



**MESSULAN RODRIGUES MEIRA**

**ECOGEOGRAFIA E DIVERSIDADES  
GENÉTICA E QUÍMICA DE  
*Lippia aff. rotundifolia Cham.***

**LAVRAS - MG**

**2016**

**MESSULAN RODRIGUES MEIRA**

**ECOGEOGRAFIA E DIVERSIDADES GENÉTICA E QUÍMICA DE**  
*Lippia aff. rotundifolia Cham.*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Luciane Vilela Resende  
Orientadora

**LAVRAS - MG**  
**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Meira, Messulan Rodrigues.

Ecogeografia e diversidades genética e química de *Lippia aff. rotundifolia Cham.* / Messulan Rodrigues Meira. – Lavras : UFLA, 2016.

158 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientadora: Luciane Vilela Resende.

Bibliografia.

1. Conservação. 2. Chá-de-pedestre. 3. Compostos voláteis. 4. Plantas medicinais. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**MESSULAN RODRIGUES MEIRA**

**ECOGEOGRAFIA E DIVERSIDADES GENÉTICA E QUÍMICA DE**  
*Lippia aff. rotundifolia Cham.*

**ECOGEOGRAPHY, GENETIC AND CHEMICAL DIVERSITY OF**  
*Lippia rotundifolia Cham.*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 15 de agosto de 2016.

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci      UFLA

Prof. Dr. Manuel Losada Gavilanes              UFLA

Prof. Dr. Ernane Ronie Martins                  UFMG

Profa. Dra. Dulcinéia de Carvalho              UFLA

Profa. Dra. Luciane Vilela Resende  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2016**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida e sabedoria.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

Ao CNPq, pelo fomento à pesquisa.

Ao Professor Ernane Ronie Martins, pela possibilidade do começo, dedicação à pesquisa e pela amizade.

À Professora Luciane Vilela Resende, pela amizade e confiança.

Às Professoras Rúbia (ICA/UFMG) e Fátima Salimena (UFJF), pelo auxílio na identificação da espécie.

À Francine Fonseca, pela colaboração e auxílio na identificação dos compostos químicos.

À Andréia Fonseca, curadora do Herbário da PAMG.

À PAMG, pelo depósito do material botânico.

À ESAL, pelo depósito do material botânico.

Às universidades UFLA e UFMG, em especial ao Instituto de Ciências Agrárias, que me deu a oportunidade de me dedicar à pesquisa.

Aos colegas e profissionais do Laboratório de Plantas Medicinais do ICA/UFMG.

Aos colegas e profissionais do Laboratório de Química Analítica do ICA/UFMG.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia do CPCA - ICA/UFMG.

Ao Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares, pela oportunidade da realização de um sonho.

Aos professores e colegas do PPGPMAC.

À minha família, em especial à minha mãe Ana e ao meu pai Nehemias (*in memoriam*) por tudo que sou, pois não consigo imaginar minha história sem o início que foram vocês.

Ao meu esposo Rafael Majuste, pelo amor e compreensão.

Ao meu livro humano de autoajuda Jaconias Meira, pelas palavras sábias que me confortam e renovam minhas forças.

A todos aqueles que não foram citados, mas que contribuíram, efetivamente, para a realização desta TESE.

## RESUMO GERAL

Objetivou-se com a presente tese caracterizar a ecogeografia, a diversidade genética química de *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) em populações naturais do estado de Minas Gerais, Brasil. Para alcançar o objetivo, foi caracterizada a ecogeografia em 13 locais de cinco mesorregiões em Minas Gerais. Os locais de estudo foram Gigante e Rio do Peixe no município de Botumirim, Rio Tigre no município de Gouveia, Joaquim Felício no mesmo município, São Gonçalo do Rio das Pedras no município de Serro, Comunidade Abóboras no município de Montes Claros, Parque Estadual de Serra Nova, no município de Rio Pardo de Minas, APA de Olhos D'água no município de Olhos D'água, Parque Estadual Veredas do Peruaçu no município de Cônego Marinho, Parque Ecológico Quedas do Rio Bonito no município de Lavras, Reserva Particular do Patrimônio Natural Brumas do Espinhaço no município de Lapinha, Santana do Riacho no mesmo município e Parque Estadual do Rio Preto em São Gonçalo do Rio Preto. Os ambientes foram localizados por meio de caminhadas na cadeia do espinhaço e pela consulta ao banco de informações do Herbário Virtual da Flora e dos Fungos. Os locais foram georreferenciados para confecção das cartas temáticas e análise dos dados. Dentre as características ecogeográficas foram abordadas o grau de antropismo, queimada, aspectos climáticos (altitude, precipitação, temperatura) e atributos físico-químicos do solo. Para o estudo de diversidade, coletaram-se exemplares para identificação botânica e propagação vegetativa. De posse do material cultivado em casa de vegetação foram analisadas as características genéticas e composição química. Para a diversidade genética, utilizaram-se marcadores do tipo ISSR e para a análise química, a técnica de *headspace* estático e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Dos resultados obtidos, a *Lippia rotundifolia* mostrou ser generalista quanto aos fatores ecogeográficos e edafoclimáticos e ocorrem em solos arenosos e hiperdistróficos com baixa variabilidade genética e grande número de compostos químicos. A maior variabilidade molecular da espécie ocorre entre os indivíduos de cada ambiente, sendo a população de Rio Tigre no município de Gouveia a mais distante geneticamente. Foram detectados 67 compostos em 11 acessos. O acesso de São Gonçalo do Rio das Pedras, em Serro, detém a maior abundância química em área relativa. Os compostos voláteis mirceno,  $\beta$ -linalol e cariofileno são os mais comuns detectados pela espécie. Espera-se que esta pesquisa incentive outros estudos com espécies nativas de potencial medicinal visando o uso racional dos recursos genéticos e químicos da flora nativa.

**Palavras-chave:** Conservação. Ecogeografia Diversidade genética. Compostos voláteis. Chá-de-pedestre. Plantas medicinais.

## GENERAL ABSTRACT

It was aimed with this thesis to characterize the ecogeography, genetic and chemical diversity of *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) in natural populations of the State of Minas Gerais, Brazil. To achieve the goal, ecogeographic features in 13 sites of five mesoregions in Minas Gerais were made. The studied sites were Gigante and Rio do Peixe in the city of Botumirim, Rio Tigre in the city of Gouveia, Joaquim Felício in the same city, São Gonçalo do Rio das Pedras in the city of Serro, Abóboras Community in the city of Montes Claros, Serra Nova State Park in Rio Pardo de Minas city, APA de Olhos D'água in the same city, State Park of Veredas do Peruaçu in the city of Cônego Marinho, Quedas do Rio Bonito Ecological Park in the city of Lavras, Private Reserve of the Natural Heritage Brumas do Espinhaço in the city of Lapinha, Santana do Riacho in the same city and State Park of Rio Preto in São Gonçalo do Rio Preto. The environments were located through hikes in Cadeia do Espinhaço and through consultation of the Virtual Herbarium of Flora and Fungi database information. The sites were georeferenced for production of the thematic cards and the data analysis. Among the ecogeographic characteristics, the degree of anthropism, burnings, climatic aspects (altitude, rainfall, temperature) and physical-chemical soil properties were addressed. For the study of diversity, samples for botanical identification and vegetative propagation were collected. Possessing the cultivated material in a greenhouse the genetic and chemical composition were analyzed. For the genetic diversity it was used markers of ISSR type and for chemical analysis, the static headspace technique and gas chromatography connected to the mass spectrometer. From the results, the *Lippia rotundifolia* proved to be generalist with regarding to ecogeographic and edaphoclimatic factors and occurs in sandy and hyper dystrophic soils with low genetic variability and large number of chemical compounds. The higher molecular variability of the species occurs between individuals of each environment being that the population of Rio Tigre in the city of Gouveia is the most genetically distant. Sixty-seven compounds were detected in eleven environments. The access of São Gonçalo do Rio das Pedras, in Serro, holds the largest chemical abundance in relative area. The volatiles compounds myrcene,  $\beta$ -linalool and caryophyllene are the most common detected by the species. It is hoped that this research encourages other studies with native species of medicinal potential aiming the rational use of genetic and chemical resources of the native flora.

**Keywords:** Conservation. Ecogeography. genetic diversity. Volatile compounds. Pedestrian tea. Medicinal plants.



## SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	11
1.1 Objetivo geral.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.1 As plantas medicinais .....	13
2.2 Cerrado e a fitofisionomia dos Campos Rupestres.....	13
2.3 Estudos ecogeográficos como subsídio para conservação de espécies nativas .....	15
2.4 Verbenaceae e sua importância nos campos rupestres .....	17
2.4.1 <i>Lippia</i> sp. Linn. ....	17
2.4.2 <i>Lippia rotundifolia</i> Cham. ....	18
2.4.3 Importância medicinal .....	20
2.4.4 Compostos voláteis .....	21
2.4.5 Análise dos compostos voláteis para estudo da variabilidade química .....	23
2.4.6 Headspace como método de obtenção da amostra para análise cromatográfica.....	24
2.5 Diversidade genética.....	27
2.6 Análise molecular aplicada em estudo da diversidade dos recursos genéticos vegetais.....	30
2.7 Estatística molecular aplicada em estudos de diversidade genética .....	31
3 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS .....	35
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS .....	47
ARTIGO 1 ECOGEOGRAFIA DE <i>Lippia rotundifolia</i> CHAM. (VERBENACEAE) EM MINAS GERAIS, BRASIL .....	47
1 INTRODUÇÃO .....	51
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS .....	71
ARTIGO 2 DIVERSIDADE GENÉTICA DE CHÁ-DE-PEDESTRE ( <i>Lippia rotundifolia</i> ) EM MINAS GERAIS, BRASIL .....	75
1 INTRODUÇÃO .....	79
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	81
2.1 Extração de DNA .....	83
2.2 Quantificação do DNA .....	84
2.3 Determinação da temperatura de anelamento e reação.....	84

2.4	Análise de dados .....	85
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
4	CONCLUSÃO.....	105
	REFERÊNCIAS .....	107
	<b>ARTIGO 3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS VOLÁTEIS DE</b> <b><i>Lippia rotundifolia Cham.</i> (VERBENACEAE) EM MINAS</b> <b>GERAIS, BRASIL.....</b>	113
1	INTRODUÇÃO .....	117
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	119
2.1	Obtenção das amostras .....	119
2.2	Extração de voláteis e análise cromatográfica por <i>headspace</i> estático (HS CG-EM).....	121
2.3	Análise estatística multivariada .....	122
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	125
4	CONCLUSÃO.....	139
	REFERÊNCIAS .....	141
	COSIDERAÇÕES FINAIS.....	147
	ANEXO A - CONDIÇÕES ANALÍTICAS .....	149
	ANEXO B - ESPECTROS DE MASSA DOS COMPOSTOS DETECTADOS E NÃO IDENTIFICADOS PELA LITERATURA ADAMS (2007; 2009).....	152
	ANEXO C - DECLARAÇÃO DE DEPÓSITO DO MATERIAL BOTÂNICO .....	156



## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

É sabido que 95% da população assistida pelo SUS utilizam as plantas no atendimento primário à saúde. No Brasil, 50% dos medicamentos farmacêuticos derivam direta ou indiretamente de plantas extraídas da natureza (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). A maioria dos compostos extraídos ou sintetizados das plantas está concentrado na Floresta Amazônica e no Cerrado. Sendo o Cerrado o segundo maior Bioma brasileiro (MACHADO et al., 2004; SANO et al., 2008).

Os campos rupestres são uma das fitofisionomias do Cerrado. Neste bioma, encontram-se grandes reservatórios aquíferos e alto grau de endemismo com vegetação frágil e de baixa resiliência. Essas características fazem do Cerrado um dos *hotspot* para conservação da diversidade biológica (ECHTERNACHT et al., 2011). Espécies da família Verbenaceae, especificamente do gênero *Lippia*, são um dos exemplos da vegetação típica deste ecossistema. Dentre essas espécies está a *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae).

Conhecida pelos moradores no entorno da estrada real como chá-de-frade, foi descoberta no século XIX pelos naturalistas visitantes do Brasil (BRANDÃO, 2010; BRANDÃO et al., 2012). No ambiente natural, esta planta é confundida com outras espécies do mesmo gênero pela semelhança morfológica e sincronismo reprodutivo. Alguns pesquisadores conseguiram distinção desta espécie a partir de análise da composição química.

Esta planta é rica em limoneno, micenol e  $\beta$ -linalol. Estes compostos, em sinergismo com os demais produzidos em quantidade traço, conferem à planta potencial calmante, sedativo e antimicrobiano (LEITÃO, 2008; SILVA, 2013; SOUSA et al., 2015). Nas comunidades locais, é utilizada para banhos

relaxantes e escalda-pés. A única forma de obtenção da matéria-prima é por extrativismo. Este tipo de exploração compromete a estrutura populacional de muitas espécies aromáticas levando-as ao esgotamento de seus recursos.

Conhecer as características botânicas, ecogeográfica, química e molecular desta planta, é muito importante para a sua conservação. Uma vez que a identificação de locais detentores de possíveis quimiotipos, com maior variabilidade genética, permite a exploração de forma sustentável mantendo esses recursos *in situ*, garantindo que o mesmo possa atender as necessidades das futuras gerações.

### **1.1 Objetivo geral**

Caracterizar a ecogeografia, a diversidade genética e a composição química de *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) em populações naturais do estado de Minas Gerais, Brasil.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 As plantas medicinais**

Todas as culturas, desde a antiguidade, utilizaram plantas como fonte de medicamentos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 85% da população mundial depende da medicina tradicional para as necessidades primárias de saúde (MS, 2016).

A resolução nº 3.133 de 1978, da OMS, faz um apelo para a abordagem ampla do tema plantas medicinais. A resolução nº 3.043, de 1987, da própria OMS, recomenda com insistência aos países em desenvolvimento usarem os sistemas tradicionais de medicina. Atualmente, 95% da população assistida pelo SUS, utilizam as plantas no atendimento primário à saúde (MS, 2016).

Tal é a importância das plantas medicinais que a OMS estima um total de 20.000 espécies de plantas superiores utilizadas em todas as partes do mundo para fins medicinais. No Brasil, 50% dos medicamentos farmacêuticos derivam direta ou indiretamente de plantas extraídas da natureza (MS, 2016). A maioria dos compostos extraídos ou sintetizados das plantas está concentrada na Floresta Amazônica e no Cerrado. Nos últimos anos, a perda da vegetação do Cerrado tem sido intensificada devido ao extrativismo e às descobertas de novos produtos vegetais de interesse financeiro (MACHADO et al., 2004).

### **2.2 Cerrado e a fitofisionomia dos Campos Rupestres**

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro em área de extensão territorial (SANO et al., 2008). Sua principal característica é a formação vegetal específica devido às adaptações morfológicas e ecofisiológicas desenvolvidas pelas plantas para sua sobrevivência nas diferentes conformações vegetais. Dentre as fitofisionomias que compõem o Cerrado, está o campo rupestre.

A Cadeia do Espinhaço está localizada na região Norte-sul dos estados de Minas Gerais e Bahia com cerca de 1.100 km de comprimento e de 50 a 100

km de largura e com altitudes superiores a 800 m, atingindo cerca de 2.000 m em alguns pontos específicos (RAPINI et al., 2008). Abriga três biomas: Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado. Os dois últimos biomas fazem parte dos *hotspot* para conservação devido ao endemismo de muitas espécies bem como muitas delas estão ameaçadas de extinção (DURIGAN et al., 2011). Ocupa uma área de 3.076.457,8 hectares, sendo que desta área 68% correspondem às unidades de conservação (DOMINGUES; BERMANN, 2012; ECHTERNACHT et al., 2011).

A Cadeia do Espinhaço, comumente reconhecida como serra, em 1693, foi o cenário da primeira descoberta da riqueza mineral brasileira, feita por um Português, o qual nomeou a área de Minas Gerais. A partir do final do século XVII até o século XIX, a Serra do Espinhaço foi uma passagem obrigatória, cortada pela estrada real. Está localizada no Vale do Jequitinhonha onde a população é composta por povoados e aldeias de baixa renda e baixo grau de escolaridade (DOMINGUES; BERMANN, 2012; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012).

Uma das maiores taxas de endemismo da flora brasileira é encontrada na Serra do Espinhaço, particularmente na Serra do Cipó (ECHTERNACHT et al., 2011). Além do endemismo, concentra-se uma alta taxa de reservatórios aquíferos, dividindo duas grandes bacias hidrográficas na região: a Oeste, o rio São Francisco e ao Leste, o rio Doce e Jequitinhonha.

Os campos rupestres são formados por um rico mosaico de comunidades vegetais que dependem do formato do solo local, natureza do substrato e microclima e até mesmo na interação com os microrganismos (CARVALHO et al., 2012; FERNANDES et al., 2011). É um ecossistema altamente frágil, com baixa resiliência em que a vegetação rupestre está associada aos solos ricos em metais, sendo este o motivo da denominação de Quadrilátero Ferrífero, em que

muitos componentes vegetais dos campos rupestres são especialistas em bioacumulação de metais (JACOBI; CARMO; CAMPOS, 2011).

### **2.3 Estudos ecogeográficos como subsídio para conservação de espécies nativas**

A ecogeografia é uma área que investiga a adaptação das espécies vegetais quanto aos fatores geográficos, edáficos e climáticos. Dentre os fatores, podem-se considerar o nível de estresse pelo qual a vegetação está exposta, o clima quanto à temperatura e precipitação, o solo e a topografia como promotores de microclima. É sabido que os solos do Cerrado possuem características de deficiência nutricional e elevados teores de alumínio (GOODLAND; FERRI, 1979). Embora o Cerrado possua esta característica, as diferentes fitofisionomias respondem às características ecogeográficas distintas, uma vez que o local e os fatores ecológicos determinam a dinâmica das populações naturais, onde cada ambiente possui sua própria ecologia. Muitas espécies são melhores adaptadas em áreas de transição, enquanto outras são exclusivistas de determinada fitofisionomia. Portanto, estudar a afinidade da ecologia de cada genótipo contribui para estabelecer uma relação quantitativa entre *habitats* heterogêneos e diversidade genotípica das espécies nativas (JARADAT, 2011).

Os fatores ecogeográficos são um dos primeiros passos da pesquisa que contribuem para o entendimento da dinâmica populacional das espécies nativas. Identificar os ambientes de espécies vegetais de interesse comercial é muito importante para desenvolver estratégia para a conservação dos recursos genéticos vegetais (LEBEDA; DOLEZALOVÁ; NOVOTNÁ, 2012), além de delinear cultivos que promovam a obtenção de matéria-prima para atender esta demanda (PARRA-QUIJANO et al., 2012; SOUSA et al., 2008). Estudos ecogeográficos mostraram que plantas economicamente importantes como o



alecrim pimenta (*Lippia sidoides*, Verbenaceae), ocorre naturalmente em solos pobres e ácidos, com clima quente em regiões com diferentes níveis de precipitação e altitude (MELO, 2012). O orégano mexicano (*Lippia origanóides*, Verbenaceae) é generalista, com ampla distribuição geográfica variando desde 300 até 2.600 metros de altitude, sendo que a maior abundância está localizada nas maiores altitudes, preferencialmente em solos pobres (VEGA-VELA; SÁNCHEZ, 2012). A erva baleeira (*Varronia curassavica* Boraginaceae) é generalista quanto aos fatores ecogeográficos e edafoclimáticos (MENDES et al., 2015). A fava d'anta (*Dimorphandra mollis*, Fabaceae), é tolerante a solos com alto índice de acidez e alta saturação de alumínio (SOUSA et al., 2008), enquanto que a ipeca *Psychotria ipecacuanha*, Rubiaceae, ocorre preferencialmente em solos distróficos. Além da caracterização do solo, os estudos também identificaram populações produtoras de compostos secundários de interesse farmacológico e também permitiram analisar os níveis de erosão genética de cada espécie (MARTINS et al., 2009).

Informações como estas, são importantes para definir estratégias de conservação em solos do Cerrado. Uma vez que, a pedregosidade e topografia dos ambientes rupestres dificultam a penetração de água para o subsolo (MARTINS et al., 2009; SOUSA et al., 2008). Essa deficiência na drenagem torna as terras inóspitas para atividades agrícolas. Por isso a única forma de explorar esses ambientes é pelo extrativismo. Logo, esse ocorre de forma descontrolada, comprometendo a estabilidade das espécies. Porém, estas paisagens são predominantemente de ambientes ricos em nascentes e detém grande riqueza biológica. Sendo assim, o melhor aproveitamento desses solos se dá com a manutenção da vegetação nativa bem como com a proteção das nascentes neles encontradas (RAPINI et al., 2008).

## 2.4 Verbenaceae e sua importância nos campos rupestres

Espécies da família Verbenaceae ocorrem em todo ecossistema terrestre, sendo uma das cinco famílias mais importantes entre as Eudicotiledôneas encontradas em campos rupestres (GIULIETTI et al., 1987). A família apresenta em média 36 gêneros e 1.035 espécies incluindo herbáceas, sub-herbáceas e árvores, com uma distribuição pantropical, mas principalmente neotropical (LORENZI; MATOS, 2008). Os gêneros mais representativos são: *Verbena*, *Lippia*, *Citharexylum*, *Stachytarpheta*, *Glandularia* e *Duranta* (JUDD et al., 2002). A família Verbenaceae pertence à ordem Lamiales, encontrando-se no clado Asterídes e subclado Euasteríde I (BREMER, 2003).

### 2.4.1 *Lippia* sp. Linn.

*Lippia* é o segundo maior gênero da família. Está inserido na tribo Lantanae Briq., subtribo Lantaninae e pertence à classe Equisetopsida, subclasse Magnoliidae e superordem Asteranae. Neste gênero, apresenta cerca de 200 espécies e dessas, 160 ocorrem principalmente no Sul da América Central, Paraguai, México, Brasil, Argentina e Bolívia como também em algumas áreas de floresta tropical da África (TRONCOSO, 1974). Sendo que os principais centros de diversidade do gênero estão localizados no Brasil e no México (SALIMENA-PIRES, 1998). A maioria das espécies do gênero está concentrada no Brasil, com 75% das 160 espécies descritas, onde estas podem ser facilmente encontradas nos campos brasileiros com altitudes entre 956 a 1.273 m, especificamente na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e na Chapada Diamantina na Bahia (PIMENTA et al., 2007; SAMPAIO, 2009; VICCINI et al., 2006).

Dentre as espécies que ocorrem na Cadeia do Espinhaço, estão a *Lippia hermannioides* Cham., *Lippia salviifolia* Cham., *Lippia sidoides* Cham., *Lippia lupulina* Cham., *Lippia florida* Cham., *Lippia lacunosa* (Mart. & Schauer),

*Lippia lasiocalycina* Schauer, *Lippia diamantinensis* Glaz., *Lippia hederæfolia* Mart. & Schauer, *Lippia rosella* Mold., *Lippia rhodocnemis* Mart. & Schauer, *Lippia rotundifolia* Cham., *Lippia alba* (Mill.), *Lippia pohliana* Schauer, *Lippia rubella* Mold., *Lippia martiana* Cham., *Lippia corymbosa* Cham., *Lippia filifolia* Cham. e *Lippia pseudo-thea* (St. Hil) Schauer. (PIMENTA et al., 2007; SAMPAIO, 2009; SOUSA; TORRES; VICCINI, 2012). Com exceção das quatro primeiras, que têm distribuição mais ampla, as demais são todas endêmicas da Cadeia do Espinhaço (SAMPAIO, 2009).

#### 2.4.2 *Lippia rotundifolia* Cham.

*Lippia rotundifolia*, pertence à seção Zapania Schauer, é um arbusto de 0,5 a 2 m de altura (SALIMENA; SILVA, 2009). De caule ereto que, na sua parte terminal, subdivide-se em vários caules de flores agrupadas em grandes cachos compostos. Com inflorescências axilares, globosas e subciclícas após as anteses, solitárias, geminadas ou terminais em racemos, com brácteas côncavas ou planas e flores plurisseriadas dispostas em densos capítulos na cor rosa-lilás monoclinas e de tubo interiormente amarelo conforme apresentado na Figura 1 (SAMPAIO, 2009). O período de floração é de junho a dezembro, e suas populações são pequenas e dispersas (MARTENS, 2008).

Figura 1 - *Lippia rotundifolia* Cham.



Esta espécie foi uma das plantas descobertas no século XIX pelos naturalistas visitantes do Brasil para conhecer a flora nativa. Conhecida pelos

moradores no entorno da estrada real como chá-de-frade, chá-de-pedestre, cidrilha, camará, capitão-do-mato e rosmaninho. O nome vernacular chá-de-pedestre foi o primeiro a ser reconhecido e registrado por Auguste de Saint-Hilaire e Carl Friedrich Philipp Von Martius durante sua expedição, tornando esse então o nome mais popular em sua área de ocorrência natural. Esta espécie foi descrita pelos nomes científicos: *Lantana* ou *Lippia pseudothea* Schauer A. St-Hil, sendo essa a primeira classificação da planta (BRANDÃO, 2010; BRANDÃO et al., 2012).

