, estimou-se a distância euclideana entre todos os perfis químicos. De posse da matriz fenética, estimou-se o agrupamento via UPGMA, obtendo-se assim a matriz cofenética. Esta matriz foi apresentada na forma de dendrograma e *heatmap*. Estimou-se também o coeficiente de correlação cofenética entre as matrizes, que foi testado via Mantel. O número de grupos ótimos no dendrograma foi obtido conforme metodologia proposta por Kelley *et al.* (1996).

3.2.5 Resultados e discussão

Com base na Tabela 5, observa-se que, pelo teste F, houve diferença estatística significativa ao nível de 5% de probabilidade para a fonte de variação genótipos, considerando os compostos majoritários (citrál, geranial e neral) que definem o quimiótipo citrál no óleo essencial dos genótipos. De acordo com Sell (2010) a palavra citrál é usada para descrever uma mistura de dois isômeros geométricos, geranial e neral. Na natureza, ambos os isômeros estão presentes em abundância. Dos metabólitos submetidos à análise da variância, não se constatou diferença estatística significativa para os efeitos de época e de interação genótipo *versus* época (Tabela 5). Yamamoto *et al.* (2008), trabalhando com 4

diferentes quimiótipos de erva-cidreira brasileira, não encontraram variação na concentração de geranial entre seis diferentes ambientes de cultivo. Estes autores encontraram apenas diferenças estatísticas para o metabólito neral. Já Prochnow *et al.* (2017), observaram alterações estatisticamente distintas em *Aloysia triphylla* tanto para o neral quanto para o geranial nas quatro estações do ano.

Quanto à produção de citral, geranial e neral, os resultados acima mencionados indicaram que, independente da época, para cada variável, pelo menos um genótipo apresentou concentração distinta dos demais. Estatisticamente, não houve diferenças de produção entre época, considerando a média geral ou mesmo as médias dos metabólitos dentro do mesmo genótipo. Tal fato evidencia estabilidade de produção dos referidos metabólitos secundários em relação à época.

De forma geral, a produção relativa de geranial foi 1,7 vezes maior que a de neral. De acordo com Sell (2010), essas proporções podem ser até 1,5 vezes maior tanto para um como para o outro metabólito. Os coeficientes de determinação genótipos (H^2) para o citral, geranial e neral, foram estimados em 61,84, 62,64 e 59,07%, respectivamente (Tabela 5). Estas estimativas indicam que o efeito do genótipo prevalece, porém, há ainda um real aporte de ambiente na expressão destes metabólitos, no qual deve ser sempre considerado e minimizado através da seleção de genótipos adaptados no ambiente de produção. Dados obtidos por Tavares *et al.* (2005) corroboram com os apontamentos acima referidos. Esses autores informaram que o efeito genotípico foi mais importante do que os efeitos de ambiente na determinação dos princípios ativos majoritários analisados. Porém, Kulkarni *et al.* (1987), em famílias de meio-irmãos de capim limão, observaram estimativas de herdabilidades no sentido amplo de 0,49, e no sentido restrito de 0,34 e 0,24, respectivamente, estimadas por análises de variância e de regressão. Estas estimativas apontam para uma maior influência do ambiente sobre a expressão do citral nas famílias de capim limão analisadas.

Os índices de variação genético (IVg) estimados para o citral, geranial e neral, indicaram que a variabilidade genética para estes caracteres são um tanto quanto reduzida ou limitada entre os genótipos estudados. As estimativas de IVg foram da ordem de 0,52, 0,52 e 0,49. Portanto, a inserção de novos genótipos de erva-cidreira brasileira quimiótipo citral na coleção de germoplasma da UFRRJ é imprescindível para a seleção de genótipos superiores visando o aumento da produção de citral, geranial e neral. Em relação a esses compostos majoritários, a variabilidade genética reduzida entre os genótipos testados pode

Tabela 5. Resumo da análise de variância e parâmetros genéticos referente às variáveis citral, geranial e neral, quantificadas no óleo essencial de oito genótipos de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) em duas épocas do ano de 2016, fevereiro e agosto, em Seropédica, RJ.

FV	QM _{resíduo}		
	Citral	Geranial	Neral
Bloco	60,09	19,20	11,53
Genótipos	64,34*	23,24*	10,56*
Época	34,71 ^{ns}	3,33 ^{ns}	16,49 ^{ns}
Genótipos x época	28,61 ^{ns}	9,79 ^{ns}	5,03 ^{ns}
Resíduo	24,55	8,68	4,32
Média	72,32	42,39	29,93
CV _(%)	6,85	6,95	6,94
H ² _(%)	61,84	62,64	59,07
CV _g (%)	3,56	3,67	3,41
IV _g	0,52	0,52	0,49

Legenda: QM_{resíduo} Quadrado médio do resíduo; ns diferença estatística não-significativa ao nível de 5% de probabilidade; * Diferença estatística à 1%; CV_(%) coeficiente de variação experimental; σ_g variabilidade genotípica; H²_(%) coeficiente de determinação genotípico; CV_g(%) coeficiente de variação genético; IV_g índice de variação genético.

ser, no presente caso, perfeitamente entendida. Pode-se supor, primeiramente, que a reduzida base genética entre os genótipos possivelmente é decorrente da pequena área de coleta destes, pois todos eles foram coletados no município do Rio de Janeiro e entorno. Outro possível motivo, é que o trabalho foi conduzido apenas com um só quimiótipo, o citral. Blank *et al.* (2015) encontraram alta diversidade química em relação ao óleo essencial de erva-cidreira brasileira, porém, estes autores trabalharam com vários quimiótipos.

De acordo com a Tabela 6, observa-se que o genótipo UFRRJ ECB019 apresentou as maiores concentrações de citral, geranial e neral, respectivamente de 76,0, 44,37 e 31, 64%. As médias gerais para os mesmos metabólitos foram estimadas em 72,32, 42,39 e 29,93%, respectivamente. Em erva-cidreira brasileira Blank *et al.* (2015) observaram valores máximos de 54,63 e 32,90%, respectivamente, para o geranial e neral. O genótipo de menor média no presente estudo foi o UFRRJ ECB018, com médias estimadas em 66,44,

Tabela 6. Análises das médias via DMS-t referentes a oito genótipos de erva-cidreira brasileira (*Lippia alba*) analisados quanto a concentração relativa dos metabólitos citral, geranial e neral presentes no óleo essencial. As médias referem-se a duas épocas do ano de 2016, fevereiro e agosto, em Seropédica, RJ.