Segundo Soares (2001), na nomenclatura das espécies consistente em The International Plant Names Index levando em conta as denominações populares do gênero empregada no Brasil, existem 564 espécies citadas e 83 sinonímias. Dentre esses não foi registrado nenhum sinônimo para o binômio válido da *Lippia rotundifolia* Cham. Mesmo assim, a espécie possui delimitações taxonômicas. A principal confusão botânica da espécie ocorre com a *Lippia lacunosa*. Embora sejam dois táxons distintos, em muitos herbários estes táxons são considerados como sinônimos botânicos. A distinção entre eles é muito difícil e só é realizado por meio de análises do limbo da folha, morfologia da base e das brácteas (THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX, 2015; ZARGARI, 1990).

Por mais que essas características evidenciem a diferença entre as espécies, elas são confundidas em campo em função da semelhança nas características botânicas, sincronismo fenológico e plasticidade fenotípica, o que aumenta a dificuldade em diferenciá-las. Portanto, a única diferença registrada entre essas duas espécies ocorre na anatomia do grão de pólen, pois estudos taxonômicos realizados nessa estrutura indicaram que as duas espécies são distintas entre si (SOUSA et al., 2013). Existem registros diferentes para a mesma espécie em vários Herbários no Brasil. Mesmo com todas as evidências taxonômicas, ainda assim, Salimena e Mulgura (2015) em revisão taxonômica

do gênero, sustentam a possibilidade de a *L. lacunosa* ser um novo sinônimo para a *L. rotundifolia*.

A dificuldade na distinção entre esses dois táxons, pode ser devido ao excesso de hibridização que ocorre entre as espécies da família Verbenaceae, bem como o grau de ploidia entre essas espécies (SANDERS, 2001). Esta segunda opção é corroborada por Viccini et al. (2005) que, ao estudarem 14 espécies do gênero *Lippia*, endêmicas da Cadeia do Espinhaço, observaram que três espécies são originárias por autopoliploidia ou aloploidia. Para os autores, a *L. diamantinesis* n=26 pode ter se originado do cruzamento interespecífico entre espécies n=12 e n=14 seguido de duplicação do número de cromossomo e as espécies *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*, ambas com n=28, podem ter suas origens provenientes do cruzamento de dois indivíduos com n=14, também seguida de duplicação de cromossomo variando de n=20 até n=56 (VICCINI et al., 2005). Entretanto, com todas essas evidências, existe a possibilidade dos dois binômios serem sinônimos, mas para esta afirmação são necessários estudos que validem esta hipótese.

### 2.4.3 Importância medicinal

Apesar da dificuldade na identificação das espécies do gênero *Lippia*, todas elas são aromáticas e fortemente consumidas pela eficácia curativa. A peculiaridade medicinal e a especificidade dessas plantas, em áreas restritas, têm atraído a atenção das indústrias farmacêuticas nos últimos anos (MYERS et al., 2000). O principal motivo do interesse é o conteúdo biologicamente ativo existente na planta como produto do metabolismo secundário. Em que diversas espécies do gênero apresentam propriedades medicinais já comprovadas. Dentre os diversos empregos, destaca-se a ação antibacteriana, anti-inflamatória, antisséptica e cicatrizante (*L. sidoides*), efeitos contra problemas respiratórios, tosse, resfriado e bronquite (*L. dulcis* e *L. alba*) (COMPADRE et al., 1986),

sedativo, antiespasmódico, estomáquico (*L. alba*), problemas no fígado, infecções cutâneas, disenteria e desordens menstruais, além de agir como antipirético, ação antimalárica (*L. multiflora*) e controle da hipertensão (NOAMESI, 1977).

Para a *Lippia rotundifolia* Leitão (2008) registraram o limoneno (26%) e o micenol (22,3%) como compostos químicos majoritários da espécie sob cultivo protegido. Posteriormente, Silva (2013) registrou o  $\beta$ -linalol (62,6%) como o composto majoritário produzido em população nativa. Segundo esses autores, a planta possui grande potencial calmante e sedativo, o qual corrobora ao primeiro uso caseiro atribuído à espécie (LEITÃO, 2008). Em estudos preliminares, a espécie também apresentou atividade antimicrobiana com resultados altamente satisfatórios (LEITÃO, 2008; SOUSA et al., 2015). Essas informações mostram o quanto a planta é promissora para a formulação de produtos de qualidade competitiva com o mercado.

#### **2.4.4 Compostos voláteis**

Os compostos voláteis ocorrem naturalmente como misturas complexas em várias plantas odoríferas. Estes compostos são produzidos pelas estruturas secretoras especializadas como tricomas (pelos) glandulares, células parenquimáticas diferenciadas em canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas. Estas estruturas podem estar presentes em qualquer órgão da planta. Em algumas espécies, esses compostos se destacam em determinado órgão pela quantidade e em outro pela composição química. Sendo produzidas de acordo a necessidade do vegetal em resposta às condições adversas no qual está exposto (FIGUEIREDO; PEDRO; BARROSO, 2014; OLIVEIRA, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os mono e sesquiterpenos são as principais substâncias que compõem as misturas presentes nos compostos voláteis. Estes compostos normalmente

apresentam sabor acre (ácido) e picante. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre (SILVA, 2013). Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; um deles é o marcador produzido em maior quantidade e os demais em menores teores e outros em quantidades traços (SIMÕES et al., 2007).

Os compostos químicos de origem terpênic são favorecidos em função da atividade enzimática da enzima terpeno-sintase sob altas temperaturas (OLIVEIRA, 2014; PAVARINI; LOPES, 2016). A termorresistência enzimática da terpeno-sintase as quais utilizam diferentes prenil difosfatos como substratos para sintetizar novas moléculas, podem ligeiramente alterar a cadeia carbônica dos compostos terpênicos, e em poucas etapas, transformarem em produtos de química fina (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013). Sendo esta modificação de grande interesse para a indústria de perfumaria, pois terpenos sintéticos são mais baratos e facilmente disponíveis e uniformes (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS JÚNIOR, 2013). Porém nem todas as moléculas possuem sua forma sintética no mercado (KOLICHESKI, 2006). Portanto, muitas espécies vegetais de uso medicinal conhecido são obtidas por extrativismo, cujo efeito terapêutico é obtido por ação sinérgica do composto com as demais formas isoméricas e de outros compostos presentes na planta (PAVARINI; LOPES, 2016; WINSKA et al., 2014). Assim, essa forma de obtenção da matéria-prima é a que mais compromete a estrutura populacional de muitas espécies aromáticas levando-as ao esgotamento de seus recursos genéticos.

#### 2.4.5 Análise dos compostos voláteis para estudo da variabilidade química

A caracterização da variabilidade química existente em uma espécie aromática é muito importante tanto para conservação dos quimiotipos quanto para identificação dos ambientes promotores dos compostos de interesse comercial. A partir de estudos dessa natureza, foi possível observar que a *Lippia sidoides* nativa é diferente quimicamente da composição comercial, em que plantas *in loco* produzem em média 24 componentes e dentre esses, o monoterpene carvacrol é o componente majoritário, enquanto que a amostra comercial detém 27 componentes e dentre esses o majoritário foi o eucaliptol (CAMELO et al., 2014). A literatura também reporta que a *Lippia rotundifolia* possui dois quimiotipos, sendo um mirtenal e um linalol (LEITÃO, 2008; SILVA, 2013).

A detecção desses compostos é feito por um método de separação analítica. A cromatografia gasosa é a principal técnica analítica utilizada para separar e quantificar misturas complexas de produtos voláteis termicamente estáveis com ponto de ebulição de até 300 °C (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Por isso é amplamente utilizada em estudos de espécies vegetais e aceita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) pela eficiência na separação de compostos para administração de drogas e alimentos (COMISSÃO PERMANENTE DE REVISÃO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; SPARKMAN; PENTON; KITSON, 2011).

O princípio básico da análise cromatográfica é a separação de amostras em fase gasosa a partir de duas fases envolvidas no processo, a fase móvel, composta por um gás nobre e a fase estacionária, composta por solventes apolares. A separação do composto volátil é obtida pelas interações intermoleculares do analito com a fase estacionária por meio de ligação de hidrogênio. Após a separação do composto, este é enviado ao detector para



identificação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SPARKMAN; PENTON; KITSON, 2011).

Existem vários tipos de detectores utilizados no universo analítico. Dentre estes estão o de condutividade térmica (TCD), ionização em chama (FID), nitrogênio-fósforo (NPD), chama fotométrica (FPD), captura de elétrons (ECD) e espectrômetro de massas (MS). Sendo o MS o mais eficiente e preciso para detectar compostos voláteis de amostras complexas. Para segurança na detecção, o cromatógrafo a gás, acoplado a este tipo de detector, requer um banco de dados que contenham valores de tempos de retenção e padrões de fragmentação de íons (SPARKMAN; PENTON; KITSON, 2011; VUNDA, 2011). Uma vez que a detecção ocorre pelo envio do composto a uma fonte de íons para ser bombardeado por elétrons de alta energia, gerando íons positivos, os quais resultam no espectro de massas típico do composto (FRANCO; JANZANTTI, 2004). É neste momento que a biblioteca é exigida, pois para certificar que o espectro gerado pertence ao composto, é necessário que este seja comparado ao padrão de espectros de íons do banco de dados espectrais armazenados na memória do computador (FRANCO; JANZANTTI, 2004; MOLYNEUX; SCHIEBERLE, 2007; SPARKMAN; PENTON; KITSON, 2011).

#### **2.4.6 Headspace como método de obtenção da amostra para análise cromatográfica**

A obtenção dos constituintes para estudos da variabilidade química das espécies aromáticas a partir da separação cromatográfica é por hidrodestilação e arraste de vapor de água dos voláteis ou por extração por solventes. As duas primeiras técnicas são utilizadas para a extração de óleos essenciais (COUNCIL OF EUROPE EUROPEAN PHARMACOPOEIA , 2010). Estas duas técnicas são comumente utilizadas e aceitas para obtenção de óleo

essencial como matéria-prima. Porém esses métodos demandam muito tempo, pois exigem preparo da amostra com aplicação de um tratamento antes de serem analisadas, sendo assim, em caso de analisar muitas amostras, a análise torna-se morosa, além de exigir uma grande quantidade de material vegetal. Outro fator importante é a perda dos voláteis durante a destilação e a coleta do óleo. Por mais que o sistema de arrefecimento seja fechado, é inevitável a perda da fração mais volátil (SPARKMAN; PENTON; KITSON, 2011). Portanto, devido à morosidade e possibilidade de contaminação da amostra, a técnica de *headspace* ganha espaço para a otimização do método analítico (CARON et al., 2013; MESHKATASADAT; PAPZA; ABDOLLAHI, 2010).

De acordo a Farmacopeia brasileira, a técnica de *headspace* é uma análise cromatográfica com extração de amostra a partir de um espaço confinado (COMISSÃO PERMANENTE DE REVISÃO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). O termo *headspace* foi derivado da indústria de cerveja, na qual a análise dos voláteis confinados no gargalo da cerveja (head) foi desenvolvida (THOLL, 2006). Artigos científicos utilizando esta técnica foram revisados por Bicchi et al. (2008). Esses autores reportam a dedicação à técnica a partir de 1996. Sendo uma técnica relativamente nova em se tratando de inovação tecnológica. A popularidade desta técnica tem maior abrangência para análise de alcoóis em sangue e resíduos de solventes. Outra aplicação comum inclui análise de monômeros industriais em polímeros e plásticos, compostos aromáticos em produtos alimentícios, fragrâncias de cosméticos e perfumes e ensaios farmacológicos (SPARKMAN; PENTON; KITSON, 2011). Em espécies vegetais, esta técnica é muito útil para captura de substâncias voláteis do ar circulante do vegetal, por fornecer uma impressão mais realística do perfil odorífico (DURANT et al., 2013).

O método de extração por *headspace* é composto de um cromatógrafo a gás que se adapta a um dispositivo para a introdução da amostra. Tal dispositivo

é um frasco provido de um obturador e um sistema de válvulas que permite a entrada de um gás de arraste (COMISSÃO PERMANENTE DE REVISÃO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Existem três formas de obtenção da amostra neste sistema fechado para isolar os analitos em fase gasosa ou em fase de vapor em equilíbrio com uma matriz complexa, sem o uso de um solvente. A primeira forma é o *headspace* estático seguido do dinâmico e por microextração em fase sólida, sendo os dois primeiros os métodos mais tradicionais (SPARKMAN; PENTON; KITSON, 2011).

No modo estático, uma quantidade fixa do ar que circula ao redor da amostra (planta) é capturado e diretamente enviado à análise cromatográfica. Esta análise é realizada em um espaço confinado onde a fração mais volátil ocupa o espaço vazio de forma a aumentar a pressão até atingir o estado de equilíbrio entre as fases sólidas e gasosas, facilitando a coleta da amostra. Dentro dos parâmetros estabelecidos para controle automático de pressão e temperatura para a análise, um volume pequeno entre 0,1 a 2 mL desta fase é coletado com uma seringa termostaticada a determinada temperatura para a amostra a ser examinada e injetada diretamente na coluna cromatográfica, como se fosse uma injeção de amostra líquida, arrastando os componentes voláteis (COMISSÃO PERMANENTE DE REVISÃO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; SPARKMAN; PENTON; KITSON, 2011).

No modo dinâmico, a amostra é capturada por um fluxo de ar constante que passa pelo ar circundante da amostra, levando os analitos até um tubo recheado com uma substância adsorvente, que em seguida é eluído e o eluato enviado à análise cromatográfica (SPARKMAN; PENTON; KITSON, 2011; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2008).

A escolha da técnica depende do objetivo da análise bem como da disponibilidade de material a ser analisado. A técnica de extração via *headspace* estático injeta baixos níveis de concentrações dos analitos na coluna. Se o

analito de interesse se encontrar em pequena concentração no *headspace* devido ao equilíbrio entre a fase da matriz e a fase gasosa, pode reduzir ainda mais a concentração deste composto (SILVA, 2013). Porém, devido à alta sensibilidade e precisão da técnica, ainda com a perda de amostra, o resultado é satisfatório. Além da sensibilidade e precisão, esta técnica também possibilita a amostragem de substâncias de baixo peso molecular sem a presença do pico do solvente (SPARKMAN; PENTON; KITSON, 2011).

Nesta técnica, também se dispensa o preparo da amostra e uso de solventes orgânicos, garantindo a análise da fração mais volátil, com baixo custo e maior segurança operacional (CARON et al., 2013; DURANT et al., 2013). Uma vez que o material é prontamente transferido para o sistema cromatográfico, evita a danificação do sistema por acúmulo de compostos não voláteis, aumentando a vida útil do equipamento (CARON, 2013; MOREAU; SIQUEIRA, 2008; SILVA, 2013). Outro ganho com esta técnica na aplicação de espécies vegetais é a facilidade da coleta de amostras nativas em ambiente natural, pois esta é a forma de obtenção de amostra com o menor impacto extrativista, contribuindo com a preservação dos recursos genéticos vegetais principalmente das plantas endêmicas em seu ecossistema natural (DURANT et al., 2013; PISTELLI et al., 2013).

## **2.5 Diversidade genética**

O Cerrado ficou conhecido pelo uso inadequado e insustentável da flora nativa e, se tratando de áreas endêmicas a situação é ainda mais crítica (MACHADO et al., 2004). Por esse motivo, assim como a análise química, a genética de populações tornou-se ferramenta importante para possibilitar a descrição da variabilidade genética em populações nativas. A fragmentação dos ambientes representa problema para a conservação da diversidade genética, pois estes fragmentos podem contribuir para a redução da variabilidade genética

(HAMRICK; GODT; SHERMAN-BRYLES, 1992). Em espécie de população pequena, este fator é o mais preocupante, porque pode resultar em isolamento por distância. O que torna a população mais suscetível à deriva genética, caminhando para um provável aumento da endogamia, seja por autofecundação ou por cruzamento entre indivíduos aparentados (KAGEYAMA; GANDARA, 1998; NEI, 1987).

Estudos de diversidade genética são obtidos a partir do conhecimento das características do vegetal a nível botânico, químico e molecular. Sendo o perfil químico considerado a identidade do vegetal que contribui para desfazer possíveis confusões botânicas. O perfil molecular contribui para o conhecimento genético no que se refere ao equilíbrio populacional, permitindo identificar a partir do nível da estrutura genética se a espécie corre risco de extinção (NEI, 1987; HARTL; CLARK, 2010).

A estrutura genética refere-se à distribuição heterogênea dos alelos ou genótipos no tempo e no espaço dos indivíduos dentro e entre a população. Vários são os fatores que influenciam a variação genética de uma população nativa, dentre eles estão os padrões de dispersão de pólen e sementes, densidade de indivíduos adultos, seleção ambiental, regeneração e sistema de reprodução (GE et al., 2005; HAMRICK; LOVELESS, 1986). Todos esses fatores refletem a ação conjunta da mutação, migração e deriva genética, que por sua vez operam dentro do contexto biológico e histórico de cada população. Porém, para entender a ecologia evolutiva de uma determinada espécie, é preciso conhecer o nível de distribuição dos alelos em sua população natural (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Estudar os níveis de variação genética e composição química das espécies nativas é importante para embasar estudos de manejo e conservação, bem como criar programas de melhoramento genético de espécies com interesse econômico (MORSHEDELOO; MOGHADAM; YAZDAMI, 2015).

Estudos dessa natureza têm-se concentrado em germoplasma de plantas domesticadas ou naquelas cujos quimiotipos já foram identificados e possuem espaço consolidado no mercado. Das verbenaceas nativas do Brasil, apenas a *Lippia alba* [(Mill.) N. E. Brown] possui uma coleção de germoplasma com grande variabilidade genética que é utilizado em programa de melhoramento genético (MANICA-CATTANI et al., 2009; ROCHA et al., 2015; SANTOS et al., 2012). Porém, esforços têm sido concentrados para o conhecimento das diferentes espécies nativas de *Lippia* que possuam valor econômico. A população de *Lippia origanoides* Kunth, por exemplo, apresenta ampla distribuição e alta diversidade genética, com médias de heterozigosidade entre 0,32 a 0,37 (VEGA-VELA; DELGADO-ÁVILA; SÁNCHEZ, 2013). A diversidade desta espécie pode estar associada à diferença no gradiente de altitude da qual a espécie ocorre (VEGA-VELA; SÁNCHEZ, 2012). Para a espécie *Lippia graveolens* H. B. K., a diversidade varia de acordo com o quimiotipo. A população produtora do quimiotipo timol apresenta maior diversidade genética, entre 0,25 a 0,31. As populações cujos quimiotipos possuem exclusividade sesquiterpênica apresentam baixa diversidade, com 0,058, respectivamente (MARTÍNEZ-NATARÉN et al., 2014). Apesar de a espécie *Lippia rotundifolia* Cham. ser uma planta aromática promissora financeiramente, pouco se sabe sobre seus aspectos químicos e genéticos (MARTÍNEZ-NATAREN et al., 2014).

Embora os estudos tenham contribuído com informações da estrutura genética de algumas espécies, para o gênero *Lippia*, é preciso mais pesquisas para melhor entendimento de suas distribuições genéticas em escala temporal e espacial. Somente a partir desses estudos será possível nortear meios que diversifiquem o banco natural de sementes das espécies de população pequena. Assim, aumentando o tamanho efetivo da população, além de garantir a preservação dos recursos genéticos *in situ* da vegetação nativa do Cerrado que

esteja com a estrutura genética comprometida (GUSSON; SEBBENN; KAGEYAMA, 2005; HAMRICK; GODT, 1996; WEIR, 1990).

## **2.6 Análise molecular aplicada em estudo da diversidade dos recursos genéticos vegetais**

Entende-se como marcador molecular qualquer característica fenotípica oriunda da expressão de um gene ou segmento de DNA. Existem várias formas de estudar a diversidade genética dentro de populações naturais. Dentre elas destacam-se as características morfológicas, bioquímicas e moleculares (BORÉM; CAIXETA, 2009; FERREIRA; GRATAPÁGLIA, 1995).

Os descritores morfológicos foram os primeiros a contribuir com o avanço do melhoramento genético. Porém esses sofrem influência do ambiente, não sendo aplicáveis aos estudos de genética em populações (BORÉM; CAIXETA, 2009; FERREIRA; GRATAPÁGLIA, 1995). Os descritores bioquímicos mais conhecidos como enzimáticos são baseados nas mutações do código genético, as quais alteram a carga elétrica de algumas proteínas com função enzimática cujo polimorfismo é detectado por métodos histoquímicos a partir de um padrão enzimático (BORÉM; CAIXETA, 2009). Devido à sua natureza codominante, detectam-se diferenças entre indivíduos morfológicamente idênticos. Por isso ainda são muito utilizados em análise de diversidade genética, mesmo estando sujeitos à seleção adaptativa (ZUCCHI, 2002).

A detecção em nível de DNA surgiu na década de 70 (GRODZICKER et al., 1974). O primeiro marcador molecular na detecção de polimorfismo foi por meio do comprimento de fragmentos de DNA gerados por uma enzima de restrição denominada de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Marcador molecular baseado em amplificação do DNA surgiu na década de 80. Dentre esses marcadores, os AFLPs, RAPDs e os microsatélites, são exemplos

das muitas técnicas baseadas em PCR, utilizadas para estudos de diversidade genética (MULLIS; FALONA, 1987).

O marcador ISSR (Inter Simple Sequence Reaction) (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994) foi desenvolvido a partir da tecnologia do AFLP e do microssatélite SSR com poucas sequências repetidas em tandem (COSTA et al. 2015; ROCHA et al., 2015). Este marcador envolve a amplificação de região de DNA localizado entre dois locos microssatélites usando *primers* com um único motivo de ligação na posição inicial 3' ou final 5' por um nucleotídeo limitado (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). Este marcador é apresentado tanto em genoma nuclear quanto em organelas, e fornece um sistema de genotipagem com característica de estabilidade, confiabilidade, rapidez e dominância, alcançando alta variabilidade genética e reprodutibilidade dos dados (MORAGA-SUAZO et al., 2012). Sendo essas características muito eficientes na identificação de polimorfismos em estudos de diversidade genética em espécies nativas (GOTTLIEB; BORIN, 1996; GOTTLIEB; BORIN, 2000; KUMAR; JENA; NAIR, 2010; KUMAR et al., 2014).

## **2.7 Estatística molecular aplicada em estudos de diversidade genética**

Vários são os parâmetros utilizados para avaliar a estrutura genética de uma população natural. Dentre os parâmetros de estrutura genética estão a heterozigosidade, a frequência alélica, o índice de diferenciação e o número de alelos migrantes. Os dois primeiros valores podem ser calculados a partir da matriz de distância genética de Nei e, a capacidade de adaptação quanto às alterações ambientais, pode ser calculada tanto por meio da distância genética total de Nei ( $G_{ST}$ ) com base nas medidas de heterozigosidade dentro e entre subpopulações (NEI, 1973), quanto pela estatística F de Wright a partir da análise de variância molecular ou AMOVA ( $F_{ST}$ ) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992; PINTO, 2001).



A partir destes parâmetros, propõe-se captar o efeito que a deriva genética e a estrutura populacional exerce na distribuição não aleatória dos genótipos nas populações a partir de componentes de variância das frequências alélicas nos diversos níveis de hierarquia populacional. Destes dois parâmetros de estrutura genética, a AMOVA é utilizada com mais frequência. É comumente aplicada para matriz das distâncias quadradas dos pares de haplotipos oriundos de marcadores moleculares de natureza dominante (NYBOM, 2004; NYBOM; BARTISH, 2000).

A significância dos componentes de variância é testada através do uso de permutações (Bootstrap). Esta é uma técnica computacional de reamostragem na qual é usada apenas uma fração dos dados originais, tomando-se como amostras repetidas sem reposição. Tem como objetivo melhorar a estimativa de qualquer parâmetro. O intervalo de confiança pode ser construído em associação com a melhor estimativa. Apresenta grande flexibilidade de uso, pois não se baseia em qualquer suposição quanto à distribuição dos dados. Esta técnica é recomendada para estimar medidas e índices de diversidade genética de espécies nativas, cuja distribuição amostral é desconhecida (MARTINEZ-ESPINOSA; SANDANIELO; LOUZADA-NETO, 2006).

Toda a estatística multivariada aplicada na análise da estrutura genética é apresentada por meio de correlação de similaridade genética, métodos de agrupamento e análise da coordenada principal. O conjunto destas análises também pode ser correlacionado com informações das distâncias geográficas das subpopulações. Para aumentar a robustez e confiança dos resultados, os coeficientes obtidos também podem ser comparados com outros métodos de estatística multivariada aplicados à análise de diversidade genética (BONIN; EHRICH; MANEL, 2007; HARTL; CLARK, 2010).

### 3 CONCLUSÃO

Estudos da composição química e estrutura genética das espécies nativas com potencial produção de bioativos são importantes na identificação de ambientes naturais promissores para a produção de compostos químicos e genótipos superiores para serem conservados *in situ*. A *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) é uma das muitas espécies que ocorre em áreas restritas e produz bioativos que podem ser transformados em produtos de interesse comercial e merece ser conservada.



## REFERÊNCIAS

- CHI, C. et al. Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1184, n. 1/2, p. 220–233, Mar. 2008.
- BONIN, A.; EHRICH, D.; MANEL, S. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 18, p. 3737-3758, Sept. 2007.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora da UFV, 2009. 532 p.
- BRANDÃO, M. G. L. et al. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779–1853). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 143, n. 2, p. 488-500, Sept. 2012.
- BRANDÃO, M. G. L. Plantas úteis nativas do Brasil na obra dos naturalistas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. abr./jun. 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-05362010000200020&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362010000200020&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 15 mar. 2015.
- BREMER, B. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 141, n. 3, p. 399-436, 2003.
- CAMELO, A. L. M. et al. Análise comparativa da composição química volátil de amostras do alecrim in natura com a disponível comercialmente. **Holos**, Rio Claro, v. 30, n. 5, p. 191-198, 2014.
- CARON, L. et al. Volatile compounds in the foliage of balsam fir analyzed by static headspace gas chromatography (HS\_GC): an example of the spruce budworm defoliation effect in the boreal forest of Quebec, Canada. **Microchemical Journal**, New York, v. 110, p. 587-590, Sept. 2013.
- CARVALHO, F. et al. The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 9-19, 2012.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 453 p.

COMISSÃO PERMANENTE DE REVISÃO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Farmacopeia brasileira**. 4. ed. São Paulo: Ateneu, 2010. 1213 p.

COMPADRE, C. M. et al. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: historical uses, field inquires, and constituents. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 15, n. 1, p. 89-106, Jan. 1986.

COSTA, D. F. et al. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

COUNCIL OF EUROPE EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **European directorate for the quality of medicines**. 7th ed. Strasbourg: CRC Press, 2010. 241 p.

DOMINGUES, M. S.; BERMANN, C. O arco do desflorestamento na Amazônia: da pecuária à soja. **Ambiente & Sociedade**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 1-22, maio/ago. 2012.

DURANT, A. A. et al. Analysis of volatile compounds from *Solanum betaceum* Cav. fruits from Panama by head-space micro extraction. **Records of Natural Products**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 15-26, 2013.

DURIGAN, G. et al. **Manual para recuperação da vegetação de cerrado**. 3. ed. São Paulo: SMA, 2011. 19 p.

ECHTERNACHT, L. et al. Phylogenetic analysis of the Brazilian microendemic *Paepalanthus* subgenus *Xeractis* (Eriocaulaceae) inferred from morphology. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 167, p. 137-152, 2011.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, London, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FERNANDES, G. W. et al. Hail impact on leaves and endophytes of the endemic threatened *Coccoloba cereifera* (Polygonaceae). **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 212, n. 10, p. 1687-1697, Oct. 2011.

FERREIRA, M. C.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP na análise genética**. Brasília: Embrapa, 1995. 220 p.

FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G. Plantas aromáticas e medicinais: óleos essenciais e voláteis. **Revista APH**, Portugal, v. 20, n. 114, p. 1-33, 2014.

FRANCO, M. R. B.; JANZANTTI, N. S. Avanços na metodologia instrumental da pesquisa do sabor. In: FRANCO, M. R. B. (Ed.). **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Editora Varela, 2004. Cap. 1, p. 17-27.

GE, X. E. et al. Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert regions of Northwest China as revealed by ISSR analysis. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 843–851, Apr. 2005.

GIULIETTI, A. M. et al. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. **Boletim de Botânica**, São Paulo, v. 9, p. 1-20, 1987.

GOODLAND, R.; FERRI, M. G. **Ecologia do Cerrado**. Itatiaia: EDUSP, 1979. 193 p.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. de M. B. Morphological and metabolic differentiation of rubiaceae by ecogeographical transitions in south America. **Opera Botanica**, Lund, v. 7, p. 213-230, 1996.

\_\_\_\_\_. Medicinal products: regulation of biosynthesis in space and time. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 1, p. 115-120, jan./fev. 2000.

GRODZICKER, T. et al. Physical mapping of temperature sensitive mutations. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, New York, v. 39, p. 439-446, Sept. 1974.

GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS JÚNIOR, L. J. Monoterpenes with analgesic activity: a systematic review. **Phytotherapy Research**, London, v. 27, n. 1, p. 1–15, Jan. 2013.

GUSSON, E.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 67, p. 123-135, abr. 2005.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: biological sciences**, Amsterdam, v. 351, n. 1345, p. 1291–1298, Sept. 1996.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SHERMAN-BRYLES, S. L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests**, Dordrecht, v. 6, n. 1, p. 95-124, Mar. 1992.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: ESTRADA, A.; FLEMING, T. H. (Ed.). **Frugivores and seed dispersal**. New York: Junk Publishers, 1986. p. 17-59.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 217 p.

INSTITUO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Os indígenas no Censo Demográfico 2010: primeiras considerações com base no quesito cor ou raça**. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. 31 p.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F. do; CAMPOS, I. C. de. Soaring extinction threats to endemic plants in Brazilian metal-rich regions. **Ambio**, Stockholm, v. 40, n. 5, p. 540-543, July 2011.

JARADAT, A. Ecogeography, genetic diversity, and breeding value of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides* Korn ex Asch. & Graebn.) thell. **Australian Journal of Crop Science**, Essex, v. 5, n. 9, p. 1072-1086, 2011.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics: a phyllogenetic approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. 419 p.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 12, n. 32, p. 65-70, dez. 1998.

KOLICHESKI, M. B. **Síntese do mirceno a partir da isomerização térmica do  $\beta$ -pineno**. 2006. 121 p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

KUMAR, A. et al. Nuclear DNA assay of the wild endangered medicinal and aromatic Indian Himalayan *Valeriana jatamansi* germplasm with multiple DNA markers: implications for genetic enhancement, domestication and ex situ conservation. **Plant Systematic and Evolution**, New York, v. 300, n. 9, p. 2061-2071, Nov. 2014.

KUMAR, S.; JENA, N.; NAIR, N. K. ISSR polymorphism in Indian wild Orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-east India. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, n. 3, p. 350-359, Jan. 2010.

LEBEDA, A.; DOLEZALOVÁ, I.; NOVOTNÁ, A. Wild and weedy *Lactuca* species, their distribution, ecogeography and ecobiology in USA and Canada. **Genetic Resource and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 59, n. 8, p. 1805-1822, Dec. 2012.

LEITÃO, S. G. Analysis of the chemical composition of the essential oils extracted from *Lippia lacunose* Mart. e Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, São Paulo, v. 19, n. 7, p. 1388-1393, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 544 p.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p. 65-95, Nov. 1984.

MACHADO, R. B. et al. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Brasília: Conservation Internacional, 2004. 23 p.

MANICA-CATTANI, M. F. et al. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 2, p. 375-380, maio 2009.

MARTENS, L. A. **Flores da Serra da Calçada**. Belo Horizonte: Editora da UFMG, 2008. 478 p.

MARTINEZ-ESPINOSA, M.; SANDANIELO, V. L. M.; LOUZADA-NETO, F. O método de *bootstrap* para o estudo de dados de fadiga dos materiais. **Revista de Matemática e Estatística**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 37-50, 2006.



MARTÍNEZ-NATARÉN, D. A. et al. Genetic diversity and genetic structure in wild populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) and its relationship with the chemical composition of the essential oil. **Plant Systematic and Evolution**, New York, v. 300, n. 3, p. 535-547, Mar. 2014.

MARTINS, E. R. et al. Estudo ecogeográfico da poaia [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 24-32, 2009.

MELO, M. P. **Conservação de *Lippia sidoides* Cham. do norte de Minas Gerais e Vale do Jequitinhonha**: localização, coleta, ecogeografia, crescimento, modo de reprodução e divergência genética. 2012. 100 p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2012.

MENDES, A. D. R. et al. Ecogeografia de populações de erva-baleeira (*Varronia curassavica*) no Norte e Vale do Jequitinhonha em Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 3, p. 418-424, mar. 2015.

MESHKATALSADAT, M. H.; PAPZAN, A. H.; ABDOLLAHI, A. Determination of bioactive volatile organic components of *Lippia citriodora* using ultrasonic assisted with headspace solid phase microextraction coupled with GC-MS. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, Washington, v. 6, n. 1, p. 319-323, Jan. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS. **Portal da Saúde**, Brasília, 2016. Disponível em: <[http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com\\_content&](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&)>. Acesso em: 15 jul. 2016.

MOLYNEUX, R. J.; SCHIEBERLE, P. Compound identification: a journal of agricultural and food chemistry perspective. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 12, p. 4625-4629, May 2007.

MORAGA-SUAZO, P. et al. Establishment and optimization of ISSR and SAMPL molecular markers as a tool for breeding programs of *Pinus radiata*. **Bosque**, Valdivia, v. 33, n. 1, p. 93-98, 2012.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 318 p.

MORSHELOOL, M. R.; MOGHADAM, M. R. F.; YAZDAMI, A. E. D. Genetic relationships of Iranian *Hypericum perforatum* L. wild populations as evaluated by ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 301, n. 2, p. 657-665, Feb. 2015.

MULLIS, L.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerease catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, New York, v. 55, p. 335-350, 1987.

MYERS, N. et al. Biodiversity *Hotspot* for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 6772, p. 853-858, Feb. 2000.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, Dec. 1973.

\_\_\_\_\_. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

NOAMESI, B. K. Power tea (*Lippia multiflora*) a potent hypertensive therapy. **West African Journal of Pharmacology and Drug Research**, Ikeja, v. 4, n. 1, p.33-36, June 1977.

NYBOM, H.; BARTISH, I. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 3, n. 2, p. 93-114, 2000.

NYBON, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 1143-1155, May 2004.

OLIVEIRA, A. R. M. F. **Morfoanatomia, composição química e atividade biológica do óleo essencial de espécies nativas de *Lippia***. 2014. 114 p. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.

PARRA-QUIJANO M. et al. Review. Applications of ecogeography and geographic information systems in conservation and utilization of plant genetic resources. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 10, n. 2, p. 419-429, 2012.

PAVARINI, D. P.; LOPES, N. P. Ecologia química e a biossíntese dos terpenos voláteis das Arnicas-da-Serra (*Lychnophora* spp.). **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 8, n. 1, p. 242-262, jan./fev. 2016.

PIMENTA, M. R. et al. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 211-220, 2007.

PINTO, L. R. **Análise da estrutura genética das populações de milho (*Zea mays* L.) BR-105 e BR-106 e respectivos sintéticos IG-3 e IG-4 por meio de microssatélites**. 2001. 142 p. (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

PINTO-ZEVALLOS, D. M. et al. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 1395-1405, 2013.

PISTELLI, L. et al. Composition of volatile in micropropagated and Field grown aromatic plants from Tuscany Islands. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 60, n. 1, p. 43-50, 2013.

RAPINI, A. et al. **Cadeia do Espinhaço: avaliação do conhecimento científico e prioridade de conservação: volume 4**. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2008. 312 p.

ROCHA, D. S. et al. Development of a novel set of microsatellite markers for *Lippia alba* (Verbenaceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 971-974, fev. 2015.

SALIMENA, F. R. G.; MÚLGURA, M. E. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 1, p. 191-197, 2015.

SALIMENA, F. R.; SILVA, T. R. S. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais, Verbenaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 119-120, 2009.

SALIMENA-PIRES, F. R. *Lippia* L. sect. rhodolippia Shauer, (Verbenaceae) do Brasil. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE BOTÂNICA, 7., 1998, México. **Resumo...** México: Sociedade Latina de Botânica, 1998. p. 299.

- SAMPAIO, F. **Hipóteses filogenéticas de espécies sul americanas do gênero *Lippia* Spp. (Verbenaceae) com base em sequências nucleotídicas.** 2009. 78 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biotecnologia) - Universidade Federal de Juíz de Fora, Juíz de Fora, 2009.
- SANDERS, R. W. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. **Harvard Paper in Botany**, Harvard, v. 5, n. 3, p. 303-358, Apr. 2001.
- SANO, E. E. et al. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 153-156, jan. 2008.
- SANTOS, F. R. et al. Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci in *Lippia alba* (Verbenaceae). **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 99, n. 8, p. 301-303, Aug. 2012.
- SILVA, R. F. **Aromas do Cerrado:** estudo da composição química volátil de plantas aromáticas do cerrado. 2013. 113 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 1104 p.
- SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown ex Britt. & Wils. (falsa-melissa) Verbenaceae.** 2001. 189 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.
- SOUSA, D. S. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia organoides* e *Lippia rotundifolia* frente a enterobactérias isoladas de aves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 3, p. 940-944, maio/jun. 2015.
- \_\_\_\_\_. Relationship between pollen morphology and chromosome numbers in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 147-157, mar. 2013.
- SOUSA, S. M.; TORRES, G.; VICCINI, L. F. Karyological studies in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 4, p. 1029-1037, dez. 2012.

SOUZA, G. A. et al. Levantamento ecogeográfico de *Dimorphandra mollis* Benth. (leguminosae-Caesalpinioideae) no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 4, p. 51-62, 2008.

SPARKMAN, O. D.; PENTON, Z. E.; KITSON, F. G. **Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide**. 2. ed. Amsterdam: Academic Press, 2011. 632 p.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Sampling flower scent for chromatographic analysis. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 31, n. 11, p. 2022-2031, June 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2009. 848 p.

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX - IPNI. About IPNI. **IPNI**, Oxford, Abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ipni.org>>. Acesso em: 19 ago. 2016.

THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, n. 3, p. 297-304, June 2006.

TRONCOSO, N. S. Los generos de Verbenaceae de sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolívia, Paraguai, Uruguai y sur de Brasil). **Darwiniana**, Buenos Aires, v. 18, n. 3/4, p. 295-412, 1974.

VEGA-VELA, N. E.; DELGADO-ÁVILA, W. A.; CHACÓN-SÁNCHEZ. Genetic structure and essential oil diversity of the aromatic shrub *Lippia origanoides* Hunth (Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. **Agronomia Colombiana**, Bogotá, v. 31, n. 1, p. 7-17, Jan./Apr. 2013.

VEGA-VELA, N. E.; SÁNCHEZ, M. I. C. Genetic structure along an altitudinal gradient in *Lippia origanoides*, a promising aromatic plant species restricted to semiarid areas in northern South America. **Ecology and Evolution**, Oxford, v. 2, n. 11, p. 2669-2681, Nov. 2012.

VICCINI, L. F. et al. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Amsterdam, v. 256, n. 1, p. 1-4, Nov. 2005.

\_\_\_\_\_. Chromosome numbers in the genus *Lippia*. **Plant Systematics and Evolution**, Amsterdam, v. 256, p. 171-178, 2006.

VUNDA, S. L. L. **Estudo químico e biológico de espécies de cronon (Euphorbiaceae) nativas do Rio Grande do Sul.** 2011. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis:** method for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. 337 p.

WINSKA, K. et al. Isomers and odor or nose as stereochemist. **Chemik**, Poland, v. 68, v. 2, p. 83-90, 2014.

ZARGARI, A. **Medicinal plants:** volume 4. Tehran: Tehran University Press, 1990. 925 p.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, n. 2, p. 176-83, Mar. 1994.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC. utilizando marcadores RAPD e SSR.** 2002. 130 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.



**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**

**ARTIGO 1 ECOGEOGRAFIA DE *Lippia rotundifolia* CHAM.  
(VERBENACEAE) EM MINAS GERAIS, BRASIL**

**ECOGEOGRAPHY OF *Lippia rotundifolia* CHAM. IN MINAS GERAIS,  
BRAZIL**

Messulan Rodrigues Meira

Ernane Ronie Martins

Luciane Vilela Resende

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NBR 6022 (ABNT, 2003).**



## RESUMO

*Lippia rotundifolia* é uma espécie nativa do Cerrado e endêmica da Cadeia do Espinhaço. Devido às poucas informações acerca da espécie, objetivou-se caracterizar as condições ecogeográficas e edafoclimáticas bem como os atributos físico-químicos do solo da *Lippia rotundifolia* no estado de Minas Gerais, Brasil. Realizou-se o levantamento ecogeográfico em 13 locais (Parque Estadual Veredas do Peruaçu, Gigante, Rio do Peixe, APA de Olhos d'Água, Joaquim Felício, Parque Estadual do Rio Preto, São Gonçalo do Rio das Pedras, Rio Tigre, RPPN Brumas do Espinhaço, Lapinha, Poço Bonito, Abóboras e Parque Estadual de Serra Nova). Os resultados identificaram os ambientes pertencentes aos biomas Cerrado e Caatinga especificamente nos campos rupestres e de altitude. A espécie ocorre entre as altitudes de 691 a 1.311 metros, precipitação entre 700 a 1.600 milímetros e temperatura média variando entre 14,5 a 24 graus. Nestas fitofisionomias os solos apresentam textura arenosa, são hiperdistróficos, altamente tóxicos com baixa capacidade de troca de cátions. A espécie é generalista quanto às características estudadas e ocorre em solos arenosos e hiperdistróficos.

**Palavras-chave** Recursos genéticos. Caracterização. Ecogeografia. *Lippia rotundifolia*.

## ABSTRACT

*Lippia rotundifolia* is a species native to the Cerrado, endemic to the Cadeia do Espinhaço. Due to limited information about the specie, we aim to characterize the ecogeography and climate conditions and the physical and chemical of soil of *Lippia rotundifolia* in the state of Minas Gerais, Brazil. Was conducted the ecogeographical characterization of 13 sites (Parque Estadual Veredas do Peruaçu, Gigante, Rio do Peixe, AEP of Olhos D'água, Joaquim Felício, Parque Estadual do Rio Preto, São Gonçalo do Rio das Pedras, Rio Tigre, RPPN Brumas do Espinhaço, Lapinha, Poço Bonito, Abóboras and Parque Estadual de Serra Nova). The results identified environments belonging to *campos rupestres* and campos de altitude of the *Cerrado* and *Caatinga* biomes. The species occurs between the altitudes 691-1311 m, precipitation between 700 to 1600 mm and average temperature between 14,5 to 24°C. These vegetation types the soils showed a sandy characteristic, are hyper dystrophic, highly toxic with low cations exchange capacity. The specie is characterized as general as to studied characteristics and occurs in sandy soils and hyper dystrophic.

**Keywords** Genetic Resources. Characterization. Ecogeography. *Lippia rotundifolia*.



## 1 INTRODUÇÃO

Os campos rupestres fazem parte das fitofisionomias do Cerrado brasileiro. Estes ambientes são caracterizados por altitudes superiores a 800 m, xeromorfismo e presença de afloramentos rochosos (RAPINI, et al., 2008; DURIGAN et al., 2011). Em Minas Gerais, essas formações campestres estão localizadas na Cadeia do spinhaço (ZAPPI, 2015), em cuja composição florística, há predomínio por espécies da família Verbenaceae. O gênero *Lippia* Linn. é o segundo maior desta família, em que se concentra a maioria das espécies endêmicas nessas altitudes (CARVALHO et al., 2012; FERNANDES et al., 2011; GASTAUER; MESSIAS; MEIRA NETO, 2012; JACOBI; CARMO; CAMPOS, 2011; SOUSA; TORRES; VICCINI, 2012). Dentre as espécies endêmicas dos campos rupestres está a *Lippia rotundifolia* Cham. (PIMENTA et al., 2007; SAMPAIO et al., 2009; SOUSA et al., 2013). Conhecida como chá-de-pedestre, é um arbusto, com hastes eretas, folhas alternas, coriáceas e inflorescências de coloração rosa-lilás, cuja fitofisionomia é frágil e de baixa resiliência (SALIMENA; SILVA, 2009).

A espécie é altamente aromática e produtora de óleo essencial. Os principais componentes do óleo são  $\beta$ -mirceno, farnesol, limoneno e o mircenal (LEITÃO, 2008). Pesquisas de ensaio farmacológico apontaram que a espécie apresenta atividade bacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* e antitumoral. Estudos como esses caracterizam subsídio para desenvolver programas de melhoramento genético. Uma vez que espécies nativas produtoras de óleo produzem compostos químicos de alta atividade biológica, o que confere a elas grande potencial econômico (GOMIDE et al., 2013).

Para desenvolver qualquer ação conservacionista da flora medicinal nativa, é necessário realizar estudos de caracterização dos diferentes locais de ocorrência, de forma a compreender a dinâmica populacional de cada espécie quanto aos fatores ecogeográficos (PARRA-QUIJANO et al., 2012). A partir de

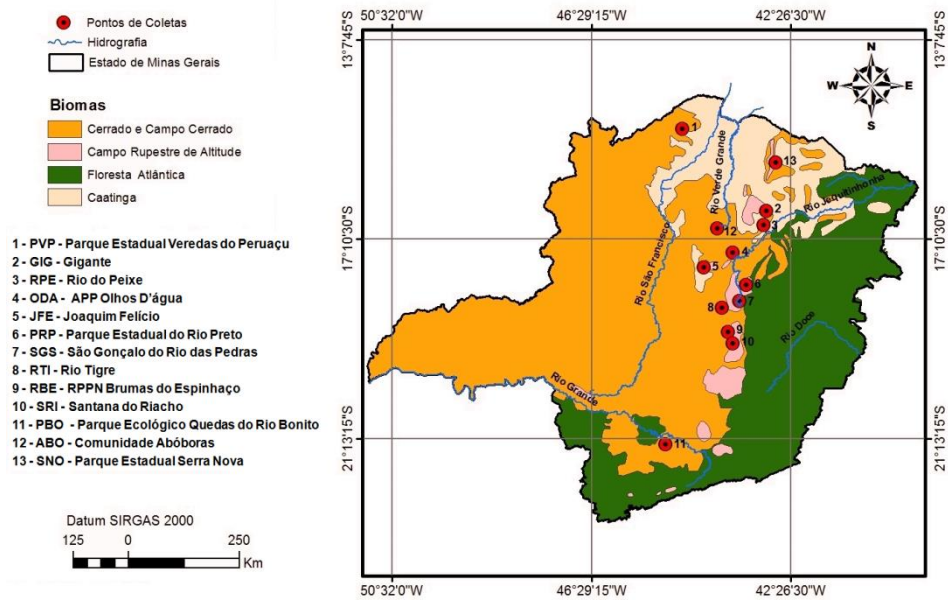
estudos ecogeográficos, foi possível observar que espécies como a erva baleeira (*Varronia curassavica* Jacq. Boraginaceae) são generalistas quanto aos fatores ecogeográficos e edafoclimáticos (MENDES et al., 2015), por exemplo, a fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth-Fabaceae) é tolerante a solos com alto índice de acidez e alta saturação de alumínio (SOUZA et al., 2008) e a *Lippia sidoides* Cham. ocorre naturalmente em solos pobres e ácidos (MELO, 2012). A caracterização do solo nas áreas de ocorrência dessas espécies do Cerrado permitiu analisar os níveis de erosão genética de cada uma, sendo esta informação, o primeiro passo para desenvolver estratégias de conservação dos recursos genéticos vegetais.

Dessa forma, objetivou-se caracterizar as condições ecogeográficas e edafoclimáticas quanto ao grau de antropismo, queimada, aspectos climáticos (altitude, precipitação, temperatura) e atributos físico-químicos do solo da *Lippia rotundifolia* em Minas Gerais, Brasil.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no período de agosto de 2014 a maio de 2015, nas mesorregiões Norte, Central, Vale Jequitinhonha, Metropolitana e Campo das Vertentes do estado de Minas Gerais. Foram selecionados 13 locais de ocorrência natural da *Lippia rotundifolia*. Os ambientes foram localizados por meio de caminhadas na cadeia do espinhaço. A orientação geográfica para acesso correto aos locais foi pela referência das espécies Melastomataceae *Microlicia fasciculata* Mart. Ex Naudin (PAMG58103), *Lavoisiera imbricata* (Thunb.) DC. (PAMG58104), *Cambessedesia espora* (A. St. -Hil. Ex Bonpl.) DC. (PAMG58105) e *Microlicia serpyllifolia* D. Don (PAMG58106), pela espécie Asteraceae *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng.) R.M.King & H. Rob. (PAMG58102) e pela consulta ao banco de informações do INCT - Herbário Virtual da Flora e dos Fungos. Os locais de ocorrência foram identificados por receptores GPS (*Global Position System*) Oregon 550 Garmin®, os quais tiveram suas coordenadas geográficas (latitude, longitude e altitude) determinadas. A partir dessas coordenadas, efetuou-se a confecção da carta temática com os pontos de ocorrência da espécie nas cinco mesorregiões (FIGURA 1 e TABELA 1).