Genótipos	Citral	Geranial	Neral
UFRRJ ECB001	75,81 ^a	44,32 ^a	31,49 ^a
UFRRJ ECB002	73,59 ^{ab}	43,37 ^{ab}	30,22 ^{ab}
UFRRJ ECB005	70,15 ^{ab}	41,11 ^{ab}	29,04 ^{ab}
UFRRJ ECB011	74,37 ^{ab}	43,71 ^a	30,66 ^{ab}
UFRRJ ECB015	71,92 ^{ab}	42,33 ^{ab}	29,59 ^{ab}
UFRRJ ECB018	66,44 ^b	38,66 ^b	27,77 ^b
UFRRJ ECB019	76,01 ^a	44,37 ^a	31,64 ^a
UFRRJ ECB020	70,32 ^{ab}	41,28 ^{ab}	29,04 ^{ab}

Legenda: médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste DMS-t ao nível de 5% de probabilidade.

38,66 e 27,77%, respectivamente para o citral, geranial e neral. Considerando as variáveis citral, geranial e neral, estatisticamente pelo teste DMS-t, o genótipo UFRRJ ECB019 diferiu apenas do UFRRJ ECB018.

Ao todo foram identificados 63 metabólitos secundários diferentes nos óleos essenciais dos oito genótipos de erva-cidreira brasileira analisados (Figuras 8, 9 e 10). Dos princípios ativos identificados, aproximadamente 19,05% (ou 12 metabólitos) tiveram sua média geral igual ou superior a 0,5%. Os demais, 51 metabólitos (80,95%), apresentaram médias gerais de concentração relativa inferiores a 0,5% (Figura 9). Blank *et al.* (2015) identificaram 33 compostos no óleo essencial de diferentes quimiótipos de erva-cidreira brasileira. Mesa-Arango *et al.* (2009) identificaram 58 compostos em genótipos de dois quimiótipos de erva-cidreira brasileira, carvona e citral. Tavares *et al.* (2005) identificaram 29 princípios ativos no óleo essencial de genótipos de três quimiótipos de erva-cidreira brasileira.

Muitos metabólitos tiveram a sua expressão influenciada por fatores de ambiente. Considerando os metabólitos acima de 0,5%, apenas o linalol e o germacreno D (Figura 8) não apresentaram diferenças de concentração entre fevereiro e agosto, quando aplicado o Teste *t* para comparação de médias duas a duas em cada um dos genótipos analisados. Em relação aos metabólitos com média geral de ocorrência abaixo de 0,5% (Figura 9), não houve

diferenças estatísticas de concentração, pelo Teste *t*, apenas para α -tujeno, geraniol, Ocimeno, 1-octen-3-ol, β -farneseno, acetato de nerila, limoneno, citronelal, hexanol, eugenol, germacra-4(15)5,10(14) trien- α -ol, N-nonaral e geraniol. Diante do exposto, no geral, percebe-se que cerca de 23,81% dos metabólitos secundários presentes no óleo essencial de erva-cidreira brasileira apresentaram as mesmas concentrações médias tanto em fevereiro quanto em agosto de 2016. Tal fato evidencia a estabilidade de produção para estes princípios ativos, considerando, logicamente, os genótipos avaliados nas condições edafoclimáticas de Seropédica, RJ. Devido a esta estabilidade, supõe-se que a seleção de plantas de erva-cidreira brasileira dirigida ao aumento ou redução dos referidos princípios ativos pode ser bem-sucedida em programas de melhoramento genético da espécie. Aumentos nestes percentuais de estabilidade podem ser obtidos pela seleção de genótipos adaptados para tal. Por isso, coleções de germoplasma de erva-cidreira brasileira corretamente caracterizadas e avaliadas em diferentes épocas do ano são imprescindíveis para se alcançar sucesso na busca por genótipos com melhor performance agrônômica em relação aos aspectos químicos aqui discutidos.

Nota-se nas Figuras 8 e 9 que houveram genótipos que apresentaram maior estabilidade de produção de princípios ativos em relação a outros. Dessa forma, é notório observar que os genótipos comportam-se de forma diferente aos estímulos do ambiente, em relação à expressão de seus metabólitos no óleo essencial. Possivelmente, em alguns genótipos, os fatores genéticos tem contribuído mais efetivamente do que os de ambiente se os genótipos UFRRJ ECB005, UFRRJ ECB015 e UFRRJ ECB020 como os mais estáveis. Essa suposição se dá em função da percepção visual de seus respectivos radares (gráficos) nas Figuras 8 e 9. Nos radares dos referidos genótipos é possível notar uma maior sobreposição das médias (linhas) referentes aos meses de fevereiro e agosto em relação aos demais genótipos.

A média geral do parâmetro Estabilidade Química do Genótipo (EQG), em porcentagem, foi estimada em 67,55%. Este mesmo parâmetro foi obtido para os genótipos individualizados. Em ordem decrescente, os genótipos mais estáveis foram: UFRRJ ECB005 (89,80%), UFRRJ ECB002 (80,72%), UFRRJ ECB015 (78,01%), UFRRJ ECB020 (70,11%), UFRRJ ECB019 (68,14%), UFRRJ ECB018 (61,69%), UFRRJ ECB001 (48,58%) e UFRRJ ECB011 (43,30%).