Figura 1 - Localização de 13 locais de ocorrência natural de *Lippia rotundifolia* Cham.



Fonte do mapa: IBGE, 2015.

Tabela 1 - Localização de 13 locais de ocorrência natural de *Lippia rotundifolia* Cham.

Código	Local	Coordenadas		Registro exsicata	Mesorregião
		Latitude	Longitude		
PVP	PE Veredas do Peruaçu	-14°55'24''S	-44°38'21''W	PAMG 58090	Norte
GIG	Gigante	-16°35'24''S	-42°55'30''W	PAMG 58097	
RPE	Rio do Peixe	-16°52'36''S	-43°28'56''W	PAMG 58094	
ODA	APP Olhos D'água	-17°26'10''S	-43°37'12''W	PAMG 58096	
ABO	Comunidade Abóboras	-16°56'87''S	-43°55'76''W	PAMG 58095	
SNO	PE Serra Nova	-15° 36,92'S	-42°44.034'W	PAMG 58096	
JFE	Joaquim Felício	-17°44'24''S	-44°11'41''W	PAMG 58093	Central
PRP	PE do Rio Preto	-18°06'09''S	-43°20'18''W	PAMG 58091	Vale Jequitinhonha
SGS	São Gonçalo do Rio das Pedras	-18°25'51''S	-43°28'56''W	PAMG58100	
RTI	Rio Tigre	-18°33'59''S	-43°49'40''W	PAMG 58092	
RBE	RPPN Brumas do Espinhaço	-19°03'04''S	-43°42'34''W	PAMG 58098	Metropolitana
SRI	Santana do Riacho	-19°16'47''S	-43°37'12''W	PAMG 58099	
PBO	PEc Quedas do Rio Bonito	-21°20'07''S	-44°58'55''W	ESAL 28086	Campo das Vertentes

PE: Parque Estadual; APP: Área de Preservação Ambiental; RPPN: Reserva Particular do Patrimônio Natural; PEc: Parque Ecológico  
 Fonte: Dados do autor (2016)



Os dados para a confecção da carta foram extraídos dos arquivos vetoriais disponibilizados pelo IBGE (2015), os quais foram importados para o SIRGAS 2000 (Sistema de Referência Geocêntrico para as Américas) cujo código EPSG foi o 31983 com projeção Datum em UTM zone 23s. Para classificação dos ambientes de ocorrência da espécie, identificou o bioma, o tipo de vegetação, a precipitação média anual e temperatura média anual, utilizando cartas temáticas disponibilizadas pelo IBGE (2015).

Para as análises das propriedades químicas do solo, foram realizadas amostragens em cada local de ocorrência, na camada 0-20 cm de profundidade, com o auxílio de um trado holandês, sendo realizadas cinco tradagens por local para formar cada amostra composta. As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Solos do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais. As determinações analíticas foram obtidas segundo as marchas de extração e determinação proposta pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 1997) e estão de acordo com os métodos analíticos recomendados pela Comissão de Fertilidade do Solo do Estado De Minas Gerais (CFSEMG, 1999). Os solos foram classificados conforme o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SANTOS et al., 2013).

Os dados das análises química e granulométrica dos locais de ocorrência da espécie foram submetidos à análise de componentes principais (ACP). Primeiramente as variáveis foram submetidas à análise de correlação de Pearson ( $r$ ) ( $p \leq 0,5$ ), a fim de verificar se as mesmas possuíam correlações mínimas o suficiente que justificassem seu uso na matriz de dados. A retenção dos eixos da ACP a serem interpretados foi pela redução do conjunto de dados em combinações lineares, gerando escores em torno de 80% da variação total. O que permitiu identificar as propriedades químicas mais relevantes na discriminação dos diferentes locais de ocorrência. A partir da matriz de correlação gerada, foi

possível separar grupos com base em suas medidas. Esta análise foi realizada no programa estatístico Ntsys-pc 2.1 (ROHLF, 2000).



### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os 13 ambientes localizados dentro das cinco mesorregiões do estado de Minas Gerais estão distribuídos em dois biomas, 92% localizados no Cerrado e 8% na Caatinga (FIGURA 1). Dentre essa distribuição, 36,36% estão em área de ecótono e 63,64% ocorrem em campo rupestre. As altitudes variaram entre 691 e 1.311 metros (m). A precipitação média anual variou desde regiões secas (700 mm) até regiões muito úmidas (1.600 mm) e a temperatura média anual, variou entre 14,5 até 24 °C (TABELA 2).

Tabela 2 - Caracterização dos 13 locais de ocorrência de *Lippia rotundifolia* em Minas Gerais, Brasil.

<b>Código</b>	<b>Município</b>	<b>Altitude (m)</b>	<b>Precipitação (mm)</b>	<b>Temperatura (C°)</b>	<b>Classe de Solo</b>
PVP	Cônego Marinho	729	700	22 - 24	LVAd
GIG	Botumirim	726	1200 - 1500	21 - 24	AR
RPE	Botumirim	722	1000 - 1200	21 - 24	AR
ODA	Olhos D'água	691	1000 - 1200	21 - 24	AR
ABO	Comunidade Abóboras	700	1000 - 1200	22 - 24	RLd
SNO	PE Serra Nova	790	700	21 - 24	AR
JFE	Joaquim Felício	1010	1200 - 1500	21 - 24	RLd
PRP	São Gonçalo do Rio Preto	901	1200 - 1500	18 - 19	AR
SGS	Serro	1020	1200 - >1500	14,5 - 21	AR
RTI	Gouveia	1020	1200 - >1500	19 - 21	RLd
RBE	Santana do Riacho	1311	1600	19 - 21	RLd
SRI	Lapinha	756	1600	19 - 21	RLd
PBO	Lavras	1092	1200 - 1500	19 - 21	AR

PE: Parque Estadual; APP: Área de Preservação Ambiental; RPPN: Reserva Particular do Patrimônio Natural; PEC: Parque Ecológico. TM: Temperatura média anual. LVAd: Latossolo Vermelho amarelo distrófico; AR: Afloramento Rochoso; RLd: Neossolo Litólico distrófico. Fonte base: Santos et al. (2013)

Observou-se que a espécie ocorre preferencialmente em ambientes de altitude, próximos a cursos de água, sendo essa uma característica específica da planta para ambiente rupestre (MARTENS, 2008). Ainda que esta seja uma característica da espécie, esta ocorre também em ambientes de altitude com precipitação variada, onde o menor índice pluviométrico ocorreu em PVP e SNO com 729 e 790 metros e, a menor altitude, foi em ODA, com 691 metros, cujo índice pluviométrico foi semelhante aos demais locais da mesorregião Norte, variando entre 1.000 a 1.500 mm. Enquanto que o maior índice ocorreu em locais com 600 metros de diferença entre si, com altitudes entre 756 em SRI e 1.311 metros em RBE (TABELA 2).

O gradiente térmico, a altitude e a temperatura não foram determinantes para a ocorrência da espécie dentro das fitofisionomias estudadas. Na mesorregião Vale Jequitinhonha, em PRP, a altitude mediana foi de 901 metros e a temperatura, inferior a 19 °C. Na Serra do Cipó, em SRI e RBE, as temperaturas foram as mesmas, entre 19 e 21 °C, porém, as altitudes foram diferentes, com 756 e 1.311 metros. A explicação para essa variação está na topografia montanhosa, uma vez que esses dois últimos ecótipos estão geograficamente próximos e pertencem à mesma mesorregião (FIGURA 1; TABELA 1). Para a mesorregião Norte não houve diferença em relação à altitude. Em relação à precipitação, a menor registrada em PVP e SNO, correspondeu às maiores temperaturas, entre 21 e 24 °C. Tal diferença é devido à área de transição entre Cerrado e Caatinga, cujas características edafoclimáticas são de semiáridas.

Observou-se também que o estágio fenológico da espécie varia entre os locais de ocorrência, em que PRP, RTI, JFE, ODA e GIG apresentaram indivíduos jovens, enquanto PBO, RBE, SRI, SGS, RPE e PVP apresentaram indivíduos adultos. Este fato está relacionado às condições ambientais em que a espécie se encontra, pois a planta oscila seu ciclo fenológico em função da

disponibilidade dos recursos necessários para seu estabelecimento (COLLEVATTI et al., 2010).

Das condições ambientais desfavoráveis, estão as queimadas e o uso da vegetação nativa para pastagem. Esse último evento foi observado no local SRI, onde a espécie foi localizada em área de vegetação secundária com presença de gado. Embora o ambiente seja propício para a ocorrência da espécie, por estar localizada em leito de rio, o pisoteio de animais na área, impede o estabelecimento de indivíduos neste local (ALVES et al., 2009). Os locais GIG, JFE e PVP apresentaram ocorrência de fogo. Em GIG, todos os indivíduos estavam em processo fisiológico de rebrota. Nos locais de ecótono, JFE e PVP, observou-se que no primeiro, os indivíduos estão em processo sucessional com todos os indivíduos jovens, enquanto que no segundo, o fogo apresentou níveis mais críticos. A explicação para a ocorrência da espécie neste tipo de ambiente é pelo fato da planta possuir sistema radicular bem desenvolvido, em que os xilopódios emitem brotações após eventos como as queimadas. Sendo estas características comuns em espécies pioneiras colonizadoras de ambientes antropizados (ALVES; SILVA, 2011).

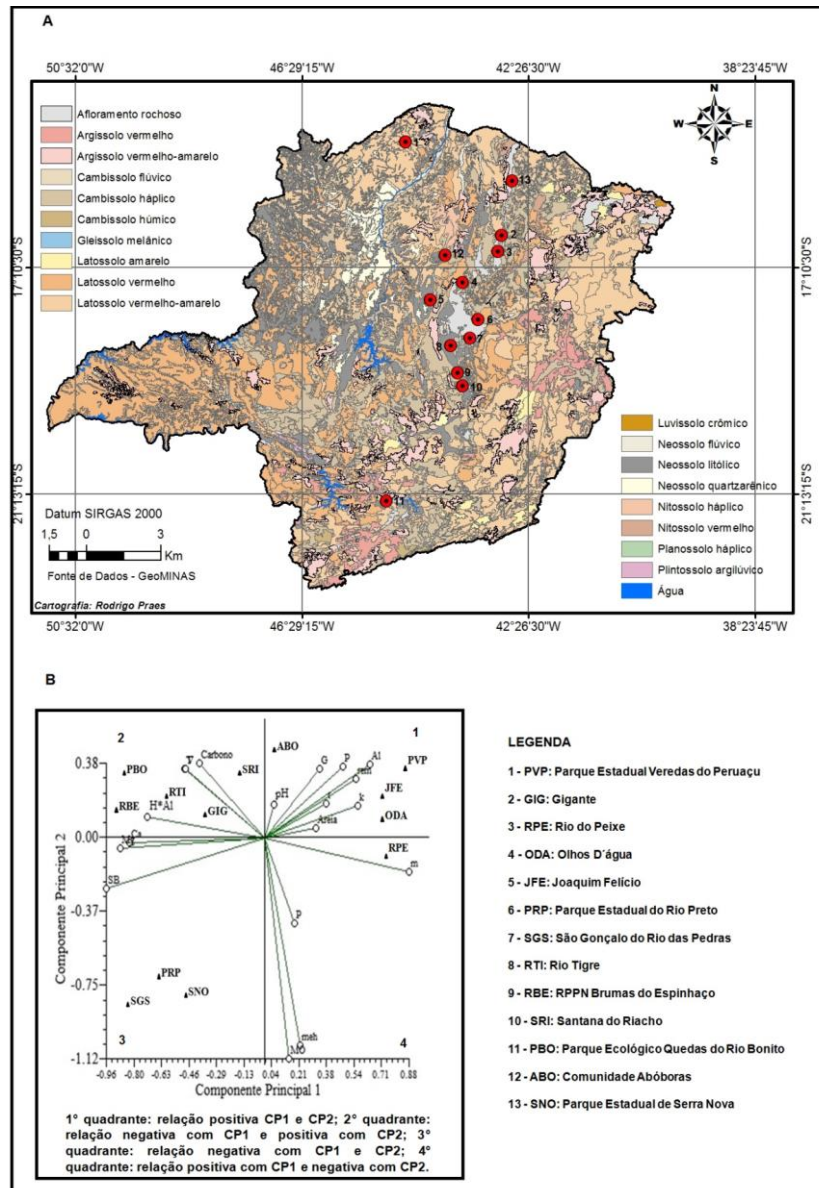
Entretanto, o clima, o grau de antropismo e o fogo são características frequentes na natureza, onde o estabelecimento da espécie em um espaço temporal, é distinto em cada local, cujo reestabelecimento depende das condições ambientais. Dentro dessa lógica, a espécie em estudo é considerada como modelo para metapopulação. Nesta dinâmica, cada área possui a mesma possibilidade de extinção e recolonização (ALVES; SILVA, 2011; LEVINS, 1969).

Quanto aos solos, esses foram agrupados em três classes, sendo que 8% dos locais (PVP) ocorrem em latossolo vermelho amarelo ácrico típico, 54% (GIG, RPE, ODA, PRP, SGS, SNO e PBO) ocorrem em afloramento rochoso e 38% (JFE, RTI, RBE, ABO e SRI) em neossolo litólico (TABELA 2). Dentre os

campos rupestres de altitude, afloramento rochoso e as escarpas, 92,30% dos locais ocorrem em ambientes rupestres com solos rasos e pedregosos (FIGURA 2a e TABELA 2), o que afirma a especificidade da planta para esses ambientes (RIBEIRO; FREITAS, 2010).



Figura 2 - Mapa de classificação de solo e b: projeção em espaço bidimensional dos dois componentes principais obtidos a partir da matriz de similaridade das variáveis dos atributos químicos e físicos do solo de 13 locais de ocorrência da *Lippia rotundifolia* no estado de Minas Gerais, Brasil.



Fonte do Mapa: Santos et al. (2013).

Os atributos físico-químicos do solo, pela análise dos componentes principais (ACP) e análise discriminante, sumarizaram as variáveis físico-químicas nos dois primeiros componentes principais (CP). Esses foram retidos para interpretação, com autovalores acumulados de 88,79% da variância de todas as variáveis. O primeiro componente explicou 64,03% da variabilidade para todas as amostras. Os atributos avaliados com maior carga fatorial no primeiro componente foram pH em água, acidez trocável (Al), soma de base (SB), capacidade efetiva de troca de cátions (t), saturação por alumínio (m) e areia, com escores variando entre 0,933 a 0,984. O segundo componente explicou 24,76% da variabilidade. Os atributos que contribuíram para a explicação deste componente foi o fósforo remanescente (Prem) e a matéria orgânica (MO), com escores negativos entre -0,694 e -0,645 (TABELA 3).

Tabela 3 - Atributos químicos e físicos do solo com os autovalores dos componentes principais dos 13 locais de coleta de *Lippia rotundifolia* em Minas Gerais, Brasil.

Componentes da variância	Índices de Solo		
	CP 1	CP 2	
Variabilidade (%)	64,03	4,76	
Variabilidade acumulada (%)	64,03	8,79	
Variáveis	Média±DP	Carga fatorial	
pH em H <sub>2</sub> O	4,47±0,82	0,984	0,003
Fósforo (Remanescente mg.L <sup>-1</sup> )	32,65±1,08	0,555	-0,726
Potássio (k em mg.dm <sup>-3</sup> )	20±11,48	0,890	0,190
Cálcio	0,23±0,04	-0,807	-0,051
Magnésio	0,1083±0,02	-0,876	-0,087
Acidez trocável (Al cmolc dm <sup>-3</sup> )	1,30±0,4	0,933	0,093
Acidez potencial (H+Al em cmolc dm <sup>-3</sup> )	7,93±3,4	-0,891	-0,017
Soma de base (SB em cmolc dm <sup>-3</sup> )	0,39±0,26	-0,982	-0,026
CTC efetiva (t cmolc dm <sup>-3</sup> )	1,69±0,45	0,972	-0,067
Saturação por alumínio (m em %)	75,42±2,56	0,975	-0,004
CTC em pH 7,0 (T em cmolc dm <sup>-3</sup> )	6,28±2,26	-0,861	-0,152
Saturação por base (V em %)	7,08±3,6	-0,868	-0,054
Matéria Orgânica (MO em dag Kg <sup>-1</sup> )	3,63±1,33	0,449	-0,645
Carbono Orgânico (C em dag Kg <sup>-1</sup> )	2,11±0,77	-0,654	0,084
Areia Grossa (dag Kg <sup>-1</sup> )	28,11±19,21	0,981	0,529
Areia Fina (dag Kg <sup>-1</sup> )	54,56±20,64	0,646	0,12
Silte (dag Kg <sup>-1</sup> )	10±8,05	0,19	0,24
Argila (dag Kg <sup>-1</sup> )	7,33±3,65	-0,34	-0,38

\*DP= Desvio Padrão; CP= Componente principal.

O primeiro componente principal (CP1) mostrou clara separação dos atributos químicos e físicos dos solos, em que os 13 locais de ocorrência, apresentaram solos hiperdistrófico e alumínico, cuja saturação por bases (V) foi inferior a 35% e por alumínio (m), variou de 60% em PBO a 85% em ODA (FIGURA 2b). O baixo valor de V infere a grande adsorção de  $Al^{3+}$  e  $H^+$  bem como as baixas quantidades de cátions básicos adsorvidos nos coloides do solo. Tal saturação remete à acidez potencial (H+Al) que apresentou alta correlação negativa (TABELA 3; FIGURA 2b). Esta variável contribuiu para o agrupamento dos locais de coleta de acordo a similaridade entre os ambientes.

Os locais de coleta foram distribuídos em dois grupos. O plano inferior do eixo apresentou solos com acidez potencial de 9,0 e 9,83  $cmolc\ dm^{-3}$  e pH em água muito baixo. O plano superior agrupou solos com acidez potencial entre 2,37 a 5,9  $cmolc\ dm^{-3}$  e pH baixo (FIGURA 2). A menor distância intragrupo foi observada para os solos de PRP, SGS e SNO por apresentarem caráter muito alcalino de 8,75, 9,0 e 12,98  $cmolc\ dm^{-3}$ , com textura arenosa, bem drenado e maior teor de matéria orgânica. A proximidade entre RTI, RBE, SRI e PBO é por coexistirem em ambientes de campo rupestre e de altitude e apresentarem as mesmas condições climáticas. Os ambientes de ODA e RPE apresentaram reação neutra e alcalinidade moderada (6,81 e 7,79  $cmolc\ dm^{-3}$ ).

Os ambientes de solos alcalinos (RPE, SGS), plano inferior do eixo, detêm os maiores indivíduos, com altura superior a 2 metros e caules bem desenvolvidos. Nos ambientes de solos ácidos (GIG, JFE, PVP, SRI, RTI, PBO e RBE), representando 54% dos locais, ocorrem os menores indivíduos, cuja altura não ultrapassa 1,5 metros. Esta observação confirma que o fogo e o distrofismo atuam como um dos fatores de seleção das espécies do Cerrado (PINHEIRO; MONTEIRO, 2010).

A forte correlação positiva do potássio (K) com a areia no CP1 foi confirmada no primeiro quadrante da análise espacial (FIGURA 2b), que

apresentou forte relação com a areia grossa, mostrando ter maior mobilidade em relação aos outros dois elementos, cálcio (Ca) e magnésio (Mg) no terceiro quadrante do CP1 (TABELA 3, FIGURA 2b). Para o segundo componente principal (CP2), a explicação da forte relação negativa entre as duas variáveis (MO e Prem), está na intensa adsorção de fósforo (P) em função dos baixos teores de matéria orgânica, em 58% dos locais amostrados (TABELA 3; FIGURA 2b) (PEREIRA et al., 2010). Em que este resultado corrobora que espécies deste gênero são bem adaptadas em ambientes pobres em nutrientes e com acidez elevada (MELO, 2012).

Contudo, a análise dos dados pela técnica de componentes principais, confirmou as características físico-químicas comuns a todos os ambientes quanto ao hiperdistrofismo, toxidez e a baixa capacidade efetiva de troca de cátion. O conhecimento das condições edofoclimáticas e ecogeográficas, bem como o grau de antropismo dos locais de ocorrência da *Lippia rotundifolia*, enfatiza esta espécie como um ecótipo bem adaptado, uma vez que a mesma não é considerada como ameaçada de extinção, além da ampla ocorrência corresponder a uma característica do gênero (SALIMENA et al., 2013; SALIMENA; FRANÇA; SILVA, 2009).

#### **4 CONCLUSÃO**

A espécie possui ampla distribuição e densidade variada. Não apresenta restrição ecogeográfica, porém, cada local de ocorrência possui características específicas dentro de uma dinâmica de metapopulação. A espécie possui preferência por ambientes próximos a cursos d'água e altitudes mais elevadas.



## REFERÊNCIAS

ALVES, J. J. A. et al. Degradação da caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 3, p. 126-135, jul./set. 2009.

ALVES, R. J. V.; SILVA, N. G. O fogo é sempre um vilão nos campos rupestres? **Biodiversidade Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 120-127, 2011.

CARVALHO, F. et al. The mosaico f habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot from arbuscular mycorrizal fungi. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 9-19, 2012.

COLLEVATTI, R. G. et al. Spatial genetic structure and life history traits in cerrado tree species: inferences for conservation. **Natureza e Conservação**, Goiânia, v. 8, n. 1, p. 54-59, jul. 2010.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS - CFSEMG. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa: CFSEMG, 1999. 359 p.

DURIGAN, G. et al. **Manual para recuperação da vegetação de cerrado**. 3. ed. São Paulo: SMA, 2011. 19 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análises de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa, 1997. 212 p.

FERNANDES, G. W. et al. Hail impact on leaves and endophytes of the endemic threatened. *Coccoloba cereifera* (Polygonaceae). **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 212, n. 10, p. 1687-1697, Oct. 2011.

GASTAUER, M.; MESSIAS, M. C. B.; MEIRA NETO, J. A. Florística composition, species richness and diversity of campo rupestre vegetation from the Itacolomi State Park, Minas Gerais, Brazil. **Environment and Natural Resources Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 115-130, 2012.

GOMIDE, M. S. et al. The effect of the essential oils from Five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 23, n. 1, p. 895-902, nov./dez. 2013.



INCT HERBÁRIO VIRTUAL DA FLORA E DOS FUNGOS. Disponível em: <<http://inct.splink.org.br/>>. Acesso em: 15 jan. 2014.  
INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOCIÊNCIAS E ESTATÍSTICA - IBGE.  
**Geominas**: infraestrutura de dados espaciais de Minas Gerais, 2015. Viçosa: IBGE, 2015. Disponível em: <<http://www.ide.ufv.br/geominas/srv/br/main.home>>. Acesso em: 15 jun. 2015.

\_\_\_\_\_. **Mapas temáticos**. Viçosa: IBGE, 2015. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br/tematicos>>. Acesso em: 15 jun. 2015.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F. do; CAMPOS, I. C. de. Soaring extinction threats to endemic plants in Brazilian metal-rich regions. **Ambio**, Stockholm, v. 40, n. 5, p. 540-543, July 2011.

LEITÃO, S. G. Analysis of the chemical composition of the essential oils extracted from *Lippia lacunose* Mart. e Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, São Paulo, v. 19, n. 7, p. 1388-1393, 2008.

LEVINS, R. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. **Bulletin of the Entomological Society of America**, Washington, v. 15, p. 237-240, Sept. 1969.

MARTENS, L.A. **Flores da Serra da Calçada**. Belo Horizonte: Editora da UFMG, 2008. 478 p.

MELO, M. P. **Conservação de *Lippia sidoides* Cham. do norte de Minas Gerais e Vale do Jequitinhonha**: localização, coleta, ecogeografia, crescimento, modo de reprodução e divergência genética. 2012. 100 p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2012.

MENDES, A. D. R. et al. Ecogeografia de populações de erva-baleeira (*Varronia curassavica*) no Norte e Vale do Jequitinhonha em Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 3, p. 418-424, mar. 2015.

PARRA-QUIJANO, M. et al. Review. Applications of ecogeography and geographic information systems in conservation and utilization of plant genetic resources. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 10, n. 2, p. 419-429, 2012.

PEREIRA, M. G. et al. Carbono, matéria orgânica leve e fósforo remanescente em diferentes sistemas de manejo do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 5, p. 508-514, maio 2010.

PIMENTA, M. R. et al. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 211-220, 2007.

PINHEIRO, M. H. O.; MONTEIRO, R. Contribution to the discussions on the origin of the cerrado biome: Brazilian savanna. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 1, p. 95-102, 2010.