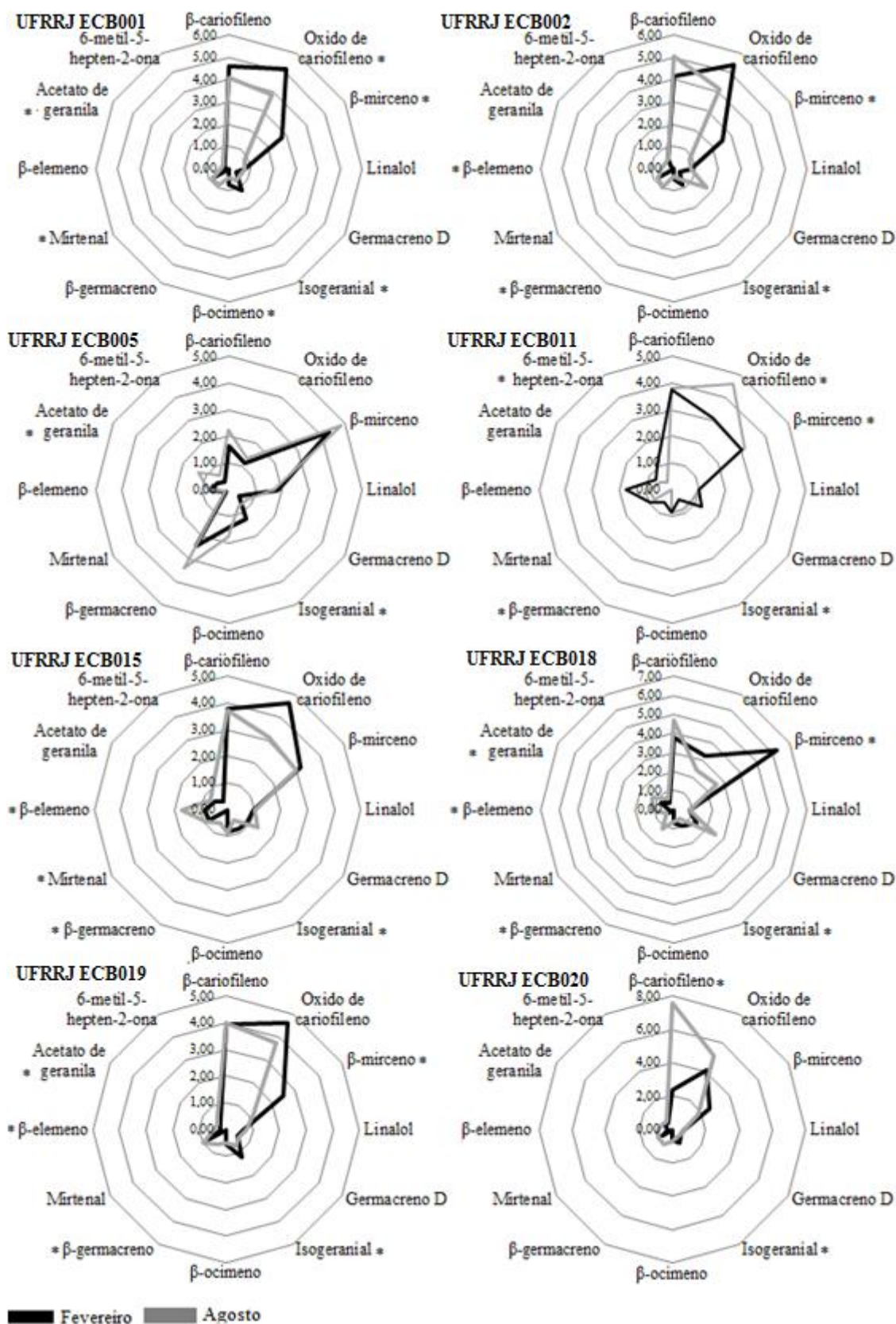


Figura 8. Gráficos em distribuição radial dos princípios ativos com porcentagem média acima de 0,5% (excluindo o quimiotipo) no óleo essencial de 8 genótipos de erva-cidreira brasileira avaliados em fevereiro (preto) e agosto (cinza) em Seropédica, RJ. * princípio ativo diferiu entre as épocas pelo Teste *t*.

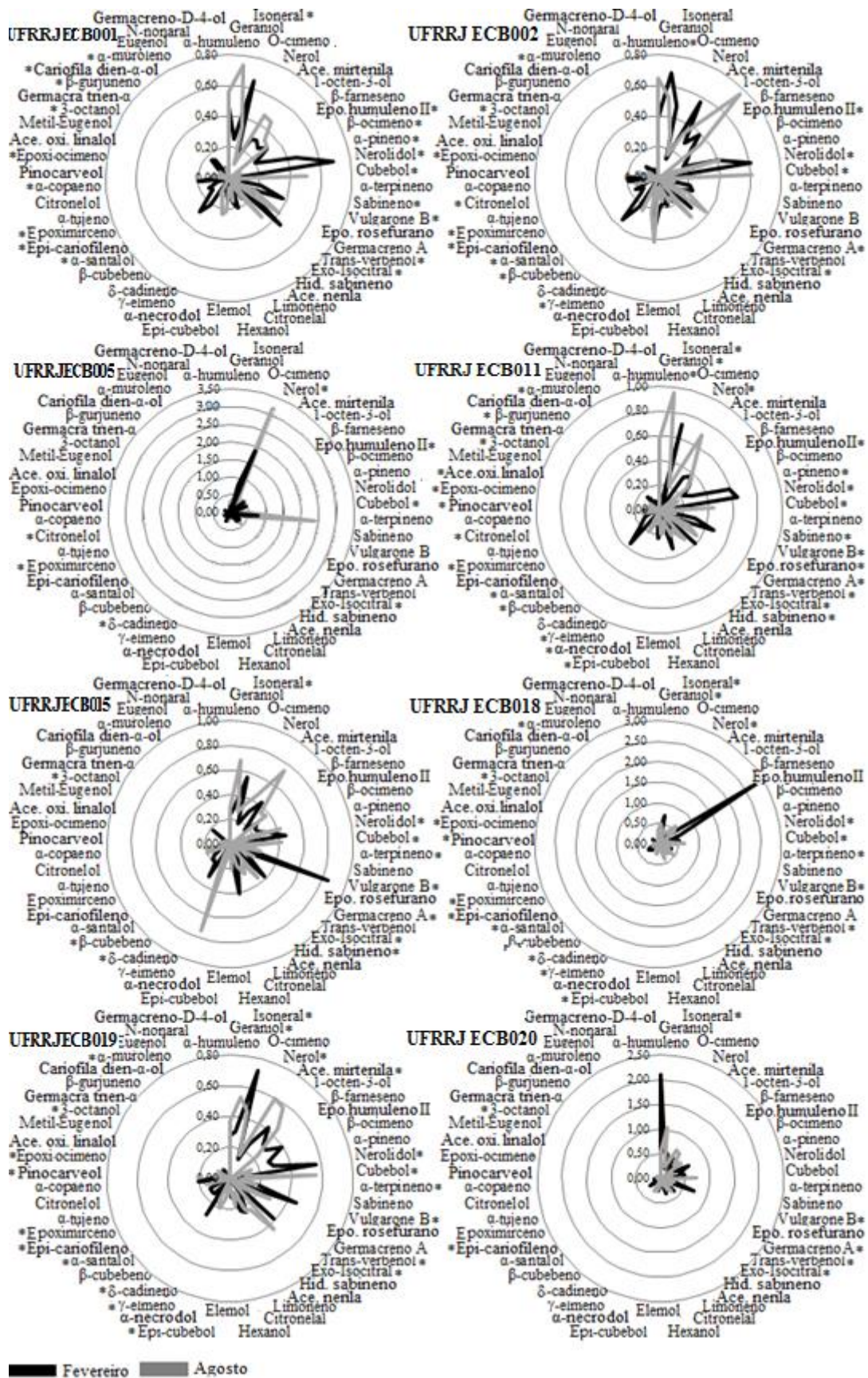


Figura 9. Gráficos em distribuição radial dos princípios ativos com porcentagem relativa abaixo de 0,5% no óleo essencial de 8 genótipos de erva cidreira avaliados em fevereiro (preto) e agosto (cinza) em Seropédica, RJ. * princípio ativo diferiu entre as épocas pelo Teste *t*.

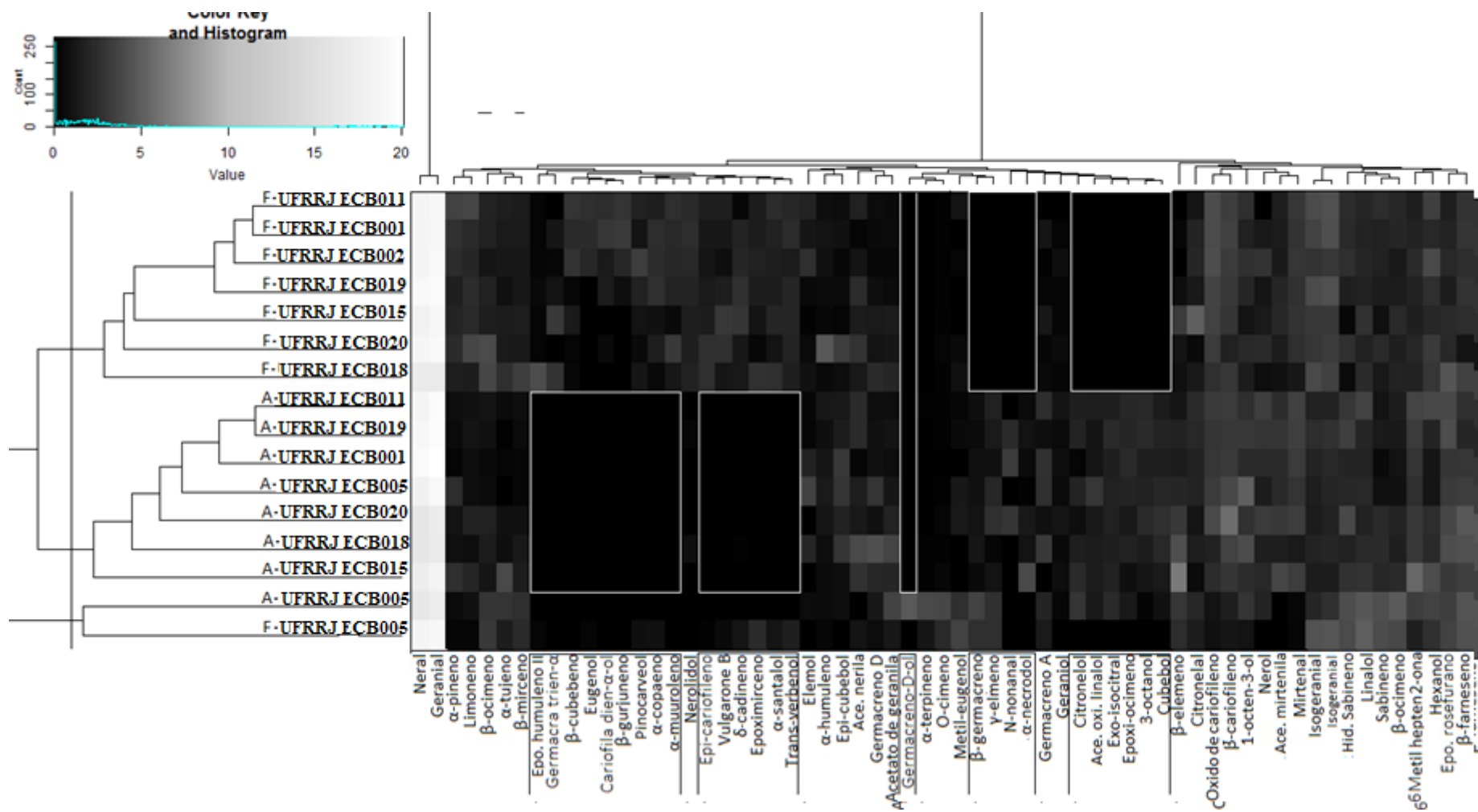


Figura 10. Dendrograma e mapa deheatmap de 8 genótipos de erva-cidreira brasileira com base na proporção relativa dos 63 princípios ativos identificados no óleo essencial avaliado em fevereiro (F) e agosto (A) de 2016, em Seropédica, RJ.

Diante do exposto, pode-se observar que o genótipo UFRRJ ECB005 apresentou tanto uma percepção visual de estabilidade (Figuras 8 e 9), quanto a maior estabilidade via $EQG_{(%)}$. Tal fato aponta para um alto potencial genético deste genótipo, em relação à sua estabilidade para produção de princípios ativos no óleo essencial na região de Seropédica, RJ, e entorno.

Para uma verificação mais detalhada sobre a estabilidade de produção de metabólitos nos genótipos UFRRJ analisados, realizou-se uma análise de agrupamento dos perfis químicos obtidos individualmente por época dentro de genótipo (Figura 10). Neste caso, quanto menor for a distância observada no dendrograma da Figura 10 - entre a avaliação de fevereiro e agosto, no mesmo genótipo -, maior será a estabilidade na composição do óleo essencial (neste mesmo genótipo). Portanto, no presente caso, a variação intra-genótipo não é pretendida ou, no mínimo, deve ser sempre minimizada.

De acordo com Kelley *et al.* (1996) no dendrograma da Figura 10, houve a formação de três grupos estatisticamente distintos. A correlação cofenética entre a matriz de distância euclidiana e a matriz fenética via UPGMA foi estimada em 0,91, sendo estatisticamente significativa pelo teste de Mantel. No dendrograma (Figura 10), nota-se que o grupo I alocou todos os perfis químicos obtidos nas avaliações de fevereiro, incluindo neste, todos os genótipos avaliados, exceção apenas do UFRRJ ECB005. O grupo II foi muito semelhante ao grupo I, com uma diferença, agrupou apenas os perfis químicos dos óleos essenciais analisados em agosto. O grupo III foi formado apenas pelo genótipo UFRRJ ECB005, agrupando os perfis químicos referentes às análises do seu óleo essencial extraído e caracterizado em fevereiro e agosto de 2016.