RAPINI, A. et al. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 4, n. 1/2, p. 15-23, dez. 2008.

RIBEIRO, K. T.; FREITAS, L. Impactos potenciais das alterações no código sobre a vegetação de campos rupestre e campos de altitude. **Biota Neotropical**, Campinas, v. 10, n. 4, p. 239-246, out./dez. 2010.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: version 2.1. New York: Department of Ecology and Evolution State University of New York, 2000. 44 p.

SALIMENA, F. R. G. et al. Verbenaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Org.). **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. p. 1010-1016.

SALIMENA, F. R.; SILVA, T. R. S. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais, Verbenaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 119-120, 2009.

SALIMENA, F.; FRANÇA, F.; SILVA, T. R. S. Verbenaceae. In: GIULIETTI, A. M. et al. (Org.). **Plantas raras do Brasil**. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2009. p. 399-405.

SAMPAIO, F. **Hipóteses filogenéticas de espécies sul americanas do gênero *Lippia* Spp. (Verbenaceae) com base em sequências nucleotídicas**. 2009. 78 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biotecnologia) - Universidade Federal de Juíz de Fora, Juíz de Fora, 2009.

SANTOS, H. G. et al. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília: Embrapa Solos, 2013. 353 p.

SOUSA, S. M. et al. Relationship between pollen morphology and chromosome numbers in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 147-157, mar. 2013.

SOUSA, S. M.; TORRES, G.; VICCINI, L. F. Karyological studies in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 4, p. 1029-1037, dez. 2012.

SOUZA, G. A. et al. Levantamento ecogeográfico de *Dimorphandra mollis* Benth. (leguminosae-Caesalpinioideae) no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 4, p. 51-62, 2008.

ZAPPI, D. C. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015

**ARTIGO 2 DIVERSIDADE GENÉTICA DE CHÁ-DE-PEDESTRE  
(*Lippia rotundifolia*) EM MINAS GERAIS, BRASIL**

**GENETIC DIVERSITY OF CHÁ-DE-PEDESTRE (*Lippia rotundifolia*) IN  
MINAS GERAIS, BRAZIL**

Messulan Rodrigues Meira

Ernane Ronie Martins

Luciane Vilela Resende

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NBR 6022 (ABNT, 2003).**

## RESUMO

*Lippia rotundifolia* Cham. é uma espécie aromática, arbustiva de 0,5 a 2 m de altura, nativa e endêmica dos campos rupestres, cujas populações são isoladas por pequenas serras com poucos indivíduos. Devido ao isolamento geográfico e a restrição ambiental, pouco se sabe sobre sua diversidade genética. Com isso, objetivou-se com esta pesquisa estudar a variabilidade genética de chá-de-pedestre (*Lippia rotundifolia* Cham.) de ocorrência natural em dez populações do estado de Minas Gerais a partir de marcadores moleculares do tipo ISSR. Inicialmente, realizou-se coleta de material para propagação vegetativa de populações naturais de *Lippia rotundifolia*. Os locais de coleta foram: Parque Estadual de Serra Nova; Parque Estadual Veredas do Peruaçu; Comunidade Abóboras; Comunidade Gigante; Margens do Rio do Peixe; APP de Olhos d'água; Propriedade Particular em Joaquim Felício; Parque Estadual do Rio Preto; São Gonçalo do Rio das Pedras e Córrego do Rio Tigre. Após estabelecimento do banco ativo de germoplasma, realizou-se a extração e a amplificação dos fragmentos de DNA com iniciadores ISSR de 193 indivíduos. De posse dos resultados, uma matriz de distância genética foi construída. A partir dessa matriz, analisaram-se os índices de diversidade genética quanto à frequência alélica ( $N_a$  e  $N_e$ ), diversidade de Shannon ( $H'$ ), polimorfismo (PLP), heterozigotidade ( $H_e$ ) e fluxo gênico ( $N_m$ ). A estrutura genética apresentou maior variabilidade dentro das populações (93%). Os índices de diversidade genética foram baixos ( $H_e = 0,132$ ;  $H' = 0,214$ ;  $N_a = 1,111$ ;  $N_e = 1,183$ , PLP = 56,67%). A maior diversidade genética ocorreu nas populações com temperatura média de 20 °C, sendo esta a melhor condição climática para a ocorrência da espécie. Dentre todas as populações, a de Rio Tigre apresentou maior distância genética. A maior similaridade foi apresentada entre os indivíduos das populações Parque Estadual do Rio Preto, Parque Estadual de Serra Nova, Parque Estadual Veredas do Peruaçu e APA de Olhos D'água. Conclui-se que a *Lippia rotundifolia* possui baixa diversidade genética. O isolamento geográfico contribui para a maior diversidade genética e a temperatura é um fator crucial para a adaptação genotípica da espécie.

**Palavras-chave:** Chá-de-pedestre. Diversidade genética. Conservação.

## ABSTRACT

*Lippia rotundifolia* is a aromatic species, shrubby of 0.5 to 2 m of height, native and endemic from Campos rupestres, which populations are isolated by small mountains with few individuals. Because to geographic isolation and the environmental restrictions, little is known about their genetic diversity. Thus, it was aimed with the research to study the genetic variability of chá-de-pedestre (*Lippia rotundifolia* Cham.) with natural occurrence in ten places of the State of Minas Gerais, from molecular markers of ISSR type. Firstly, performed collection of material for vegetative propagation of natural populations of *Lippia rotundifolia*. The places of collection were: Parque Estadual de Serra Nova; Parque Estadual Veredas do Peruaçu; Abóboras community; Gigante community; edge of Rio do Peixe; environmental preservation area of Olhos d'água; private property in Joaquim Felício; Parque Estadual do Rio Preto; São Gonçalo do Rio das Pedras and brook of Rio Tigre. After the establishment of the active germoplasm bank, performed the extraction and amplification of DNA fragments with primers ISSR of 193 individuals. With the results, an array of genetic distance was built. From this matrix, we analyzed the genetic diversity index as the allelic frequency (Na and Ne), Shannos's index ( $H'$ ), polymorphism (PLP), heterozygosity (He) and gene flow (Nm). The result showed higher genetic variability within the population (93%). The genetic diversity index were low (He= 0.132;  $H'$ =0.214; Na= 1.111; Ne=1.183; PLP= 56.67%). The greatest genetic diversity in populations occurred with an average temperature of 20°C, this being the best climate condition for its occurrence. Among all populations, the Rio Tigre showed higher genetic distance. The highest similarity were presented between individuals of the population Parque Estadual do Rio Preto, Parque Estadual de Serra Nova, Parque Estadual Veredas do Peruaçu and environmental preservation area of Olhos D'água. We conclude that the *Lippia rotundifolia* has low genetic diversity. Geographic isolation contributes to greater genetic diversity and the temperature is a crucial factor for the genotypic adaptation of the species.

**Keywords:** Pedestrian tea. Genetic diversity. Medicinal plant. Conservation.



## 1 INTRODUÇÃO

O Cerrado concentra uma das maiores taxas de endemismo da flora brasileira. Com aproximadamente 30% da vegetação local intacta, é considerado um dos *hotspot* para conservação (GASTAUER; MESSIAS; MEIRA NETO, 2012). Em Minas Gerais, estes ambientes estão localizados em campo rupestre, uma das fitofisionomias do Cerrado brasileiro. Os campos rupestres são caracterizados por altitudes superiores a 800 m, xeromorfismo e presença de afloramentos rochosos (DURIGAN et al., 2011; RAPINI, et al., 2008).

Na composição florística nesta fitofisionomia há predomínio por espécies da família Verbenaceae. O gênero *Lippia* Linn. é o segundo maior desta família, na qual se concentra a maioria das espécies endêmicas nessas altitudes (CARVALHO et al., 2012; FERNANDES et al., 2011; JACOBI; CARMO; CAMPOS, 2011; SOUSA; TORRES; VICCINI, 2012). Dentre as espécies endêmicas dos campos rupestres está a *Lippia rotundifolia* Cham. (PIMENTA et al., 2007; SAMPAIO, 2009; SOUSA et al., 2013). Conhecida popularmente como chá-de-pedestre, é um arbusto de 0,5 a 2 m de altura (SALIMENA; SILVA, 2009), de populações restritas e com poucos indivíduos (MARTENS, 2008; VICINI et al., 2004). Suas flores são agrupadas em grandes cachos variando entre rosa-lilás a magenta ou falso rosa (SALIMENA; SILVA, 2009; SAMPAIO, 2009). No ambiente natural, esta espécie é confundida com outras do mesmo gênero devido à grande semelhança morfológica e sincronismo reprodutivo, dificultando sua identificação (PRAÇA-FONTES; VICCINI, 2006).

Estudos de diversidade genética em espécies nativas do Cerrado têm concentrado os esforços em espécies arbóreas frutíferas e madeiras ameaçadas de extinção (COSTA et al., 2015; FERNANDES, 2008; MELO JÚNIOR et al., 2012; SILVA et al., 2016; TELLES et al., 2010; TELLES et al., 2013; ZUCCHI, 2002). Em espécies aromáticas de interesse medicinal, os estudos da estrutura genética têm concentrado em germoplasmas de espécies domesticadas ou



naquelas cujos quimiotipos já foram identificados e possuem espaço consolidado no mercado (TRINDADE, 2010). Dentre as espécies estudadas, estão a erva-cidreira (*Lippia alba*), o alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) e o orégano mexicano (*Lippia origanoides* Hunth e *Lippia graveolens*) (BAI; WEN; ZHANG, 2013; BHAWNA et al., 2014; COSTA et al., 2015; MANICA-CATTANI et al., 2009; MARTÍNEZ-NATARÉN et al., 2014; ROCHA et al., 2015; VEGA-VELA; SÁNCHEZ, 2012).

Entretanto, identificar populações com maior diversidade genética é uma das medidas mitigadoras para conservação. A partir desse conhecimento é possível elaborar técnicas de manejo junto à comunidade local, como por exemplo, estabelecer plantios de enriquecimento e bancos de germoplasma, contribuindo para a conservação dos recursos genéticos *in situ* e *ex situ* dessas populações nativas (COLLEVATTI et al., 2010).

*Lippia rotundifolia* já possui estudos em ensaios biotecnológicos ao nível de micropropagação (RESENDE et al., 2015). Embora essa iniciativa contribua para o conhecimento e conservação da espécie, ainda é necessário estudo da diversidade genética. Dentro deste contexto, objetivou-se com esta pesquisa estudar a variabilidade genética de chá-de-pedestre (*Lippia rotundifolia* Cham.) de ocorrência natural em dez locais do estado de Minas Gerais, a partir de marcadores moleculares do tipo ISSR.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ambientes de ocorrência natural da *Lippia rotundifolia* estão distribuídos ao longo da Cadeia do Espinhaço. Para a pesquisa, selecionou-se 193 matrizes provenientes de 10 acessos situados em oito municípios de Minas Gerais. Estes ambientes estão alocados em campo rupestre com afloramento rochoso (60%), neossolo litólico (30%) e campo sujo com latossolo vermelho amarelo (10%) em área de ecótono entre Cerrado e Caatinga. Todas as populações foram georreferenciados com receptor GPS (*Global Position System*) Oregon 550 Garmin®. Esses acessos foram identificados no período de agosto de 2014 a dezembro de 2015, cujas matrizes foram propagadas via estacas e cultivadas em casa de vegetação. A caracterização e as coordenadas geográficas de cada população estão disponíveis na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização de dez ambientes de ocorrência natural da *Lippia rotundifolia* em Minas Gerais, Brasil.

Código	Município	N	Coordenadas		Condições Climáticas			Depósito Herbário
			Latitude	Longitude	Alt. (m)	Umid. (mm)	Temp. (C°)	
SNO - Rio Pardo de Minas		15	-15°36'S	-42°44'W	790	700	20±1	PAMG 58096
PVP - Cônego Marinho		15	-14°55'S	-44°38'W	729	700	23±1	PAMG 58090
ABO - Montes Claros		17	-16°56'S	-43°55'W	700	1100	22,5±1	PAMG 58101
GIG - Botumirim		20	-16°35'S	-42°55'W	726	1350	22,5±2	PAMG 58097
RPE - Botumirim		24	-16°52'S	-43°28'W	722	1100	22,5±2	PAMG 58094
ODA - Olhos D'água		18	-17°26'S	-43°37'W	691	1100	22,5±2	PAMG 58095
JFE - Joaquim Felício		24	-17°44'S	-44°11'W	1010	1350	22,5±3	PAMG 58093
PRP - São Gonçalo do Rio Preto		17	-18°06'S	-43°20'W	901	1350	< 19	PAMG 58091
SGS - Serro		25	-18°25'S	-43°28'W	1020	1350	18±2	PAMG 58100
RTI - Gouveia		18	-18°33'S	-43°49'W	1020	1350	20±2	PAMG 58092

SNO: Parque Estadual de Serra Nova; PVP: Parque Estadual Veredas do Peruaçu; ABO: Comunidade Abóboras; GIG: Comunidade Gigante; RPE: Margens do Rio do Peixe; ODA: APP de Olhos d'água; JFE: Propriedade Particular em Joaquim Felício; PRP: Parque Estadual do Rio Preto; SGS: São Gonçalo do Rio das Pedras; RTI: Córrego do Rio Tigre; N: Número de indivíduos coletados em cada local; PE: Parque Estadual; APP: Área de Preservação Ambiental; Alt.: Altitude em metros; Umid.: Precipitação média anual em milímetros; Temp.: Temperatura média anual em graus

## 2.1 Extração de DNA

A extração de DNA total seguiu a metodologia adaptada de Doyle e Doyle (1987), Ferreira e Gratapaglia (1995) e Nelson (1993). A triagem do material e o procedimento metodológico foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gérias - Campos Montes Claros, MG (ICA/UFMG).

O material para extração do DNA constituiu-se de folhas apicais acondicionadas em gelo e posterior estocagem em freezer com temperatura de -80 °C até o momento da extração de DNA. Para a extração, utilizou-se aproximadamente 100 mg de tecido foliar fresco de cada indivíduo macerado em nitrogênio líquido até pulverização completa da amostra. Após a maceração, o material foi transferido para microtubos de 2,0 mL previamente identificados contendo: 1% p/v Proteinase K (50µg/mL), 1 mL do tampão de extração (100 mM Tris-Hcl em pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% (p/v) CTAB, 1% (p/v) PVP 40.000) ao qual foi adicionado 1% p/v β-mercaptoetanol, previamente aquecido a 65 °C. O material foi homogeneizado e mantido em banho-maria nesta temperatura por 30 minutos com agitações periódicas. Após a retirada dos tubos do banho-maria, acrescentou-se uma mistura de 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) em cada tubo e homogeneizaram-se por inversões.

As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm em microcentrífuga Eppendorf®, recuperando 700 µL do sobrenadante, os quais foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL. Acrescentou-se 600 µL de isopropanol gelado, invertendo-se cuidadosamente os tubos, os quais foram mantidos por 20 minutos à -20 °C. O DNA precipitado foi novamente centrifugado por sete minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, adicionou-se 1 mL de etanol 70% como solução de lavagem por cinco minutos. O material foi novamente centrifugado e todo o líquido

descartado. O procedimento foi repetido com 1 mL de etanol a 95%, após lavagem, os *pellets* foram secos à temperatura ambiente *overnight*. Para a ressuspensão do DNA, acrescentou-se aos tubos com os respectivos *pellets* 100 µL de solução TE com RNase (1% p/v Tris-HCl 1 M 8,0 com 0,2% p/v de EDTA 0,5 M pH 8,0 e 1 % p/v RNase a 10µg/mL), os quais permaneceram à temperatura de aproximadamente 37 °C por 1 hora.

## 2.2 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada em géis de agarose 0,7% (p/v) corados com 0,2% p/v de Gel Red Invitrogen®. Alíquotas de cada amostra de DNA foram aplicadas nos poços do gel ao lado de uma série de concentrações conhecidas de DNA do fago lambda Invitrogen® ( $\lambda$ ). O gel com as amostras foi submetido à corrida de eletroforese com voltagem de 90 v por 30 minutos. A concentração de DNA de cada amostra foi estimada por comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas do DNA do fago  $\lambda$ , visualizadas em transluminador com radiação UV e pela estimativa da razão A260/A280 nm obtida pela leitura em espectrofotômetro. Posteriormente o DNA foi padronizado em 50ng.µL<sup>-1</sup> para as reações de ISSR. Uma curva preliminar de calibração do MgCl<sub>2</sub> foi realizada, sendo a concentração 2 mM utilizada na reação de amplificação.

## 2.3 Determinação da temperatura de anelamento e reação

Para a detecção de polimorfismo, testaram-se 43 Iniciadores Inter Simple Sequence Reaction (University of British Columbia, Canadá) - UBC ISSR em triplicatas de plantas matrizes (ADHIKARI et al., 2015).

As reações de amplificação foram feitas num volume de 25 µL contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM de KCl; 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 0,25 µM de iniciador ISSR, 50 ng de DNA molde, 1 unidade de Taq polimerase (Invitrogen) e H<sub>2</sub>O estéril q.s.p..

As reações foram submetidas a 35 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos. Cada ciclo consistiu de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos entre 47 e 56 °C (teste de gradiente de temperatura) e 2 minutos a 72 °C. Ao final de 35 ciclos, foi realizada uma extensão final de 7 minutos a 72 °C. A reação de PCR para todos os *primers* ISSR foram realizados em termociclador Eppendorf Master Cycler® gradient (AG Flexlid, 22331 Hamburg). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese (5v.cm<sup>-1</sup>) em géis de agarose 2% (p/v), utilizando o tampão de corrida TBE 1X. O DNA do fago lambda Invitrogen ® (λ) de 100 bp foi usado como marcador de peso molecular. Os géis foram corados com 2% p/v de Gel Red Invitrogen® visualizados sob luz UV e fotografados em câmera digital modelo EDA-KODAK acoplada em fotodocumentador Photo Doc It 65 Imaging System.

#### 2.4 Análise de dados

A partir da leitura dos géis, gerou-se uma matriz binária em que os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas. De posse dessa matriz, foi obtida a análise da variabilidade com base na estrutura, fluxo gênico e distâncias genéticas por técnicas de agrupamento, análise discriminante e correlação da distância genética com a geográfica.

Para a variabilidade genética, utilizaram-se os parâmetros para dados diploides dominantes (NEI, 1973, 1978). Tendo em vista a natureza dominante do marcador ISSR, para estimar a frequência alélica, consideraram-se os locos como se estivessem em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estas estimativas foram o percentual de polimorfismo (P) pela fórmula:  $P = \frac{nbp}{nbt}$ , em que nbp é o número de bandas polimórficas e nbt é o número de bandas totais. A heterozigosidade esperada (*He*)  $He = 1 - \sum P_i^2$  em que  $P_i$  é a frequência estimada do iésimo alelo. O índice de diversidade de Shannon (*H'*) pela fórmula:  $H' = \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$  em que  $p_i$  é a frequência da banda e  $n$  é o número de marcadores avaliados

(BROWN; WEIR, 1983); o número de alelos observados ( $N_a$ ); número de alelos efetivos ( $N_e$ ); heterozigosidade média ( $H_m$ ); heterosigosidade total ( $H_t$ ) e a distância genética de Nei (1978).

O estudo da estrutura genética entre e dentro das populações foi obtido pelo método mais comumente utilizado para dados de marcadores dominantes: a Análise de Variância Molecular (AMOVA). Esta metodologia permite desdobrar a distância entre e dentro das populações, partindo de uma matriz de distância euclidiana calculada entre indivíduos com base na matriz binária. O modelo matemático que descreve a AMOVA é um modelo hierárquico que considera os níveis de locais e de indivíduos dentro de cada população, conforme a seguinte equação:  $X_{ijk} = x + a_k + b_{jk} + c_{ijk}$  em que  $x$  é a média geral,  $a$  é o efeito de regiões,  $b$  de populações e  $c$  de haplótipos dentro de populações, dentro de regiões, sendo que esses efeitos são aditivos, aleatórios e independentes, associados aos componentes de variância,  $\sigma_a^2 \sigma_b^2 \sigma_c^2$  e, respectivamente. A variância total ( $\sigma_t^2$ ) foi obtida pela soma destes. O componente de variância interpopulacional foi extraído por equações das esperanças de quadrados médios (QMD), análogo à análise de variância convencional das frequências alélicas, utilizadas para estimar o PhiPT (análogo ao  $F_{ST}$ ). A significância associada a cada uma destas estimativas foi obtida por meio de 5.000 permutações (Bootstrap). Para obter uma distribuição nula, sem diferenciação, dessas estatísticas (PhiPT=0), foram utilizados procedimentos de aleatorização (fileiras e colunas correspondentes), realizada pela decomposição total dos componentes entre e dentro das populações utilizando as distâncias ao quadrado, conforme descrito por Excoffier, Smouse e Quattro (1992). Para esta análise utilizou-se o *software* livre GenAlEx v. 6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2012; SMOUSE; WHITEHEAD; PEAKALL, 2015).

De posse do valor de PhiPT, o fluxo gênico ( $N_m$ ) entre as populações foi estimado de forma indireta, assumindo o modelo de ilhas proposto por Crow

e Aoki (1984) pela fórmula:  $Nm = \frac{1}{4a} \left( \frac{1-PHIPT}{PHIPT} \right)$ . Este modelo corrige a análise para pequeno número de populações. É baseada na teoria da estatística  $F$  proposta por Wright (1951), cuja proposta parte da premissa de que existe uma relação entre a diversidade genética e a frequência alélica. A intensidade do fluxo é obtida pela fórmula:  $PHIPT = \frac{1}{1+4Nm}$ , em que  $N$  é o tamanho efetivo de cada população e  $m$  é a taxa de migração entre as populações.

A análise de agrupamento foi realizada usando dois métodos, o de agrupamento por pares do vizinho mais próximo (UPGMA) baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard ( $j$ ) e distância de Nei ( $D$ ) (NEI, 1972), adotando a rotina SAHN (*Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested Clustering*), e o de otimização de Tocher. A similaridade de Jaccard foi obtida pela fórmula:  $S_{ij} = \frac{a}{a+b+c}$ , em que  $a$  é o número de casos em que ocorre a presença de bandas em todos os indivíduos, simultaneamente;  $b$  é o número de casos em que ocorre a presença de bandas somente no indivíduo  $i$ , e  $c$  é o número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo  $j$ . As distâncias genéticas foram obtidas com base nos dados binários calculadas pelo Genalex 6.502 a partir da fórmula proposta por Nei (1972):  $D = \left\{ \delta_{xy}^2 \right\} = 100 \left[ 1 - \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y} \right]$ , em que  $n_x$  e  $n_y$  são números de marcadores observados em indivíduos  $x$  e  $y$ , respectivamente, e  $2n_{xy}$  é o número de marcas existentes em todos os indivíduos.

A representatividade do dendrograma foi testada por meio da correlação entre as distâncias genéticas originais e as distâncias entre as populações no dendrograma com o auxílio do pacote NTSYS-pc (Numerical Taxonomy System, version 2.11 (ROHLF, 2000)).

A fim de demonstrar a distribuição múltipla bidimensional da espécie, a matriz de distância genética também foi submetida à análise da coordenada principal. Para verificar a relação geoclimática com as variáveis genéticas,



realizou-se análise de correlação entre as matrizes de distâncias genética e geográfica (km em linha reta). Para esta análise, aplicou-se o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) entre as matrizes. A significância desta correlação matricial foi testada pelo teste de Mantel, utilizando 1.000 permutações aleatórias. Ambas as análises foram realizadas no Genalex v. 6.502 (MANLY, 1997; MANTEL, 1967). As variáveis ambientais: altitude, precipitação e temperatura, também foram correlacionadas com a estrutura genética. A significância dessas variáveis foi obtida a partir do coeficiente de determinação das equações de regressão ajustadas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

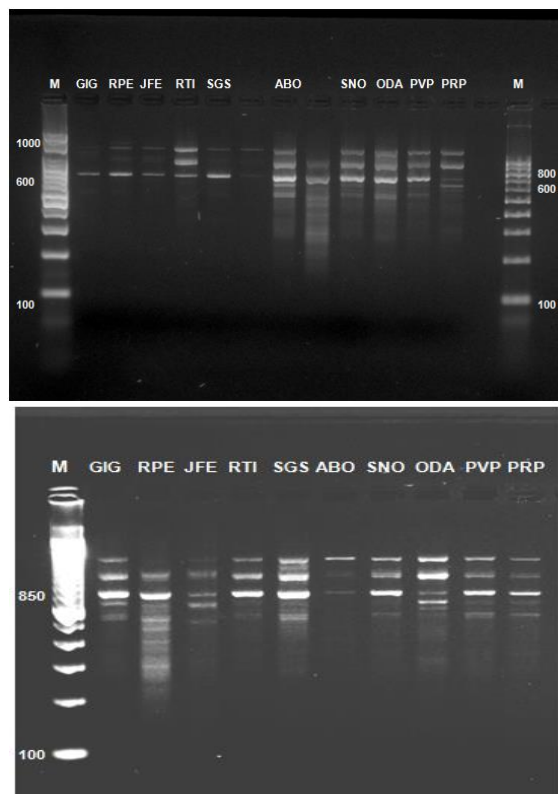
Dos 43 *primers* testados, 18 tiveram suas temperaturas de anelamento otimizadas, nos quais apresentaram qualidade na amplificação dos fragmentos de DNA. As sequências e as temperaturas de anelamento estão descritas na Tabela 2. O número total de bandas foi de 86, variando de 3 (UBC 886 e 820) a 6 (UBC 810) com uma média de 4,77 bandas por *primer* (TABELA 2). Os iniciadores UBC 810 e UBC 812 foram os mais polimórficos (PLP). O tamanho dos fragmentos amplificados foi em média de 300 a 1.000 pb para UBC 810 e 600 a 800 pb para UBC 812 (FIGURA 1). Esses dois *primers* são detentores das sequências GA: (GA)<sub>n-T</sub> e (GA)<sub>n-A</sub> respectivamente, sendo os nucleotídeos G e A, reportados como os mais polimórficos e que abrange todo o genoma de espécies vegetais (ADHIKARI et al., 2015; BHAWNA et al., 2014).