Com base nos resultados apresentados na Figura 10, nota-se que, dentre todos os genótipos analisados, apenas o UFRRJ ECB005 foi alocado no mesmo grupo. Conclui-se, portanto, que o UFRRJ ECB005, entre todos os genótipos, apresentou a maior estabilidade quanto à composição química do óleo essencial produzido no mês de fevereiro e no mês de agosto de 2016. Estes resultados corroboram com os resultados já obtidos e apresentados anteriormente neste trabalho. Em programas de melhoramento de erva-cidreira brasileira, cujo objetivo é o fornecimento de matéria-prima para produção de medicamentos fitoterápicos, a análise de todo o perfil químico do óleo essencial nos genótipos, é especialmente importante. De acordo com a RDC n° 26, de 13 de maio de 2014 (BRASIL, 2014), são considerados medicamentos fitoterápicos os produtos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em

evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Ainda conforme a RDC nº 26 (BRASIL, 2014) um medicamento fitoterápico não pode ser constituído por substâncias ativas isoladas ou altamente purificadas associada ou não a outros extratos, vegetais ou de qualquer outra fonte. Portanto, a seleção de genótipos de erva-cidreira brasileira estáveis para produção de óleo essencial e de seus constituintes químicos que o compõem é essencial para o cumprimento da legislação brasileira, no sentido de manter a sua eficiência e eficácia do extrato produzido pelos genótipos ao longo do ano. Não se pode deixar de mencionar também que princípios ativos em baixas concentrações também podem interferir ou até definir a atividade biológica de um extrato vegetal qualquer.

A ocorrência de perfis químicos provenientes de um período ou outro de avaliação em um só grupo no dendrograma da Figura 10 – grupo I e II, respectivamente agosto e fevereiro - indica uma reduzida variabilidade genética para a maioria dos genótipos de erva-cidreira brasileira analisados. A baixa variabilidade genética quanto à composição química do óleo entre genótipos não é pretendida, pois denota o mesmo comportamento fenotípico entre genótipos diferentes. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos para os índices de variação (Tabela 5), já discutidos anteriormente. Basicamente, o agrupamento ocorreu conforme época de avaliação, exceção para o genótipo UFRRJ ECB005.

No geral, as médias de distância entre os genótipos no grupo I e II foram muito semelhantes. Em fevereiro, os genótipos mais próximos quanto ao perfil químico foram os UFRRJ ECB011 e UFRRJ ECB001. Já em agosto, os mais próximos foram os genótipos UFRRJ ECB011 e UFRRJ ECB019, porém, o UFRRJ ECB001 ainda manteve uma das menores distâncias com o UFRRJ ECB011. Em todo caso, não há uma tendência dos genótipos mais distantes em um grupo serem os mais distantes em outro grupo, e vice-versa. Sem dúvida, o genótipo UFRRJ ECB005 foi o mais divergente, independente da época de avaliação. Apesar do genótipo UFRRJ ECB005, dentre todos os demais genótipos, mostrar-se mais estável, a redução da distância entre os perfis químicos de fevereiro e agosto deve ser ainda pretendida.

No *heatmap* da Figura 10 pode-se observar claramente que as concentrações de geranial e neral foram muito superiores às concentrações dos demais metabólitos. No histograma localizado no canto esquerdo superior da Figura 10, é possível observar que a maior parte dos metabólitos ocorre em concentrações inferiores a 0,5%. Concentrações entre 10 e 15% foram mais raras.

No presente trabalho, foi possível notar que alguns metabólitos mostraram ser bastante influenciados pela época do ano em que são produzidos, conforme já mencionado anteriormente. Quando se compara as caracterizações químicas realizadas em fevereiro e agosto de 2016 (*heatmap* da Figura 10), excluindo-se o genótipo UFRRJ ECB005, observa-se que os metabólitos β -germacreno, γ -elemeno, n-nonanal, α -necrodol (na porção superior do *heatmap*, segundo retângulo da esquerda para a direita), citrionelol, acetato de óxido de linalol, exo-isocitral, epóxi-ocimeno, 3-octanol, cubebol (na porção superior do *heatmap*, terceiro retângulo da esquerda para a direita) foram expressos somente em agosto de 2016, portanto, ausentes em fevereiro do mesmo ano. Já os metabólitos epóxido de humuleno II, germacra-4(15)5,10(14) trien- α -ol, β -cubebeno, eugenol, cariofila-dien-5- α -ol, β -gurjuneno, pinocarveol, α -copaeno, α -muuroleno (na porção inferior do *heatmap*, primeiro retângulo da esquerda para a direita), Epi-cariofileno, vulgarone B, delta-cadineno, epoximirceno, α -santalol e trans-verbenol (na porção inferior do *heatmap*, segundo retângulo da esquerda para a direita) foram ausentes em agosto de 2016, e presentes em fevereiro do mesmo ano. Portanto, cerca 14,29% dos metabólitos detectados em erva-cidreira brasileira, foram produzidos somente no mês de agosto de 2016, e, aproximadamente, 26,98%, foram produzidos somente em fevereiro 2016. Destes metabólitos, apenas o pinocarveol e o α -copaeno foram ausentes para UFRRJ ECB005 nas duas épocas de avaliação, enquanto que o metabólito germacreno-D-4-ol esteve presente apenas no referido genótipo. Os compostos o-cimeno e β -germacreno se destacaram no genótipo UFRRJ ECB005, tanto em relação quanto a sua alta expressão, quanto na sua estabilidade. Tal fato demonstra a divergência genética do UFRRJ ECB005 em relação aos demais genótipos.

Os resultados aqui obtidos são de grande importância para programas de melhoramento genético da erva-cidreira brasileira. Estes resultados demonstraram que é possível selecionar genótipos com óleo essencial contendo perfis químicos estáveis produzidos em diferentes épocas do ano. Esta estabilidade se dá em princípios ativos com altas ou baixas concentrações. Também, a caracterização e avaliação de genótipos com alta produção e rendimento de óleo, bem como estabilidade de produção de princípios ativos devem ser alvos de programas de melhoramento genético da erva-cidreira brasileira. A implementação de descritores morfoagronômicos para a espécie é ainda um grande gargalo, bem como os mecanismos genéticos que levam a alogamia na espécie, visto que hibridações futuras deverão ser realizadas afim de que se possa estudar com maior nível de detalhe a influência genética e de ambiente sobre a produção de cada princípio ativo. Entender o

mecanismo de reprodução na espécie também será de grande importância para obtenção de híbridos e, portanto, para a exploração da heterose ou vigor híbrido na cultura. O genótipo UFRRJ ECB005 apresentou a maior estabilidade de produção de princípios ativos durante os períodos de avaliação em 2016. Este genótipo também foi estatisticamente igual ao genótipo com maior concentração relativa de citral (geranial e neral). Portanto, este material genético se desponta como promissor, tanto para testes em campo, quanto para ser envolvido em futuras hibridações em programas de melhoramento genético da erva-cidreira brasileira.

3.2.6 Conclusões

Em relação à diversidade química do óleo essencial dos genótipos UFRRJ analisados, constatou-se que esta foi reduzida. De oito genótipos de erva-cidreira brasileira analisados, quimiótipo citral, apenas 01 (um) (UFRRJ ECB005) se destacou quanto a sua estabilidade de produção de princípios ativos entre as épocas estudadas. Este mesmo genótipo apresentou alta concentração relativa de geranial e neral, compostos que definem o quimiótipo em estudo. Portanto, recomenda-se o genótipo UFRRJ ECB005 como genitor em programas de melhoramento genético que visam à produção de híbridos estáveis para a produção de metabólitos secundários.

3.2.7 Referências bibliográficas

ADAMS, R. P. (2007). **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry** (No. Ed. 4). Allured publishing corporation. 2007.

ANVISA. **Consulta Pública nº 35, de 12 de junho de 2009. D.O.U de 23/06/09**. 2009. Disponível em <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B26836-1-0%5D.PDF>> Acesso em: 13 de março de 2017.

BLANK, A. F.; CAMÊLO, L. C. A.; ARRIGONI-BLANK, M. DE F.; PINHEIRO, J. B.; ANDRADE, T. M.; NICULAU, E. DOS S.; ALVES, P. B. Chemical Diversity in *Lippia alba*(Mill.) N. E. Brown Germplasm. **The Scientific World Journal**. v. 2015, p. 1-11. 2015.

BRANDÃO, A. D.;Viccini, L. F.; Salimena, F. R. G.; Vanzela, A. L. L.; Recco Pimentel, S. M. Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. **Journal of Plant Research**120 : 317 – 321. 2007.

BRASIL. **Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução da Diretoria Colegiada** 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0010_11_03_2014.pdf> Acessado em 16 de mar. 2017

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 211-222, 2008.

IBRAHIM, M. A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J.K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and fitotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests: review. **Agricultural and Food Science in Finland**, v.10, p. 243-259, 2001.

KELLEY, L. A.; GARDNER, S. P.; SUTCLIFFE, M. J. An automated approach for clustering an ensemble of NMR-derived protein structures into conformationally related subfamilies, **Protein Engineering**. 9 (11) (1996) 1063-1065. 1996.

KULKARNI, R. N.; RAMESH, S. Heritability estimates of citral content in East Indian lemongrass. **Theoretical Applied Genetics**. v. 73, n. 3, 1987, 476-477. 1987

MAPA. **Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC**. 2017. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_protegidas.php> Acesso em 02 de fevereiro de 2017.

MESA-ARANGO, A. C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E.. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) NE Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 878-884, 2009. 2009.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SANCHEZ-MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.201-214, 2001.

PIERRE, P. M. O.; SOUSA, S. M.; DAVIDE, L. C.; MACHADO, M. A.; VICCINI, L. F. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (2011) 83(3): 993-1005. 2011.

PINTO, E. DE P. P.; AMOROZO, M. C. DE M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de Mata Atlântica, Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.4, p. 751-762, 2006.

PROCHNOW, D.; ALTÍSSIMO, B. S.; DA SILVA, J. C.; MEIRA, D.; Caron, B. O.; Heinzmann, B. M.; Schmidt, D. Chemical composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hér) Britton due to water deficit and seasonality. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 16, n. 2, p. 121-128, 2017.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011. Disponível em: URL <http://www.rproject.org/>. 2011

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de

Glomerellacingulata e Colletotrichumgloeosporioides de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p. 301-307, 2008.

SELL, C. Chemistry of essential oils. *In*: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. Handbook of essential oil – Science, **Technology and Applications**. CRC Press, USA. p. 121-150. 2010. ISBN 978-1-4200-6315-8. 2010.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L.S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15(1): 1-5. 2005.

TAVARES, I. B.; MOMENTÉ, V. G.; DO NASCIMENTO, I. R.. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, 2011.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. Dec. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

YAMAMOTO, P. Y; COLOMBO, C. A.; AZEVEDO FILHO, J. A.; LOURENÇÃO, A. L.; MARQUES, M. O. M.; MORAIS, G. D. DA S.; CHIORATO, A. F.; MARTINS, A. L. M.; SIQUEIRA, W. J. Performance of ginger grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 5, p. 481-489, 2008.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Os genótipos UFRRJ ECB005 e UFRRJ ECB015, ambos quimiótipo citral, apresentaram rendimentos de óleo essencial satisfatórios nas duas épocas de avaliação, sendo os mais promissores. Quanto a produção de óleo essencial os genótipos apresentaram médias 0,31 e 0,29g de óleo essencial por planta.

A influência genética prevaleceu na característica rendimento de óleo essencial, que pode ser usada como parâmetro para seleção indireta. O rendimento médio de óleo essencial caiu no inverno em relação ao verão, sendo que o genótipo UFRRJ ECB015 foi o que menos variou entre as duas épocas. A produção de óleo essencial aumentou no inverno por conta da maior quantidade de biomassa produzida pelos genótipos. Folhas menos compridas exibiram tendência a apresentar maior rendimento de óleo essencial.

O genótipo UFRRJ ECB012 foi desconsiderado para a caracterização química do óleo essencial dos genótipos avaliados, pois, por se diferenciar muito dos demais e apresentar elevada instabilidade, poderia prejudicar as análises realizadas. Dessa forma, considerando 8 genótipos de erva-cidreira brasileira, todos de quimiótipo citral, quanto a sua qualidade química e estabilidade entre duas épocas de avaliação, apenas 1 (um) (UFRRJ ECB005) se destacou. Este genótipo que apresentou elevada estabilidade química também foi o que apresentou maiores médias de rendimento e de produção de óleo essencial, se colocando, dessa forma, como o genótipo mais promissor do presente estudo. A estabilidade do perfil químico do óleo essencial do genótipo UFRRJ ECB005 foi estimada em 89,80%. Esse mesmo parâmetro variou entre 43,30 à 80,72% nos demais genótipos, sendo a média geral igual a 67,55%.