Tabela 2 - Identificação, temperatura de anelamento e polimorfismo de *Lippia rotundifolia* com 18 iniciadores ISSR.

INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	T (°C)	Nº Bandas	Total P %
BECKY	(CA)7-YC	49	5	50
CHRYIS	(CG)7-YG	53	6	50
DAT	(GA)7-RG	48; 49	5	46
MANNY	(CAC)4-RC	56	5	45
TERRY	(GTC)4-RC	53	6	70
UBC 808	(AG)8-C	49	5	45
UBC 810	(GA)8-T	53	6	100
UBC 812	(GA)8-A	53	6	100
UBC 813	(CT)8-T	49	5	40
UBC 820	(GT)8-C	53	3	52
UBC 827	(AC)8-G	49	5	40
UBC 830	(TC)8-G	49; 53; 56	5	75
UBC 834	(AG)8-YT	49;53;56	3	45
UBC 851	(GT)8-YG	48; 53	4	48
UBC 864	(ATG)6	49	5	60
UBC878	(GGAT)3-GGA	49	5	40
UBC 886	(CT)7-VDV	53; 56	3	52
UBC 890	(GT)7-VHV	49; 53	4	90
Média		51; 54	4,77	58,22
TOTAL			86	

R= purina (A ou G) e Y= pirimidina (C ou T)

Figura 1 - Perfil do DNA de indivíduos de *Lippia rotundifolia*, com fragmentos de DNA amplificados com *primer* ISSR.



Dos 18 iniciadores selecionados pelo ensaio de temperatura de anelamento, dez destes apresentaram alto padrão de reprodutibilidade com polimorfismo acima de 50%. Portanto estes foram escolhidos para o estudo de diversidade genética nos acessos das populações de *Lippia rotundifolia*. O critério de seleção dos *primers* está de acordo com Manica-Cattani et al. (2009) que obtiveram 65% de bandas polimórficas para a *Lippia alba* para 17 *primers* ISSR, sendo estes considerados reprodutíveis e de alta qualidade.

Os dez *primers* utilizados geraram 253 bandas polimórficas nos indivíduos analisados (TABELA 3). A diversidade genética ( $H_e$ ) dos indivíduos foi maior do que o número de indivíduos observado ( $H_o$ ). Apenas para os

acessos (1-GIG e 7-SNO), a  $H_o$  foi ligeiramente maior do que a  $H_e$ , apesar da população (1-GIG) apresentar baixa  $H_e$ , é considerada em equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW). De modo geral, para as populações estudadas, houve pouca diferença entre os valores esperados e observados de heterozigosidade (0,003). Este fato pode ser devido à seleção natural que aumenta a frequência de heterozigotos durante o recrutamento, sendo este um acontecimento comum em algumas espécies tropicais (CONTE et al., 2003; GONÇALVES et al., 2010; ZUCCHI, 2002).

Tabela 3 - Índices de diversidade genética de *Lippia rotundifolia* usando marcador ISSR.

Local	Origem	Amostra N	Parâmetros de diversidade genética					
			Na	Ne	H'	He	Ho	PLP
1	GIG	20	0,667	1,078	0,112	0,063	0,065	44,44
2	RPE	24	0,889	1,220	0,211	0,139	0,136	44,44
3	RTI	18	1,333	1,312	0,309	0,204	0,198	66,67
4	JFE	24	0,889	1,191	0,198	0,129	0,126	66,67
5	SGS	25	1,778	1,265	0,313	0,191	0,185	88,89
6	ABO	17	1,333	1,218	0,261	0,160	0,157	55,56
7	SNO	15	1,778	1,258	0,321	0,189	0,195	88,89
8	ODA	18	0,889	1,119	0,158	0,094	0,092	44,44
9	PVP	15	0,889	1,103	0,150	0,087	0,084	33,33
10	PRP	17	0,667	1,067	0,103	0,058	0,056	33,33
	Média	19,3	1,111	1,183	0,214	*0,132	*0,129	56,67
	Desvio Padrão		±0,35	±0,59	±0,068	±0,042	±0,041	±0,2
Total		193				*≠0,003		253

N=Número de indivíduos, Na= n° alelos observados, Ne= n° alelos efetivos, He=Heterozigiosidade esperada (Nei, 1973), H'= índice de informação de Shannon, Ho= Heterozigiosidade observada, PLP= Percentual de loco polimórfico.

A porcentagem de bandas polimórficas é considerada um importante indicativo da diversidade genética. O percentual de loci polimórficos para os dez ambientes variou de 33,33 em 9-PVP e 10-PRP a 88,89% em 5-SGS e 7-SNO, com um percentual médio de 56,67%. Em estudos de diversidade genética desenvolvidos com ISSR para espécies medicinais nativas, as porcentagens de bandas detectadas foram superiores a 50% para *Lippia alba* Mill. (MANICA-CATTANI, 2009) e superior a 80% para *Lippia origanoides* H.B.K. (SUÁREZ; CASTILLO; CHACÓNS, 2008).

O número médio de alelos ( $N_a$ ) por população variou de 0,67 a 1,78 com média de 1,11. O número de alelos efetivos ( $N_e$ ) em todos os locais foi em média de 1,18. A heterozigosidade média esperada ( $H_e$ ) e o índice de Shannon ( $H'$ ) para todas as populações foram de 0,132 e 0,214 (TABELA 3). Esses índices médios de diversidade genética são considerados valores moderados a baixos, pois estão abaixo de 0,5 (BOTSTEIN et al., 1980). Para Nybom (2004), a  $H_e$  abaixo de 0,22 é considerada baixa. A espécie *Phyla scaberrima* (Juss. ex Pers.) Moldenke, da mesma família, apresentou variabilidade genética inferior à obtida no presente estudo ( $PLP= 46,62$ ,  $H_s= 0,0695$  e  $H'= 0,119$ ). Este fato se deve ao comportamento reprodutivo ser semelhante ao de *Lippia rotundifolia* (ANDROCIOLOI et al., 2015). Já a espécie *Lippia graveolens* H.B.K. apresentou alta variabilidade com heterozigosidade de ( $H_T=0,225$ ) (VARGAS-MENDOZA; ORTEGÓN-CAMPOS; CALVO-IRABIÉN, 2016). Assim como a *Lippia origanoides* Hunth que apresentou índices de diversidades de ( $H'=0,44$  e  $0,45$ ) (SUÁREZ; CASTILLO; CHACÓN; 2008; VEGA-VELA; SÁNCHEZ, 2012).

Melo Júnior et al. (2012) afirmam que os índices de diversidade genética variam de acordo com a espécie e o marcador molecular. Para a *Lippia rotundifolia*, este valor variou de acordo com o local de ocorrência da espécie. Ao comparar a variabilidade da estrutura genética com os fatores ambientais de cada população, observou-se que a estrutura genética possui forte correlação

com a temperatura. As temperaturas médias anuais de 20 °C detêm as populações melhores adaptadas, com maiores índices de diversidade genética.

Os maiores índices de diversidade foram para as populações 3-RTI, 5-SGS e 7-SNO, cuja temperatura média anual é de 20 °C (TABELA 1). Os indivíduos da população 3-RTI apresentaram o maior número de alelos efetivos (1,312) e diversidade genética ( $H_e = 0,204$ ). Os indivíduos das populações 5-SGS e 7-SNO apresentaram (1,25) e (1,258) de alelos efetivos e ( $H_e = 0,191$ ) e ( $H_e = 0,189$ ) de heterozigosidade esperada, com proximidade entre os parâmetros, cujo número de loci polimórfico foi de 88,89%. A menor diversidade genética foi obtida em 10-PRP ( $H_e = 0,058$ ), assim como  $H_e$  e PLP, os demais parâmetros avaliados ( $N_a$ ,  $N_e$ ,  $H'$ ,  $H_o$ ) também foram mais baixos nesta população.

A baixa variabilidade genética pode ser explicada pela dificuldade de cruzamento da espécie, e de acordo com Praça-Fontes (2006), a *Lippia rotundifolia* apresenta pólen com alto percentual de anormalidade, com 64,98% de pólen inférteis. Esse resultado foi corroborado por Pierre (2004) para a *Lippia alba* Mill. que apresenta quimiotipos tetraploides e mixoploides cujas irregularidades meióticas ocasionaram em altas taxas de grãos-de-pólen inviáveis. Outro fator que pode ter contribuído, é o endemismo devido ao isolamento geográfico por pequenas serras. Portanto, a infertilidade e o isolamento contribuem para a ocorrência de cruzamento entre indivíduos aparentados, comprometendo o banco de sementes (COSTA et al., 2015). Este fato é confirmado por Praça-Fontes e Viccini (2006) e Viccini et al. (2006) que reportaram a dificuldade da espécie em produzir sementes. Com isso, acredita-se que a principal forma de reprodução desta espécie seja por brotamento dos xilopódios, pois, conforme observação *in loco*, os indivíduos estão distribuídos próximos entre si, o que pode levar à uma baixa variabilidade genética da espécie.

A maior estrutura da variabilidade genética, realizada pela AMOVA ocorreu dentro das populações com 93% e apenas 7% entre as populações (TABELA 4 e FIGURA 2). Nesta análise, a estimativa do índice de diferenciação foi de  $F_{ST}=0,073$ . Essa diferenciação é considerada moderada, pois sua amplitude se encontra entre 0,05 e 0,15 (HARTL; CLARK, 2010). Em *Lippia origanoides* H.B.H., este índice foi de 0,179, mostrando também que a maior variação ocorre entre os indivíduos dentro das populações, com 82% (VEGA-VELA; SÁNCHEZ, 2012). Este resultado é importante para a conservação dos recursos genéticos, pois quanto maior a variabilidade entre os indivíduos, mais alelos serão conservados em bancos ativos de germoplasma.

Na estrutura da variabilidade genética, o índice de fixação da diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) foi inversamente proporcional ao fluxo gênico (Nm). Portanto este índice estimou um movimento de genes (Nm) de uma população para outra de 3,198. Como o Nm é maior que um (1,0), existe um fator evolutivo na população que mantém as frequências alélicas, homogeneizando as populações. Este valor mostra que a deriva genética não atua na diferenciação entre as populações (HARTL; CLARK, 2010) e que, nas populações, não ocorre o risco de alelos migrantes formarem outra população diferente daquela que a originou (HARTL; CLARK, 2010; SEBBENN et al., 2011).

A distância genética entre os indivíduos de cada população está de acordo com os resultados da estrutura genética, em que a maior diversidade dentro e entre foi obtida pela mesma população, (3-RTI) (FIGURA 2). Embora a heterozigosidade dentro das populações seja moderada, os valores foram representativos, corroborando aos resultados da estrutura genética dentro de cada população (TABELA 4). A consistência destes resultados está na semelhança da estrutura genética e na diferença mínima da variabilidade ( $\neq He > Ho=0,003$ ). O valor moderado da estrutura genética, além da proximidade entre os indivíduos,



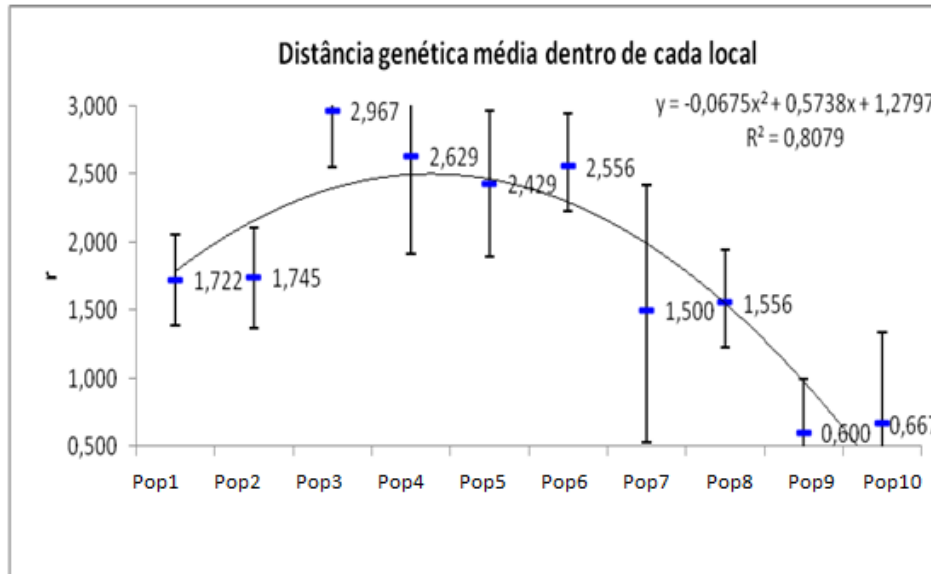
também pode ser explicado pelo modo misto de propagação como uma das estratégias reprodutivas, os quais não estimam comprometimento da estrutura populacional para esta espécie (GONÇALVES et al., 2010; HARTL; CLARK, 2010; PIMENTA et al., 2007; VICCINI et al., 2005). Esta informação é importante para a persistência da espécie em condições ambientais desfavoráveis como as queimadas (NYBOM, 2004; VICCINI et al., 2004). Contudo, as análises da variabilidade com base nas frequências alélicas, bem como a estimativa da estrutura genética das populações e a distância genética de Nei (1972) entre os indivíduos dentro de cada população contribuem para o entendimento do arranjo espacial da espécie a partir da distribuição dos alelos ao acaso em escala temporal (TABELA 3 e 4 e FIGURA 2).

Tabela 4 - Análise de variância molecular (AMOVA) e estimativa do fluxo gênico (Nm) de populações de *Lippia rotundifolia*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Est. Var.	% variância	F <sub>ST</sub>	P	Nm
<b>Entre Populações</b>	9	20,458	2,273	0,071	7%	0,073	0,001	3,198
<b>Dentro Populações</b>	183	166,195	0,908	0,908	93%	0,798	0,001	
<b>Total</b>	192	186,653		0,979	100%			

Grau de Liberdade (GL), Soma dos Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Componentes da variância (Est. Var.), Variância total (%), F<sub>ST</sub> (índice de fixação ou proporção da máxima diferenciação genética (variância total) das frequências alélicas que ocorre entre e dentro das populações e a redução da heterozigosidade devido à deriva genética análogo ao PhiPT), P (Probabilidade de ter um componente de variância maior do que os valores observados ao acaso para 5.000 Nm=Fluxo gênico entre populações pelo modo indireto).

Figura 2 - Distância genética entre os indivíduos de dez populações de ocorrência natural da *Lippia rotundifolia* em Minas Gerais, Brasil.



Quanto às distâncias genéticas, estas variaram de 0,001 a 0,030, e as distâncias geográficas variaram de 39 a 443 km. O teste de Mantel não apresentou correlação entre as distâncias genéticas e geográficas ( $r = -0,064$ ,  $p > 0,04$ ). A maior distância genética foi obtida entre as populações 3-RTI e 1-GIG, equidistantes 223 km. As populações com maior distância geográfica foram 8-ODA e 7-SNO com 443 km, em que essas foram as mais próximas geneticamente (TABELA 5).

Tabela 5 - Matriz de distâncias genética de Nei (D) baseada na distância euclidiana (diagonal inferior) e geográfica em linha reta por quilômetro (diagonal superior) da *Lippia rotundifolia* em dez populações de ocorrência natural em Minas Gerais, Brasil.

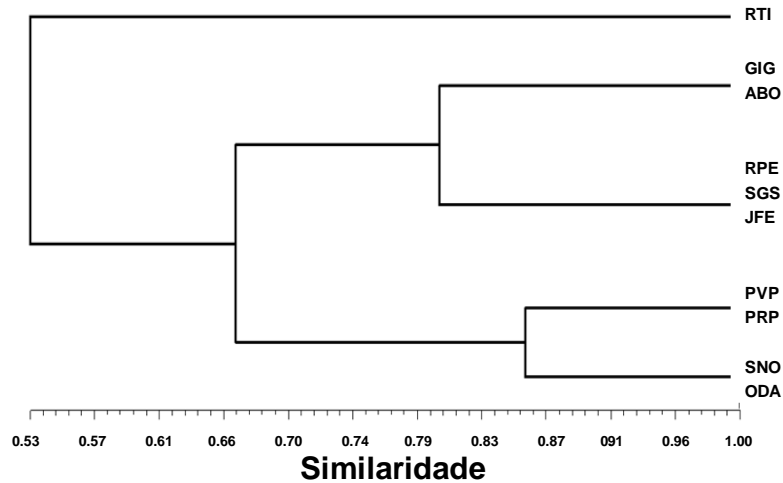
DG \ DGG	GIG	RPE	RTI	JFE	SGS	ABO	SNO	ODA	PVP	PRP	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
GIG	1	-	67	223	122	218	49	190	330	191	191
RPE	2	0,012	-	208	160	181	100	143	300	280	141
RTI	3	0,03	0,004	-	100	39	180	348	205	414	73
JFE	4	0,004	0,012	0,028	-	108	93	283	107	317	99
SGS	5	0,008	0,005	0,01	0,02	-	172	323	120	409	40
ABO	6	0,016	0,006	0,015	0,016	0,002	-	196	86	238	143
SNO	7	0,015	0,004	0,018	0,01	0,005	0,005	-	443	218	284
ODA	8	0,012	0,006	0,018	0,015	0,004	0,005	0,001	-	295	159
PVP	9	0,018	0,006	0,023	0,013	0,007	0,008	0,001	0,001	-	380
PRP	10	0,018	0,005	0,022	0,012	0,006	0,007	0,001	0,001	0,001	-

Populações de *Lippia rotundifolia*: 1: Comunidade Gigante no município de Botumirim; 2: Rio do Peixe no município de Botumirim; 3: Rio Tigre no município de Gouveia; 4: Serra Geral no município de Joaquim Felício; 5: São Gonçalo do Rio das Pedras no distrito de Serro; 6: Comunidade Abóboras no município de Montes Claros; 7: Parque Estadual de Serra Nova; 8: APA de Olhos D'água; 9: Parque Estadual Veredas do Peruaçu; 10: Parque Estadual do Rio Preto.

As matrizes de distância original, com a distância de Nei, similaridade de Jaccard e a distância por reamostragem com 999 permutações (bootstrap), apresentaram alta correlação cofenética, na qual a correlação entre distância por reamostragem e distância de Nei foi  $r=0,90$  e a correlação entre similaridade de Jaccard e distância de Nei foi de  $r=0,94$ . Esta última foi a de maior correlação e a mais recomendada em estudos de diversidade genética. O coeficiente de similaridade variou de 0,53 a 0,86 com similaridade genética de 80% (FIGURA 3). A alta correlação indica que o dendrograma apresentou um bom ajuste entre os dados originais e a matriz de dissimilaridade (VEGA-VELA; SÁNCHEZ, 2012).

Quanto ao agrupamento, as ligações no dendrograma refletiram corretamente os padrões multivariados de distâncias genéticas entre os acessos. O agrupamento pelo método hierárquico UPGMA permitiu a visualização de três grandes grupos, o primeiro com os acessos da população 3-RTI, o segundo agrupou os acessos das populações 1-GIG, 6-ABO, 2-RPE, 5-SGS e 4-JFE e o terceiro agrupou os acessos das populações 9-PVP, 10-PRP, 7-SNO e 8-ODA (FIGURA 3). O agrupamento, pelo método de otimização de Tocher, considerou todos os indivíduos como pertencentes a um único grupo pela suas distâncias médias (ponto de fusão). Segundo a otimização, as dez populações não possuem distância genética suficiente que justificasse a separação em grupos diferentes (TABELA 6). Este fato pode ser explicado em função do método UPGMA ter como critério o agrupamento de genótipos mais similares dentro do grupo, enquanto o método de otimização de Tocher preconiza sempre as maiores distâncias entre grupos, sendo considerado um método exclusivo na formação dos grupos de genótipos (BERTAN et al., 2006; CRUZ; REGAZZI, 1997).

Figura 3 - Padrão da distância genética entre os indivíduos de dez populações de ocorrência natural da *Lippia rotundifolia* baseado em marcadores ISSR. Análise de agrupamento hierárquico definido pelo método UPGMA com base nas distâncias genéticas de Nei (1978).



Populações de *Lippia rotundifolia*: GIG: Comunidade Gigante no município de Botumirim; RPE: Rio do Peixe no município de Botumirim; RTI: Rio Tigre no município de Gouveia; JFE: Serra Geral no município de Joaquim Felício; SGS: São Gonçalo do Rio das Pedras no distrito de Serro; ABO: Comunidade Abóboras no município de Montes Claros; SNO: Parque Estadual de Serra Nova; ODA: APA de Olhos D'água; PVP: Parque Estadual Veredas do Peruaçu; PRP: Parque Estadual do Rio Preto.

O agrupamento pelos dois métodos está de acordo com a variabilidade genética entre as populações, em que a distância genética média é considerada baixa ( $H_e=0,132$ ), com diferenciação entre as subpopulações de ( $F_{ST}=0,07$ ). Ambos consideraram a população 3-RTI como a mais distante geneticamente ( $H_e= 0,214$  e  $D= 0,03$ ), bem como as populações 7-SNO, 8-ODA, 9-PVP e 10-PRP como as mais próximas ( $H_e=0,189; 0,092; 0,087; 0,058$  e  $D=0,001$ ) apesar da distância geográfica (FIGURA 3; TABELA 3, 5 e 6).

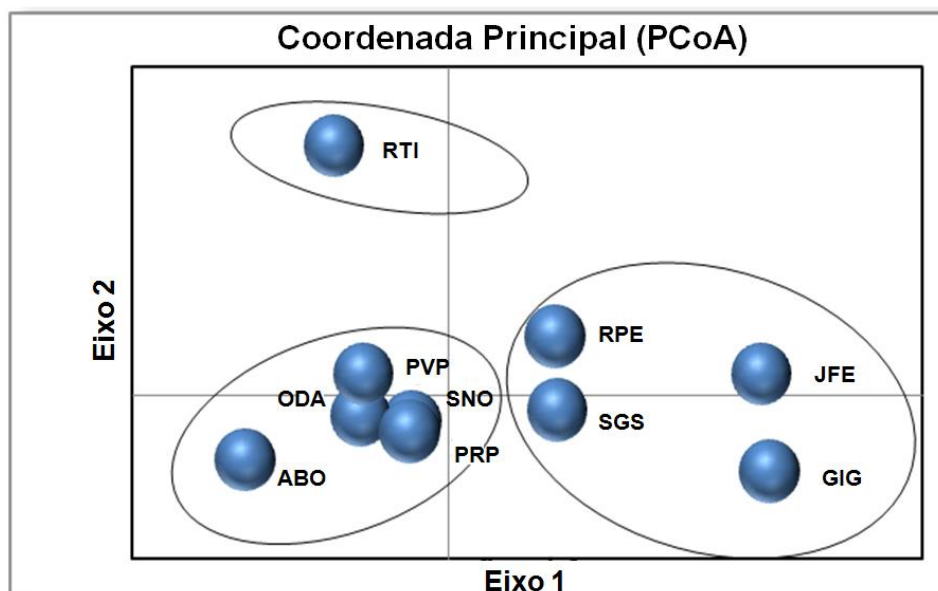
Tabela 6 - Padrão da distância genética entre os indivíduos de dez populações de ocorrência natural da *Lippia rotundifolia* baseado em marcadores ISSR. Análise de agrupamento pelo método de otimização de Tocher com base nas distâncias genéticas de Nei (1978).