Todos os genótipos avaliados apresentaram médias da porcentagem relativa de citral acima de 65% em seu óleo essencial, sendo que, a maior média foi do genótipo UFRRJ ECB019 (76,01%). Nenhum dos 8 genótipos avaliados sofreu alterações significativas quanto a produção de citral em seu óleo essencial entre as duas épocas de avaliação. O genótipo UFRRJ ECB005 além de apresentar maior rendimento de óleo essencial e maior estabilidade química, também apresentou alta concentração relativa de citral compondo o seu óleo essencial (70,15%). Portanto, recomenda-se o genótipo UFRRJ ECB005 como genitor em programas de melhoramento genético que visam à produção de híbridos estáveis para a produção do princípio ativo citral.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. (2007). **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry** (No. Ed. 4). Allured publishing corporation. 2007.
- ALLARD, R. W. Princípios do melhoramento genético das plantas. São Paulo: Edgard Blucher, 1971.
- ANVISA. **Consulta Pública nº 35, de 12 de junho de 2009. D.O.U de 23/06/09.** 2009. Disponível em <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B26836-1-0%5D.PDF>> Acesso em: 13 de março de 2017.
- BARBOSA, L. C. A.; MELO, E. C.; BOTELHO, F. M.; SANTOS, R. H. S. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) NE Brown.. **Quim. Nova**, V. 29, N. 6, P. 1221-1225, 2006.
- BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. D. O.; HEINZMANN, B. M.; MALLMANN, C. A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.
- BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.
- BERTOLINI, Alessandra Curiacos. **Estabilidade de óleo essencial de laranja, linalol e citral microencapsulados em goma arábica por atomização.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 1999.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BLANK, A. F.; CAMÊLO, L. C. A.; ARRIGONI-BLANK, M. DE F.; PINHEIRO, J. B.; ANDRADE, T. M.; NICULAU, E. DOS S.; ALVES, P. B. Chemical Diversity in *Lippia alba*(Mill.) N. E. Brown Germplasm. **The Scientific World Journal**. v. 2015, p. 1-11. 2015.
- BOTTIGNON, M. R. **Estimativas de parâmetros genéticos em *Lippia alba* (mill.) n. e. br, quimiótipo linalol, em progênies clonais de meios irmãos.** Dissertação de mestrado, Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia, Campinas, SP, 2009
- BRANDÃO, A. D.; VICCINI, L. F.; SALIMENA, F. R. G.; VANZELA, A. L. L.; RECCO PIMENTEL, S. M. Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. **Journal of Plant Research** 120 : 317 – 321. 2007.
- BRASIL. **Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução da Diretoria Colegiada** 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0010_11_03_2014.pdf> Acessado em 16 de mar. 2017

CAMARGO, S. B.; DE VASCONCELOS, D. F. S. A. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpene. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 381-387, 2015.

CAMÊLO, L. C. A.; BLANK, A. F.; EHLERT, P. A. D.; CARVALHO, C. R. D.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MATTOS, J.. Caracterização morfológica e agronômica de acessos de erva-cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) NE Br.]. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, 2011.

CASTRO, D. M. **Efeito de variação sazonal, colheita selecionada e temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* N. E. Br. exBritt. & Wilson (Verbenaceae)**. 2001 132p, Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP. 2001.

CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 75-79, 2002.

CRAVEIRO, A. A.; DE QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**, v. 16, p. 3, 1993.

CRUZ, Cosme Damiao; REGAZZI, A. J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. **Ed. UFV**, 1997.

CRUZ, C. D.; SOUZA CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Universidade Federal de Viçosa, 2006.

Cruz, C. D. (2007). Programa Genes, versão 2007. Universidade Federal de Viçosa, MG.

EHLERT, P. A. D. **Épocas de plantio, idades e horários de colheita na produção e qualidade do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Br., quimiotipo limoneno carvona**. 2003. 125f. 2003. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrônomicas-Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho. Botucatu, SP. 2003.

EHLERT, P. A. D.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M.; FENANDES, D. M.; ROCHA, W. A.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, R. F. Influência do horário de colheita sobre o rendimento e a composição do óleo essencial de erva cidreira [*Lippia alba* (Mill.) NE Br.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 15, n. 1, p. 72-77, 2013.

ESPINA, L.; GELAW, T. K.; DE LAMO-CASTELLVÍ, S.; PAGÁN, R.; GARCÍA-GONZALO, D. Mechanism of bacterial inactivation by (+)-limonene and its potential use in food preservation combined processes. **PloSone**, v. 8, n. 2, p. e56769, 2013.

FALCONER, Douglas S.; MACKAY, Trudy FC; FRANKHAM, Richard. **Introduction to quantitative genetics** (4th edn). Trends in Genetics, v. 12, n. 7, p. 280, 1996.

FAN, F.; TAO, N.; JIA, L.; HE, X. Use of citral incorporated in post harvest wax of citrus fruit as a botanical fungicide against *Penicillium digitatum*. **Post harvest Biology and technology**, v. 90, p. 52-55, 2014.

Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L. G.; Scheffer, J. J. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FRANZ, C.; NOVAK, J. Sources of Essential oils. *In*: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oil** – Science, Technology and Applications. CRC Press, USA. p. 39-82. 2010. ISBN 978-1-4200-6315-8. 2010

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

GRAND VIEW RESEARCH. **Essential Oil Market Analysis By Product (Orange, Corn Mint, Eucalyptus, Citronella, Peppermint, Lemon, Clove Leaf, Lime, Spearmint), By Application (Medical, Food & Beverage, Spa & Relaxation, Cleaning & Home) And Segment Forecasts To 2024**. 2016. Disponível em: <<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/essential-oils-market>>. Acesso em: 03 de mar. de 2017

GRIFFITHS, Anthony JF. **Introdução à genética**. Guanabara Koogan, 2008.

HALLAUER, A. R.; CARENA, M. J.; MIRANDA FILHO, JB de. **Quantitative genetics in maize breeding**. Springer Science & Business Media, 2010.

HARAGUCHI, L. M. M.; DE CARVALHO, O. B. Divisão Técnica Escola Municipal de Jardinagem. **Plantas Medicinais do curso de plantas medicinais**. São Paulo, 2010.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; DERMONT, C.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. **Chemistry & biodiversity**, v. 3, n. 10, p. 1116-1125, 2006.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 211-222, 2008.

IBRAHIM, M. A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J.K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and fitotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests: review. **Agricultural and Food Science in Finland**, v.10, p. 243-259, 2001.

IDE, C. D. **Melhoramento genético do mamoeiro (*Caricapapaya L.*): Parâmetros genéticos e capacidade combinatória em ensaios de competição de cultivares**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Campos dos Goytacazes RJ. 2008

IZADI DARBANDI, A., BAHMANI, K., SADAT NOORI, S. A., & JAFARI, A. A. Assessment of the genetic diversity in Iranian fennels by RAPD markers. **Journal of herbs, spices & medicinal plants**, 19(3), 275-285. 2013.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; BIZZO, H. R.; GRACINDO, L. A. Agronomic evaluation and identification of *Lippia alba* chemotypes from Distrito Federal, Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 412-417, 2010.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; SILVA, D. B.; GRACINDO, L. A. M.; VIEIRA, R. F. Avaliação agronômica e química de dezesseis acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) NE Brown]-quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 258-264, 2011.