SUBGRUPO	LOCAIS	< DISTÂNCIA	PONTO DE FUSÃO
1	7, 8, 9, 10	0,001	0,01
2	2, 5, 6, 4	0,004	0,012
3	1	0,004	0,018
4	3	0,005	0,030

Populações de *Lippia rotundifolia*: 1: Comunidade Gigante no município de Botumirim; 2: Rio do Peixe no município de Botumirim; 3: Rio Tigre no município de Gouveia; 4: Serra Geral no município de Joaquim Felício; 5: São Gonçalo do Rio das Pedras no distrito de Serro; 6: Comunidade Abóboras no município de Montes Claros; 7: Parque Estadual de Serra Nova; 8: APA de Olhos D'água; 9: Parque Estadual Veredas do Peruaçu; 10: Parque Estadual do Rio Preto.

A distribuição espacial representada pela análise da coordenada principal (PCoA) registrou a consistência do agrupamento obtido no dendrograma, indicando claramente os efeitos dos produtos da amplificação para cada indivíduo analisado (FIGURA 4). Nesta análise discriminante com base na distância de Nei, os autovalores foram explicados pelos dois primeiros eixos com mais de 80% da variância total entre as distâncias alélicas de todos os acessos. Os três primeiros eixos explicaram 91,06% da variação total das variáveis genéticas, em que estes foram retidos para explicar a distribuição espacial da *Lippia rotundifolia*. O primeiro eixo explicou 50,94%, com autovalores entre -0,044 10-PRP a 0,094 3-RTI. O segundo eixo explicou 30,92%, variando entre -0,030 9-PVP a 0,082 5-SGS e o terceiro eixo, contribuiu com autovalor da variação total de 9,21%, variando entre -0,032 2-RPE a 0,054 7-SNO respectivamente (TABELA 7).

Figura 4 - Análise da coordenada principal (PCoA) via matriz de covariância com dados padronizados baseado em marcadores ISSR para dez populações de ocorrência natural da *Lippia rotundifolia* em Minas Gerais, Brasil.



Populações de *Lippia rotundifolia*: GIG: Comunidade Gigante no município de Botumirim; RPE: Rio do Peixe no município de Botumirim; RTI: Rio Tigre no município de Gouveia; JFE: Serra Geral no município de Joaquim Felício; SGS: São Gonçalo do Rio das Pedras no distrito de Serro; ABO: Comunidade Abóboras no município de Montes Claros; SNO: Parque Estadual de Serra Nova; ODA: APA de Olhos D'água; PVP: Parque Estadual Veredas do Peruaçu; PRP: Parque Estadual do Rio Preto.

Tabela 7 - Resumo da variabilidade total da variância dos três primeiros eixos retidos pela análise da coordenada principal (PCOA) de dez populações de ocorrência natural da *Lippia rotundifolia* em Minas Gerais, Brasil.

Variância	Componentes Principais/Eixos		
	1	2	3
Variância absorvida (%)	50,94	30,92	9,21
Variância acumulada (%)	50,94	81,85	91,06
Variáveis (locais)	Autovetor		
1 - GIG	-0,042	-0,024	-0,015
2 - RPE	0,085	-0,007	-0,032
3 - RTI	0,094	0,034	0,001
4 - JFE	0,001	0,016	0,012
5 - SGS	-0,062	0,082	-0,007
6 - ABO	0,022	-0,012	0,025
7 - SNO	-0,004	-0,012	0,054
8 - ODA	-0,032	-0,008	-0,006
9 - PVP	-0,018	-0,030	-0,014
10 - PRP	-0,044	-0,028	-0,018

Populações de *Lippia rotundifolia*: GIG: Comunidade Gigante no município de Botumirim; RPE: Rio do Peixe no município de Botumirim; RTI: Rio Tigre no município de Gouveia; JFE: Serra Geral no município de Joaquim Felício; SGS: São Gonçalo do Rio das Pedras no distrito de Serro; ABO: Comunidade Abóboras no município de Montes Claros; SNO: Parque Estadual de Serra Nova; ODA: APA de Olhos D'água; PVP: Parque Estadual Veredas do Peruaçu; PRP: Parque Estadual do Rio Preto.

Esta análise também confirmou a população 3-RTI como a mais distante geneticamente e as populações 7-SNO, 8-ODA, 9-PVP e 10-PRP, as mais semelhantes geneticamente, bem como a distribuição espacial das populações 2-RPE, 5-SGS, 6-ABO, 1-GIG e 4-JFE com similaridade intermediária entre as distâncias genéticas (FIGURA 4). A distância genética da população 3-RTI apresentada nas análises de agrupamento corrobora o isolamento observado em campo, sendo esta população a única que apresentou um alelo privado. Esta análise é muito importante para desenvolver medidas de conservação deste



ambiente, pois segundo registro da espécie no Herbário Virtual da Flora e Fungo, esta população foi localizada há mais de 40 anos, em 1971 sob registro: MBM 18648 localizado como córrego do Tigre, Gouveia, Minas Gerais e, apesar do local apresentar poucos indivíduos conforme observação *in loco*, este ambiente encontra-se preservado e protegido de interferência antrópica por estar localizado em leito de rio, sob rodovia em curva sinuosa cujo acesso é dificultado.

Esta pesquisa é a primeira contribuição da diversidade genética para a *Lippia rotundifolia* com marcadores moleculares-ISSR visando determinar as relações alélicas entre as diferentes populações de ocorrência natural em Minas Gerais. A baixa diversidade genética observada pode ser explicada pela pequena densidade populacional, o que impossibilitou manter a amostragem com a mesma distância entre os indivíduos como amostrado para a *Lippia origanoides* (SÚAREZ; CASTILLO; CHACÓNS, 2008). Os autores reportaram que a amostragem entre os indivíduos equidistantes 1, 2 km, resulta em diferentes genótipos (VEGA-VELA; SÁNCHEZ, 2012). Além da pequena densidade populacional, os baixos índices de variabilidade genética também podem ser explicados pela temperatura, sendo este um fator crucial para a adaptação genotípica da planta. Estas informações são importantes para estabelecer medidas de conservação para a espécie. A iniciativa de construir o banco de germoplasma mesmo antes do conhecimento da estrutura genética contribuiu para preservar a diversidade ainda existente nesta espécie. Com isso, espera-se que a partir deste banco possam ser produzidas mudas para enriquecimento das populações naturais a fim de aumentar sua variabilidade genética.

#### **4 CONCLUSÃO**

A *Lippia rotundifolia* apresenta baixa variabilidade genética. O isolamento geográfico e a temperatura contribuem para a melhor distribuição alélica da espécie. A maior diversidade ocorreu na população de Rio Tigre cuja temperatura média anual é de 20 °C. Portanto, este genótipo é promissor para ser conservado e incluído em futuros programas de melhoramento genético.



## REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, S. et al. Efficiency of ISSR marker for characterization of *Cymbopogon* germplasms and their suitability in molecular barcoding. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 301, n. 1, p. 439-450, Jan. 2015.
- ANDROCIOLO, L. G. et al. Population genetic structure in *Phyla scaberrima* from Mexico and Colombia assessed by AFLP markers and implications for conservation. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirao Preto, v. 14, n. 4, p. 15697-15704, dez. 2015.
- BAI, C.; WEN, M.; ZHANG, L.; LI, G. Genetic diversity and sampling strategy of *Scutellaria baicalensis* germplasm resources based on ISSR. **Genetic Resourch and Crop Evolution**, Elmsford, v. 60, n. 5, p. 1673-1685, June 2013.
- BERTAN, I. et al. Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v. 12, n. 3, p. 279-286, jul./set. 2006.
- BHAWNA, M. Z. et al. Population structure and genetic diversity in bottle gourd [*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl.] germplasm from India assessed by ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, Amsterdam, v. 300, n. 4, p. 767-773, Apr. 2014.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 32, n. 3, p. 314-331, May 1980.
- BROWN, A. H. D.; WEIR, B. A. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). **Isozymes, plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 219-239.
- CARVALHO, F. et al. The mosaico of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot from arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 9-19, 2012.
- COLLEVATTI, R.G. et al. Spatial genetic structure and life history traits in cerrado tree species: inferences for conservation. **Natureza e Conservação**, Goiânia, v. 8, n. 1, p. 54-59, jul. 2010.

CONTE, R. et al. Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian. **Atlantic Forest**, London, v. 91, n. 4, p. 401-406, Oct. 2003.

COSTA, D. F. et al. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

CROW, J. F.; AOKI, K. Group selection for polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, n. 19, p. 6073-6077, Oct. 1984.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa: Editora da UFV, 1997. 390 p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Amsterdam, n. 12, p. 13-15, 1987.

DURIGAN, G. et al. **Manual para recuperação da vegetação de cerrado**. 3. ed. São Paulo: SMA, 2011. 19 p.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, London, v.131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FERNANDES, G. W. et al. Hail impact on leaves and endophytes of the endemic threatened. *Coccoloba cereifera* (Polygonaceae). **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 212, n. 10, p. 1687-1697, Oct. 2011.

\_\_\_\_\_. **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de pequi (Caryocar brasiliense (Camb.) no norte de Minas Gerais**. 2008. 65 p. Dissertação (Mestrado em Manejo Ambiental) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

FERREIRA, M. C.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP na análise genética**. Brasília: Embrapa, 1995. 220 p.

GASTAUER, M.; MESSIAS, M. C. B.; MEIRA NETO, J. A. Florística composition, species richness and diversity of campo rupestre vegetation from the Itacolomi State Park, Minas Gerais, Brazil. **Environment and Natural Resources Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 115-130, 2012.

GONÇALVES, A. C. et al. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 325-332, abr./jun. 2010.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 217 p.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F. do; CAMPOS, I. C. de. Soaring extinction threats to endemic plants in Brazilian metal-rich regions. **Ambio**, Stockholm, v. 40, n. 5, p. 540-543, July 2011.

MANICA-CATTANI, M. F. et al. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 2, p. 375-380, maio 2009.

MANLY, B. F. J. **Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology**. 2. ed. London: Chapman and Hall, 1997. 300 p.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Chicago, v. 27, n. 2, p. 209-220, Feb. 1967.

MARTENS, L. A. **Flores da Serra da Calçada**. Belo Horizonte: Editora da UFMG, 2008. 478 p.

MARTÍNEZ-NATARÉN, D. A. et al. Genetic diversity and genetic structure in wild populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) and its relationship with the chemical composition of the essential oil. **Plant Systematic and Evolution**, New York, v. 300, n. 3, p. 535-547, Mar. 2014.

MELO JUNIOR, A. F. et al. Spatial genetic structure in natural populations of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) in the North of Minas Gerais, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 43, p. 205-209, Aug. 2012.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, Dec. 1973.

\_\_\_\_\_. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Austin, v. 89, n. 3, p. 583-590, July 1978.

\_\_\_\_\_. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**, Oxford, v. 106, n. 949, p. 283-292, May/June 1972.

NELSON, J. C. **ITMI wheat mapping workshopping**: laboratory manual. Ithaca: Cornell University, 1993.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraespecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 1143-1155, May 2004.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, Oct. 2012.

PIERRE, P. M. O. **Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br (Verbenaceae)**. 2004. 80 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

PIMENTA, M. R. et al. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 211-220, 2007.

PRAÇA-FONTES, M. M.; VICCINI, L. F. Estudo meiótico e viabilidade do pólen de três espécies de *Lippia* (verbenaceae) da Cadeia do Espinhaço-MG. **Revista Univap**, Paraíba, v. 13, n. 24, 2006. Disponível em: <[http://www.univap.br/univap/pro\\_reitorias/int\\_uni\\_soc/revista/RevistaUni](http://www.univap.br/univap/pro_reitorias/int_uni_soc/revista/RevistaUni)>. Acesso em: 21 jun. 2016.

RAPINI, A. et al. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 4, n. 1/2, p. 15-23, dez. 2008.

RESENDE, C. F. et al. In vitro propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 3, p. 582-589, jul./set. 2015.

ROCHA, D. S. et al. Development of a novel set of microsatellite markers for *Lippia alba* (Verbenaceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 971-974, fev. 2015.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.11**. New York: Applied Biostatistics, 2000. Disponível em <<http://www.ExeterSoftware.com>>. Acesso em: 15 set. 2010.

SALIMENA, F. R.; SILVA, T. R. S. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais, Verbenaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 119-120, 2009.

SAMPAIO, F. **Hipóteses filogenéticas de espécies sul americanas do gênero *Lippia* Spp. (Verbenaceae) com base em sequências nucleotídicas**. 2009. 78 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biotecnologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

SEBBENN, A. M. et al. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, London, v. 106, n. 1, p. 134-145, Jan. 2011.

SILVA, B. M. et al. Diversidade genética estimada com marcadores entre sequências simples repetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 1, p. 108-113, jan. 2016.

SMOUSE, P. E.; WHITEHEAD, M. R.; PEAKALL, R. An informational diversity framework, illustrated with sexually deceptive orchids in early stages of speciation. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 15, n. 16, p. 1375-1384, Nov. 2015.

SOUSA, S. M. et al. Relationship between pollen morphology and chromosome numbers in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 147-157, mar. 2013.

SOUSA, S. M.; TORRES, G.; VICCINI, L. F. Karyological studies in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 4, p. 1029-1037, dez. 2012.

SUÁREZ, G. A.; CASTILLO, G.; CHACÓN, S. M. I. Genetic diversity and spatial genetic structure within a population of an aromatic shrub, *Lippia*



*origanoides* (Verbenaceae), in the Chicamocha Canyon, northeastern Colombia. **Genetics Research**, Cambridge, v. 90, n. 6, p. 455-465, Dec. 2008.

TELLES, M. P. C. et al. Development and characterization of new microsatellites for *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirao Preto, v. 12, n. 3, p. 3124-3127, 2013.

\_\_\_\_\_. Estrutura genética em populações naturais de *Tibouchina papyrus* (pau-papel) em áreas de campo rupestre no cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 291-300, abr./jun. 2010.

TRINDADE, H. Molecular biology of aromatic plants and spices, a review. **Flavor Fragrance of Journal**, Amsterdam, v. 25, p. 272-281, Aug. 2010.

VARGAS-MENDOZA, C. F.; ORTEGÓN-CAMPOS, I. G.; CALVO-IRABIÉN, L. M. Natural selection under contrasting ecological conditions in the aromatic plant *Lippia graveolens* (H.B.K., Verbenaceae). **Plant Systematic and Evolution**, Amsterdam, v. 302, n. 3, p. 275-289, Mar. 2016.

VEGA-VELA, N. E.; SÁNCHEZ, M. I. C. Genetic structure along an altitudinal gradient in *Lippia origanoide*, a promising aromatic plant species restricted to semiarid areas in northern South America. **Ecology and Evolution**, Oxford, v. 2, n. 11, p. 2669-2681, Nov. 2012.

VICCINI, L. F. et al. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematic and Evolution**, New York, n. 1, v. 256, p. 171-178, Nov. 2005.

\_\_\_\_\_. Chromosome numbers in the genus *Lippia*. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 256, n. 1, p. 171-178, Nov. 2006.

\_\_\_\_\_. Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD Markers. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 246, n. 1, p.1-8, Apr. 2004.

WRIGTH, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, p. 323-354, Jan. 1951.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC. utilizando marcadores RAPD e SSR.** 2002. 130 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

**ARTIGO 3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS VOLÁTEIS DE *Lippia rotundifolia* CHAM. (VERBENACEAE) EM MINAS GERAIS, BRASIL**

**CHEMICAL COMPOSITION OF THE VOLATILE OF *LIPPIA ROTUNDIFOLIA* CHAM. (VERBENACEAE) IN MINAS GERAIS, BRAZIL**

Messulan Rodrigues Meira  
Ernane Ronie Martins  
Francine Souza Alves da Fonseca

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM A NBR 6022 (ABNT, 2003).**

## RESUMO

*Lippia rotundifolia* Cham. é uma espécie aromática, arbustiva de 0,5 a 2 m de altura, nativa e endêmica dos campos rupestres, onde estão isoladas por pequenas serras. Devido à dificuldade com a identificação botânica e o acesso às populações nativas, pouco se sabe sobre a sua composição química. Dentro do exposto, objetivou-se analisar os voláteis liberados das folhas de chá-de-pedestre (*Lippia rotundifolia* Cham.) de ocorrência natural em onze populações do Estado de Minas Gerais. O material para análise química foi obtido a partir dos acessos do banco ativo de germoplasma cultivados em casa de vegetação no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG). Os acessos foram: Parque Estadual de Serra Nova (SNO); Parque Estadual Veredas do Peruaçu (PVP); Comunidade Abóboras (ABO); Comunidade Gigante (GIG); Margens do Rio do Peixe (RPE); APP de Olhos d'água (ODA); Propriedade Particular em Joaquim Felício (JFE); Parque Estadual do Rio Preto (PRP); São Gonçalo do Rio das Pedras (SGS), Córrego do Rio Tigre (RTI) e Santana do Riacho (SRI). As amostras foram coletadas em *headspace* estático e analisadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (HE-CG-EM). Foram detectados 67 compostos. O maior número de voláteis detectado foi no acesso SGS, com 40 compostos, enquanto que no acesso SRI, foi detectado apenas 5 compostos. Os voláteis mirceno,  $\beta$ -linalol e cariofileno, foram detectados na maioria dos acessos. Conclui-se que, os voláteis mais abundantes mirceno,  $\beta$ -linalol,  $\alpha$ -pineno, limoneno, tagetona e germacreno são a base dos seis quimiotipos da espécie.

**Palavras-chave:** Composição química. Headspace estático. Chá-de-pedestre. Planta medicinal.

### ABSTRACT

*Lippia rotundifolia* is an aromatic species, shrubby 0.5 to 2 m height. Is a native and endemic of rocky fields, which are isolated by small mountains. Because of the difficulty with the botanical identification to access to native populations, little is known about their chemical composition. We aimed to analyze the volatiles released from the pedestrian tea leaves (*Lippia rotundifolia* Cham.) naturally occurring in eleven populations of Minas Gerais States. The material for chemical analysis was obtained from the access of active germplasm bank cultivated in a greenhouse at the Instituto de Ciências agrárias of the Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG). The accessions were: Parque Estadual de Serra Nova (SNO); Parque Estadual Veredas do Peruçu (PVP); Comunidade Abóbora (ABO); Comunidade Gigante (GIG); edge of Rio do Peixe (RPE); preservation area of Olhos D'água (ODA); private property in Joaquim Felício (JFE); Parque Estadual do Rio Preto (PRP); São Gonçalo do Rio das Pedras (SGS); edge of Rio Tigre (RTI) and Santana do Riacho (SRI). The samples were collected in static headspace and analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (SH-GC-SM). An amount of sixty-seven compounds were detected. The more volatile was detected in the SGS access, with forty compounds, whereas the SRI access was detected only five compounds. Volatile myrcene,  $\beta$ -linalool and caryophyllene were detected in the majority of accesses. We concluded that volatiles myrcene,  $\beta$ -linalool,  $\alpha$ -pinene, limonene, tagetone and germacrene are the six chemotypes of the species.

**Keywords:** Chemical Diversity. Volatile compounds. Pedestrian tea. Medicinal plant.



## 1 INTRODUÇÃO

O Cerrado concentra uma das maiores taxas de endemismo da flora brasileira. Com aproximadamente 30% da vegetação local intacta, é considerado um dos *hotspot* para conservação (GASTAUER; MESSIAS; MEIRA NETO, 2012). Em Minas Gerais estes ambientes estão localizados em campo rupestre, uma das fitofisionomias do Cerrado brasileiro. Os campos rupestres são caracterizados por altitudes superiores a 800 m, xeromorfismo e presença de afloramentos rochosos (DURIGAN et al., 2011; RAPINI, et al., 2008).

Na composição florística desta fitofisionomia, há predomínio de espécies da família Verbenaceae. O gênero *Lippia* Linn. é o segundo maior desta família, pois concentra a maioria das espécies endêmicas nessas altitudes (CARVALHO et al., 2012; FERNANDES et al., 2011; JACOBI; CARMO; CAMPOS, 2011; SOUSA; TORRES; VICCINI, 2012). Dentre as espécies endêmicas dos campos rupestres está a *Lippia rotundifolia* Cham. (PIMENTA et al., 2007; SAMPAIO, 2009; SOUSA et al., 2013), conhecida popularmente como chá-de-pedestre. É um arbusto de 0,5 a 2 m de altura (SALIMENA; SILVA, 2009), de populações restritas e com poucos indivíduos (MARTENS, 2008; VICINI et al., 2004). Suas flores são agrupadas em grandes cachos variando entre rosa-lilás a magenta ou falso rosa (SALIMENA; SILVA, 2009; SAMPAIO, 2009).

No ambiente natural, a *Lippia rotundifolia* é confundida com outras do mesmo gênero devido à grande semelhança morfológica e sincronismo reprodutivo, dificultando sua identificação (PRAÇA-FONTES; VICCINI, 2006). Por esse motivo, estudos da composição química de espécies nativas são escassos devido à dificuldade de informações botânicas bem como a obtenção de material vegetal para análise (SALIMENA; MULGURA, 2015; SOUSA et al., 2013).

Esta planta é aromática e produz compostos voláteis como produto do metabolismo secundário os quais são liberados pelas folhas e flores. Estudos de óleos essenciais reportam os constituintes mircenal (22,3%), limoneno (26%) e o  $\beta$ -linalol (62,5%) como majoritários (LEITÃO, 2008; SILVA, 2013). O método de obtenção dos compostos químicos por hidrodestilação é o mais comum e amplamente utilizado (COUNCIL OF EUROPE EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2010). A obtenção da fração volátil, fragrância exalada, é estabelecida pelo equilíbrio entre a planta e a sua fase de vapor, porém não se tem registro de estudos da fração volátil para esta espécie. O método de extração de voláteis por *headspace* é o mais adequado para estudos destas fragrâncias, pois este método permite obter a composição do genuíno odor do vegetal (STASHENKO; PUERTAS; MARTÍNEZ, 2002).

Portanto o conhecimento do perfil químico a partir de estudo dos compostos voláteis desta espécie é importante na contribuição sistemática e botânica. Além de distinguir quimiotipos de interesse comercial que mereçam sere mantidos no ambiente natural, visando à conservação de seus recursos genéticos existentes (STASHENKO; PUERTAS; MARTÍNEZ, 2002). Devido ao potencial aromático da espécie, objetivou-se com esta pesquisa analisar a composição química da fração volátil presente nas folhas da *Lippia rotundifolia* em onze populações de ocorrência natural em Minas Gerais, Brasil.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção das amostras**

As amostras de *Lippia rotundifolia* foram coletadas em 11 populações de ocorrência natural no estado de Minas Gerais. Os exemplares foram enviados para identificação por especialistas e cultivados em casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG). A localização e características climáticas de cada acesso estão apresentadas na Tabela 1.



Tabela 1 - Localização de onze áreas de ocorrência natural de *Lippia rotundifolia* em Minas Gerais, Brasil.

Código	Município	Coordenadas		Condições Climáticas			Depósito Herbário
		Latitude	Longitude	Alt. (m)	Umid. (mm)	Temp. (C°)	
PVP – Cônego Marinho		-14°55'S	-44°38'W	729	700	23±1	PAMG 58090
SNO – Rio Pardo de Minas		-15°36'S	-42°44'W	790	700	20±1	PAMG 58096
ABO – Montes Claros		-16°56'S	-43°55'W	700	1100	22,5±1	PAMG 58101
GIG – Botumirim		-16°35'S	-42°55'W	726	1350	22,5±2	PAMG 58097
RPE – Botumirim		-16°52'S	-43°28'W	722	1100	22,5±2	PAMG 58094
ODA – Olhos D'água		-17°26'S	-43°37'W	691	1100	22,5±2	PAMG 58094
JFE – Joaquim Felício		-17°44'S	-44°11'W	1010	1350	22,5±3	PAMG58093
PRP – São Gonçalo do Rio Preto		-18°06'S	-43°20'W	901	1350	< 19	PAMG 58091
SGS – Serro		-18°25'S	-43°28'W	1020	1350	18±2	PAMG 58100
RTI – Gouveia		-18°33'S	-43°49'W	1020	1350	20±2	PAMG 58092
SRI - Lapinha		-19°16'S	-43°37'W	756	>1500	20±2	PAMG 58099

SNO: Parque Estadual de Serra Nova; PVP: Parque Estadual Veredas do Peruaçu; ABO: Comunidade Abóboras; GIG: Comunidade Gigante; RPE: Margens do Rio do Peixe; ODA: APP de Olhos d'água; JFE: Propriedade Particular em Joaquim Felício; PRP: Parque Estadual do Rio Preto; SGS: São Gonçalo do Rio das Pedras; RTI: Córrego do Rio Tigre; SRI: Santana do Riacho. Alt.: Altitude em metros; Umid.: Precipitação média anual em milímetros; Temp.: Temperatura média anual em graus

As amostras foram retiradas do meristema apical e primórdios foliares de três indivíduos de cada local de ocorrência da espécie às 7 horas da manhã. Essas foram pesadas em balança analítica resultando em aproximadamente 1,5 g; as quais foram transferidas para *vials* de 20 mL previamente aclimatizados por 1 hora em freezer a -20 °C. Na sequência, o material fresco identificado foi vedado com septo de silicone/PTFE e transportado em caixa de isopor com gelo até o Laboratório de Química Analítica do ICA/UFMG.