KELLEY, L. A.; GARDNER, S. P.; SUTCLIFFE, M. J. An automated approach for clustering an ensemble of NMR-derived protein structures into conformationally related subfamilies, **Protein Engineering**. 9 (11) (1996) 1063-1065. 1996.

KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KULKARNI, R. N.; RAMESH, S. Heritability estimates of citral content in East Indian lemongrass. **Theoretical Applied Genetics**. v. 73, n. 3, 1987, 476-477. 1987

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

LOPES, M. P.; KATO, M. J.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J. G. S.; YOSHIDA, M. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *virola surinamensis* leaves. **Phytochemistry**., v46, n.4, p. 689-693, 1997.

MAPA. **Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC**. 2017. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_protegidas.php> Acesso em 02 de fevereiro de 2017.

MAYNARD, Luana Godinho. Efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *Lippia alba* (mill) ne brown.(erva-cidreira brasileira) em ratos. **Núcleo de Pós Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe**, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, SE 2011.

MAMUN-OR-RASHID, A. N. M.; SEM, M. K.; JAMAL, M. A. H. M.; NASRIN, S A comprehensive ethno-pharmacological review on *Lippia alba* M. **International Journal of Biomedical Materials Research**, v.1, n.1, p.14–20, 2013

MESA-ARANGO, A. C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) NE Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 878-884, 2009.

MING, L.C. **Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. -Verbenaceae**. 206 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 1992.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Hortic. bras**, v. 27, n. 2, 2009.

NASCIMENTO I. B.; INNECCO R.; MATOS S. H.; BORGES N. S. S.; MARCO C.A. 2006. Influência do horário de corte na produção de óleo essencial de capim santo (*Andropogum* sp.). **Revista Caatinga** 19: 123-127. 2006.

OLIVEIRA, E. R.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte–MG. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 14, n. 2, p. 311-320, 2012.

ONAWUNMI, Grace O. Evaluation of the anti-microbial activity of citral. **Letters in applied microbiology**, v. 9, n. 3, p. 105-108, 1989.

PASCUAL, E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; VILLAR, Á. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). II **Farmaco**, v. 56, n. 5, p. 501-504, 2001.

PEÑUELA, F. **Acúmulo de biomassa e produção do óleo essencial de procedências de *Lippia alba* (Mill.) NE BrexBritt. e P. Wilson, Quimiotipo Linalol, no Município de Pinhais-Paraná.** Dissertação de mestrado. Curitiba, SP. 2010.

PIERRE, P. M. O.; SOUSA, S. M.; DAVIDE, L. C.; MACHADO, M. A.; VICCINI, L. F. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (2011) 83(3): 993-1005. 2011.

PIMENTA, M. R.; FERNANDES, L. S.; PEREIRA, U. J.; GARCIA, L. S.; LEAL, S. R.; LEITÃO, S. G.; PEIXOTO, P. H. P. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L.(Verbenaceae). **Rev. Bras. Bot**, v. 30, p. 211-220, 2007.

PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M. C. DE M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de Mata Atlântica, Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.4, p. 751-762, 2006.

PROCHNOW, D.; ALTÍSSIMO, B. S.; DA SILVA, J. C.; MEIRA, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M.; SCHMIDT, D. Chemical composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hér) Britton due to water deficit and seasonality. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 16, n. 2, p. 121-128, 2017.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011. Disponível em: URL <http://www.rproject.org/>.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. C.; MIO, L. L. M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p. 301-307, 2008.

RUFINO, E. R.; SIQUEIRA, W. J.; MARQUES, M. O. M.; COLOMBO, C. A.; CHIORATO, A. F.; AZEVEDO FILHO, J. A.; MARTINS, A. L. M. Genetic parameter

estimates of traits related to vigor of *Lippia alba* cuttings. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 779-786, 2010.

SALIMENA, F. R. G.; MÚLGURA, M. E. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 1, 2015.

SANTOS, M. R. A; INNECCO, R. Adubação orgânica e altura de corte da erva-cidreira brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 182-185, 2004.

SCHEFFER, M.C. Estudo de aspectos agronômicos das plantas medicinais selecionadas pela fitoterapia do SUS-PR/CEMEPAR. **Informa**, v.10, p.29-31, 1991.

SELL, C. Chemistry of essential oils. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oil** – Science, Technology and Applications. CRC Press, USA. p. 121-150. 2010. ISBN 978-1-4200-6315-8 2010.

SILVA, N. A.; OLIVEIRA, F. F.; COSTA, L. C. B.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, R. A. Caracterização química do óleo essencial da erva-cidreira (*Lippia alba* (Mill.) NE Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 52-55, 2006.

STEFANINI, M. B.; RODRIGUES, S. D.; MING, L. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. **Horticultura brasileira**, v. 20, n. 1, p. 18-23, 2002.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LEITÃO, S. G.; LAGE, C. L. S.; VICCINI, L.; PIERRE, P. M. O.; DAVIDE, L. C. Diferenças morfológicas, anatômicas e fisiológicas de dois quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) NE Br. relacionadas à poliploidia. In: **VI Congresso de Ecologia do Brasil, Simpósios Biodiversidade, Unidades de Conservação, Indicadores Ambientais, Cerrado e Caatinga**. 2003.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L.S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15(1): 1-5. 2005.

TAVARES, I. B.; MOMENTÉ, V. G.; DO NASCIMENTO, I. R.. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agronômicos. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, 2011.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. Dec. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VÁSQUEZ, S. P. F.; MENDONÇA, M. S.; NODA, S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 457-472, 2014.

VENTRELLA, M. C. **Produção de folhas, óleo essencial e anatomia foliar quantitativa de *Lippia alba* (Mill.) NE Br.(Verbenaceae) em diferentes níveis de sombreamento e**

épocas de colheita. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, SP. 2000.

YAMAMOTO, P. Y. **Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (mill.) ne br.** 2006. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico de Campinas, Campina. 2006

YAMAMOTO, P. Y.; COLOMBO, C. A.; AZEVEDO FILHO, J. A.; LOURENÇÃO, A. L.; MARQUES, M. O. M.; MORAIS, G. D. D. S.; SIQUEIRA, W. J. Performance of ginger grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 5, p. 481-489, 2008.