## **2.2 Extração de voláteis e análise cromatográfica por *headspace* estático (HS CG-EM)**

A extração dos voláteis foi por *headspace* estático utilizando sistema de amostrador automático (HS Combi-PAL). Cada amostra foi homogeneizada a 500 rpm e incubada a 75 °C por 5 minutos e imediatamente analisada HS-CG-EM. Após esse período, um volume de 1.000 µL da amostra, em fase de vapor, foi injetado em modo *splitless* com seringa *gastight* 2,5 mL-HS. em uma velocidade de injeção de 500 µL/s na temperatura de 220 °C.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás da Agilent® 7890A acoplado ao espectrômetro de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 MS (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) com fase estacionária de 5% fenil e 95% polimetilsiloxano (30 m comprimento x 250 µm diâmetro interno x 0,25 µm espessura do filme interno) (CALIFÓRNIA, EUA). O hélio (99,9995% de pureza) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

A rampa de aquecimento iniciou a 35 °C, mantendo-se em condição isotérmica por 2 min, com incremento de 3 °C.min<sup>-1</sup> até 150 °C, mantendo por 10 min e finalizando a 300 °C por um minuto. As temperaturas do injetor e da linha de transferência para o EM foram mantidas em 220 °C e 240 °C

respectivamente. O espectrômetro de massa foi operado por ionização de impacto de elétrons (70 eV) em uma faixa de 35-550  $m/z$  (ANEXO 1).

As concentrações dos constituintes da análise química foram expressas pela porcentagem de área relativa dos sinais do cromatograma total de íons  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). A identificação de cada constituinte foi por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca (NIST/EPA/NHI (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação proposta por Van Den Dool e Kratz (1963) e, para as atribuições, foram consultados os índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007).

### **2.3 Análise estatística multivariada**

A análise de agrupamento foi realizada usando dois métodos, o de agrupamento por pares de vizinhos mais próximos (UPGMA) e o agrupamento pelo escalonamento não métrico (MDS).

Para a análise de agrupamento, os dados foram arranjados em uma matriz binária de presença e ausência dos voláteis identificados. Este agrupamento foi baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard ( $j$ ) e distância Euclidiana entre os compostos, adotando a Rotinha SAHN (*Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested Clustering*). Para o agrupamento pelo método de escalonamento multidimensional não métrico, os dados foram arranjados em uma matriz consistindo do percentual de área relativa de cada composto identificado nas colunas e dos locais de ocorrência da espécie nas linhas. Esta matriz foi autoajustada a partir do uso da medida de Stress (Standardized Residual Sum of Squares) aplicando a fórmula:

$$\text{Stress (q)} = \left[ \frac{\sum \sum (d_{ik} - d_{ik}^q)^2}{\sum_{i < k} \sum (d_{ik})^2} \right]^{1/2}$$

Em que os coeficientes  $d_{ik}^q$  representam as distâncias entre os locais e os compostos nas novas dimensões e  $d_{ik}$  as distâncias originais entre os locais e os compostos. Este coeficiente indica o quanto a ordenação dos dados das novas dimensões está de acordo com a ordenação dos valores originais. A significância deste agrupamento foi obtida a partir do ajuste do modelo de regressão linear simples entre as variáveis originais e ajustadas (MINGOTI, 2007).

Para maior eficiência nos resultados, os dados foram submetidos à análise de componente principal (ACP). Todas as análises de estatística multivariada foram realizadas com o auxílio do programa Ntsys PC. 2.11 (ROHLF, 2000).



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise química pelo método HS-CG-EM, foram obtidos 123 picos e destes foram detectados 67. Dos compostos detectados, dez não foram identificados. Os percentuais dos voláteis estão expressos em área relativa do pico para cada analito na Tabela 2. Este valor foi superior ao reportado por Silva (2013) que identificou apenas 17 compostos para a *Lippia rotundifolia* (TABELA 2). Leitão (2008) identificaram 108 compostos nas folhas e 54 nas flores. Dos compostos identificados pelos autores, 18 foram identificados no presente estudo, sendo que alguns se apresentaram como isômeros. A composição química dos voláteis da planta foi muito variada, tanto em composição quanto em percentual de um local para outro. Quanto às classes químicas, em cinco populações (GIG, RPE, RTI, SGS, PRP), houve predomínio de monoterpenos, variando de 42,4% em RPE a 61% em RTI e nas outras seis populações (JFE, ABO, SRI, SNO, ODA, PVP), houve exclusividade sesquiterpênica, com 43,7% em ABO a 65,5% em JFE, respectivamente (TABELA 2). Este percentual foi superior aos resultados obtidos em estudos anteriores com óleos essenciais para a mesma espécie, em que os monoterpenos foram predominantes, com 52,5%, mesmo considerando a perda da fração mais volátil pelo método (LEITÃO, 2008; SILVA, 2013). Portanto, a *Lippia rotundifolia* possui quimiotipos mono e sesquiterpênicos. Diferente de outras espécies do gênero, como *Lippia citriodora* e *Lippia origanoides* que, em mais de 50% dos voláteis (59,54% e 31,4 a 95,3%) há predomínio de monoterpenos (MESHKATALSADAT; PAPZA; ABDOLLAHI, 2010; VEGA-VELA; DELGADO-ÁVILA; CHACÓN-SÁNCHEZ, 2013).

Tabela 2 - Composição química dos voláteis de *Lippia rotundifolia* em onze populações de ocorrência natural em Minas Gerais, Brasil.

(Continua)

N°	Compostos	IR <sub>Lit.</sub>	Locais de Coleta											
			GIG	RPE	JFE	RTI	SGS	ABO	SRI	SNO	ODA	PVP	PRP	
1	hexanal	801	0,4	9,6	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	2-hexenal	854	0,3	1,5	6,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	3-hexen-1-ol	857	0,2	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	$\alpha$ -tujeno	924	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	0,7
5	$\alpha$ -pineno	939	2,3	7,7	1,6	4,3	-	1,9	-	15,7	1,6	0,4	0,2	-
6	<b>desconhecido</b>	-	-	4,1	1,7	4,0	-	3,6	-	-	1,3	-	-	-
7	canfeno	946	0,1	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	sabineno	969	0,4	5,7	-	1,7	0,3	0,1	7,8	2,0	1,0	-	2,9	-
9	$\beta$ -pineno	974	2,4	7,5	1,5	4,5	0,5	1,4	-	-	1,7	0,4	3,0	-
10	1-octen-3-ol	974	0,1	0,3	-	-	0,6	-	-	-	-	0,3	0,4	-
11	mirreno	991	30,5	14,5	13,5	15,3	3,6	10,7	-	1,5	26,9	-	2,2	-
12	$\alpha$ -felandreno	1005	5,0	3,6	-	-	5,9	-	-	15,5	11,3	0,6	2,6	-
13	o-cimeno	1022	-	1,7	-	-	-	-	-	2,49	-	-	-	-
14	m-cimeno	1026	4,4	1,4	-	-	0,4	-	-	-	1,4	-	0,4	-
15	limoneno	1027	5,7	2,8	-	14,6	2,5	28,6	-	2,7	6,4	0,3	2,5	-
16	z-ocimeno	1032	0,6	1,0	-	-	-	-	-	-	0,3	-	0,2	-
17	$\beta$ -ocimeno	1044	4,3	2,4	-	7,4	1,8	-	-	1,1	4,7	0,4	1,3	-
18	$\gamma$ -terpineno	1054	2,7	-	-	5,9	-	-	-	-	-	-	-	-
19	óxido de linalil	1067	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	0,3	-
20	terpinoleno	1086	0,2	-	-	-	5,0	-	-	-	-	-	0,4	-
21	<b>desconhecido</b>	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-
22	$\beta$ -linalool	1098	3,6	2,8	13,3	1,4	7,7	17,7	33,7	5,0	1,9	-	18,3	-
23	1,3,8-p-mentatrieno	1110	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	1,0	-
24	<b>desconhecido</b>	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	2,9	-
25	cosmeno	1130	0,1	-	0,6	-	1,1	-	-	-	0,2	-	0,5	-
26	tagetona	1139	-	-	-	-	18,0	-	-	-	-	-	-	-
27	pinocarvona	1164	0,4	-	-	1,8	0,4	-	-	0,7	-	-	-	-
28	<b>desconhecido</b>	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	borneol	1165	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	<b>desconhecido</b>	-	0,2	0,8	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-
31	butanoato-(Z)-3-hexenila	1186	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	0,2	-
32	$\alpha$ -terpineol	1186	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
33	butanoato-2-hexenila	1191	-	-	-	-	3,5	-	-	-	-	-	0,1	-
34	mirtenal	1195	0,6	-	-	8,8	-	-	-	-	-	-	-	-
35	mirtenol	1196	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	<b>desconhecido</b>	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
37	p-menta-1,8-dien-3-ona	1285	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-
38	tridecane	1300	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
39	acetato mirtenil	1324	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	$\delta$ -elemeno	1335	0,1	0,8	0,4	-	0,4	-	-	8,0	-	2,1	0,8	-
41	$\alpha$ -cubebeno	1351	0,2	0,7	0,2	-	0,8	-	-	0,6	1,0	-	1,2	-
42	2-metil-tridecano	1365	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	$\alpha$ -copaeno	1376	0,2	0,6	2,0	1,5	0,8	1,1	10,0	0,6	0,5	-	3,0	-
44	$\beta$ -cubebeno	1387	-	0,7	1,3	2,0	0,5	0,7	-	-	3,6	-	-	-
45	$\beta$ -elemeno	1390	3,6	-	8,1	1,8	-	-	-	-	-	17,2	3,0	-

Tabela 2 - Composição química dos voláteis de *Lippia rotundifolia* em onze populações de ocorrência natural em Minas Gerais, Brasil.

(Conclusão)

N°	Compostos	IR <sub>Lit.</sub>	Locais de Coleta										
			GIG	RPE	JFE	RTI	SGS	ABO	SRI	SNO	ODA	PVP	PRP
46	desconhecido	-	-	1,7	2,6	-	1,0	-	-	-	4,4	-	-
47	$\alpha$ -gurjuneno	1409	0,2	1,00	0,2	-	1,0	-	-	0,6	0,2	-	0,4
48	$\alpha$ -cedreno	1413	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
49	cariofileno	1418	3,6	3,8	4,6	3,7	4,1	4,6	24,0	13,0	3,9	14,1	6,7
50	$\beta$ -cedreno	1419	-	-	0,3	-	0,2	-	-	-	-	-	-
51	$\gamma$ -elemeno	1434	-	-	0,7	-	-	-	-	5,8	-	3,0	0,1
52	$\alpha$ -bergamoteno	1436	-	5,6	0,3	-	1,0	-	-	-	4,4	-	-
53	desconhecido	-	0,2	0,9	-	-	-	-	-	0,6	-	-	0,2
54	$\alpha$ -humuleno	1454	0,5	-	0,9	-	0,6	0,1	-	2,0	0,7	1,2	0,2
55	aloaromadendreno	1460	0,2	1,4	0,3	-	0,2	0,1	-	0,6	0,3	1,2	0,8
56	$\gamma$ -muuroleno	1477	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
57	germacreno	1484	1,6	6,6	2,3	0,9	4,0	8,3	24,4	-	5,8	21,5	13,7
58	$\beta$ -selinene	1489	0,8	-	-	-	-	-	-	0,6	0,4	-	0,1
59	eremofileno	1491	-	-	0,32	-	-	-	-	-	-	-	-
60	$\alpha$ -selineno	1498	3,9	2,8	5,4	-	4,3	1,0	-	1,2	3,2	13,8	11,8
61	$\alpha$ -muuroleno	1500	-	-	0,2	-	0,6	-	-	-	-	-	0,3
62	$\alpha$ -himachaleno	1516	2,1	1,9	2,0	-	1,4	-	-	0,6	2,0	-	-
63	calameneno	1528	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-	-	0,4
64	desconhecido	-	-	-	1,2	-	0,1	0,8	-	-	0,2	-	-
65	cadina-1,4-dieno	1533	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
66	desconhecido	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	3,9
67	denderalasin	1571	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Hidrocarbono Monoterpeno</i>		34,2	36,4	13,7	44,0	25,0	31,2	20,0	33,3	37,0	42,9	37,1
	<i>Monoterpeno Oxigenado</i>		13,1	6,0	0,3	17,0	20,0	6,3	20,0	9,5	3,7	0,0	11,4
	<i>Hidrocarbono Sesquiterpeno</i>		34,2	33,3	65,5	27,8	37,5	43,7	60,0	52,4	48,1	57,1	40,0
	<i>Sesquiterpeno Oxigenado</i>		0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Desconhecidos</i>		7,9	12,1	10,3	11,1	15	12,5	0,0	4,8	11	0,0	8,6
	<i>Outros</i>		10,5	9,0	6,8	0,0	2,5	6,3	0,0	0,0	0,0	0,0	2,9
	<i>Total</i>		100,0	99,8	99,9	100,1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,1

GIG: Comunidade Gigante no município de Botumirim; RPE: Rio do Peixe no município de Botumirim; JFE: Serra Geral no município de Joaquim Felício; RTI: Rio Tigre no município de Gouveia; SGS: São Gonçalo do Rio das Pedras no distrito de Serro; ABO: Comunidade Abóboras no município de Montes Claros; SRI: Santana do Riacho município de Lapinha; SNO: Parque Estadual de Serra Nova; ODA: APA de Olhos D'água; PVP: Parque Estadual Veredas do Peruaçu e PRP: Parque Estadual do Rio Preto.

IR: Índice de Retenção da literatura

(-): Composto não detectado.

Desconhecido (6): 137(1), 121(14), 93(100), 91(40), 77(25); Desconhecido (21): 153(2), 134(45), 119(92), 110(38), 91(100); Desconhecido (24): 136(1), 134(59), 119(100), 91(93), 77(33); Desconhecido (28): 137(2), 119(23), 93(28), 69(100), 41(66); Desconhecido (30): 69 (100), 95(52), 83(99), 55(89), 41(47); Desconhecido (36): 151(5), 135(100), 91(28), 77(14), 67(11); Desconhecido (46): 204(2), 119(100), 105(21), 93(87), 91(39); Desconhecido (53): 204(28), 161(100), 119(44), 105(60), 81(22); Desconhecido (64): 204(24), 161(100), 119(21), 107(44), 105(27); Desconhecido (66): 218(1), 161(26), 69(100), 43(11), 41(31).



Os compostos químicos identificados foram bem distribuídos entre os indivíduos analisados para os onze ambientes. A composição química variou tanto no número de compostos voláteis bem como no percentual de área relativa do cromatograma total de cada acesso. Os resultados obtidos mostraram o quanto os acessos são heterogêneos em relação à produção destes voláteis. Dos 67 compostos detectados, dez se destacaram em maior produção. Os compostos de maior abrangência foram:  $\alpha$ -pineno, mirceno,  $\alpha$ -felandreno, limoneno,  $\beta$ -linalol, tagetona,  $\beta$ -elemeno, cariofileno, germacreno e  $\alpha$ -selineno. Destes compostos, o  $\beta$ -elemeno, cariofileno e o  $\alpha$ -selineno se destacaram na produção em duas populações, os demais se destacaram como majoritários para todos os acessos em relação ao percentual da área relativa do pico.

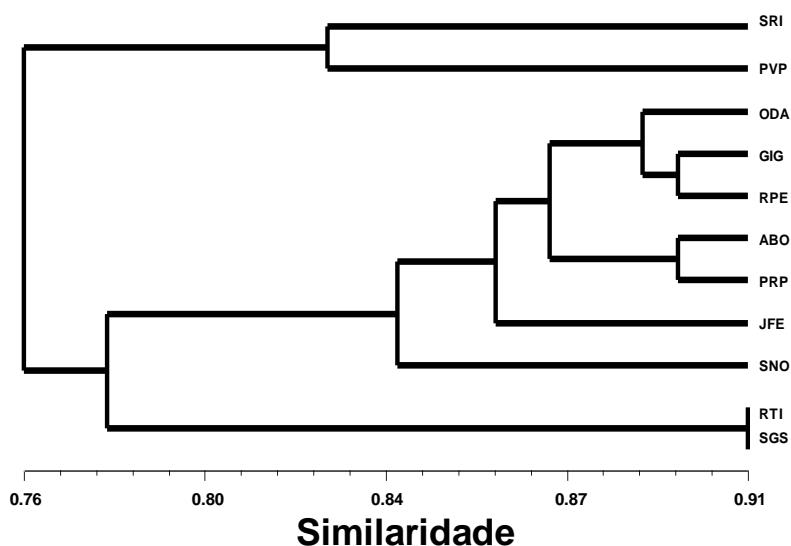
Os quimiotipos identificados no presente estudo foram o mirceno (11) que se destacou como majoritário em cinco populações: (GIG 30,5%), (RPE 14,5%), (JFE 13,5%), (ODA 26,9%) e (RTI 15,3%), o linalol (22), foi o majoritário em dois acessos, (PRP 18,3%) e (SRI 33,7%), sendo estes percentuais inferiores ao obtido por Silva (2013) que registrou 62,6% de linalol para o acesso coletado na reserva do CPAC no Distrito Federal. Porém, Leitão (2008) não registrou produção deste composto no acesso coletado em Diamantina (Vale Jequitinhonha). O  $\alpha$ -pineno (5) foi o marcador de SNO com 15,7% e o limoneno (15) em ABO (28,6%), em que a obtenção deste último composto foi superior ao reportado por Leitão (2008) que obteve 8,26% para a mesma espécie. Percentuais inferiores também foram obtidos por hidrodestilação para a *Lippia thymoides* Mart.; Shauer, com teores entre 1,67 e 3,75% e por *headspace* para a *Lippia citriodora* kunth e *Lippia alba* Mill. com 13,4% e 4,7% respectivamente (MESHKATALSADAT; PAPZA; ABDOLLAHI, 2010; PARRA-GARCÉS et al., 2010; SILVA, 2012).

O monoterpeno tagetona (26) 18%, ocorreu exclusivamente no acesso SGS, sendo a primeira vez reportado para a espécie. Este composto foi

observado na *Lippia javanica* (Burm.f.) Spreng. em concentrações variando de 0,3 até 4,93% (VILJOEN, 2005). Na *Lippia triplinervis*, Gardner obteve a forma isomérica (Z) que também variou com a sazonalidade, com 0,1% no mês de abril e 19,4% no mês de setembro (LEITÃO et al., 2011). O isômero (Z) também foi reportado em pequena quantidade na *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer com 0,5% (LEITÃO, 2008). Os principais voláteis obtidos no presente estudo divergiram dos compostos apresentados pelo autor, em que reportou o mirtenal como majoritário da *Lippia rotundifolia*, com produção de 16,7%. Na análise, este composto foi registrado em pequenas concentrações apenas em dois acessos, (GIG 0,6%) e (RTI 8,8%). Porém, Silva (2013) não registrou a sua produção no acesso da reserva CPAC, assim como os compostos e-nerolidol e espatulenol, reportado pelo autor como produzido pela espécie, não foram registrados em nenhum dos 11 acessos analisados.

O polimorfismo químico existente na espécie é confirmado pelo agrupamento dos ambientes em função da produção dos voláteis. O dendrograma pelo método UPGMA agrupou os acessos em três grupos (FIGURA 1).

Figura 1 - Análise de agrupamento pelo método UPGMA dos acessos de *Lippia rotundifolia* Cham. originados de onze populações de ocorrência natural em Minas Gerais, Brasil.



SRI: Santana do Riacho município de Lapinha; PVP: Parque Estadual Veredas do Peruaçu; ODA: APA de Olhos D'água; GIG: Comunidade Gigante no município de Botumirim; RPE: Rio do Peixe no município de Botumirim; ABO: Comunidade Abóboras no município de Montes Claros; PRP: Parque Estadual do Rio Preto; JFE: Serra Geral no município de Joaquim Felício; SNO: Parque Estadual de Serra Nova; RTI: Rio Tigre no município de Gouveia e SGS: São Gonçalo do Rio das Pedras no distrito de Serro.

O primeiro grupo é formado pelos acessos SRI e PVP, embora detenha marcadores químicos diferentes, apresentam a maior produção de cariofileno (49), (SRI=24% e PVP=14,1%), cujos percentuais foram superiores ao reportado na literatura para o acesso de Diamantina (7,9%) e da reserva CPAC (4,1%) (LEITÃO, 2008; SILVA, 2013). Outro composto destaque para esses dois acessos foi o germacreno em SRI, marcador secundário com (57=24,4%) e em PVP foi o majoritário com (57=21,5%). Estes valores foram considerados altos em relação ao percentual reportado para a *Lippia thymoides*, na qual obteve

produção máxima de 6,18% no inverno (SILVA, 2012). Os compostos  $\beta$ -elemeno (45=17,2%) e  $\alpha$ -selineno em PVP (60=13, 8%) foram os constituintes secundários. O  $\beta$ -elemeno, embora não tenha sido majoritário em nenhum acesso, foi superior ao percentual reportado na literatura para o acesso de Diamantina (10,9%) (LEITÃO, 2008). Além dessas características, as plantas desses ambientes foram as que produziram menor quantidade de compostos voláteis (n= 5 e 14) e são os dois acessos mais distantes geograficamente (TABELA 2; FIGURA 1).

O segundo grupo foi formado pelos acessos ODA, GIG, RPE, ABO, PRP, JFE e SNO. Nestes ambientes, os indivíduos analisados produzem os mesmos voláteis mirceno, limoneno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -linalol como majoritários e secundários respectivamente. Porém o acesso JFE não produziu limoneno e  $\beta$ -ocimeno (15 a 17), assim como SNO não produziu germacreno (57), sendo esta a principal diferença química observada entre os sete acessos pertencentes a este grupo. O terceiro grupo foi formado pelos acessos RTI e SGS, em que esses se agruparam pela proximidade química, pois ambos produziram os principais voláteis comuns a todos os ambientes, tendo o limoneno (15=14,6%) como o composto secundário de RTI e o linalol (22=7,7%) como secundário de SGG (TABELA 2; FIGURA 1).

A distribuição da composição química foi confirmada pela análise da componente principal (ACP) da área relativa de cada composto detectado para os onze acessos. Esta análise sumarizou as variáveis químicas nos dois primeiros componentes principais (CP). Esses foram retidos para interpretação, pois apresentaram autovalores acumulados de 96,58% da variância total existente entre os compostos voláteis. O primeiro componente explicou 90,175% da variabilidade para todas as amostras, no qual mostrou clara separação dos atributos voláteis da espécie. Enquanto que o segundo componente explico

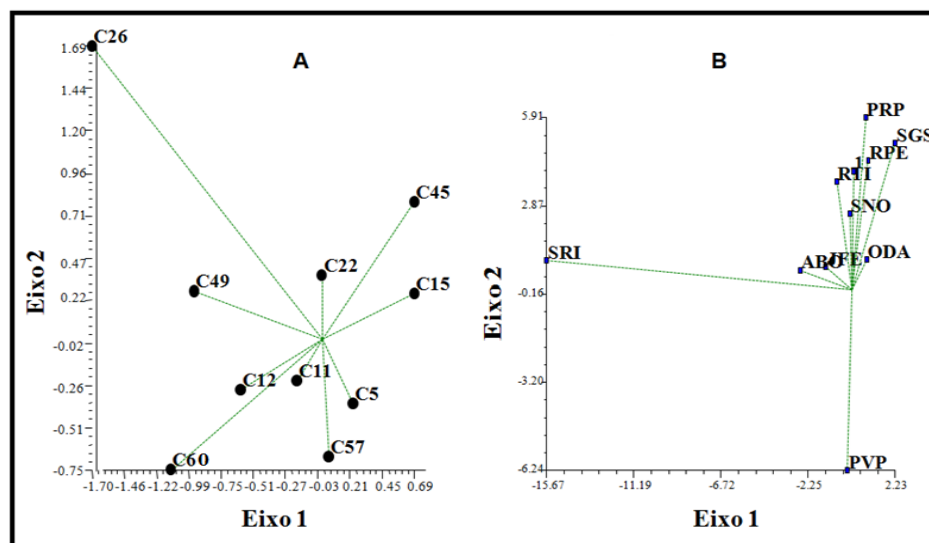
apenas 6,405% da variância total. Os atributos avaliados com maior carga fatorial no primeiro componente estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Atributos químicos dos voláteis com os autovalores dos componentes principais dos 11 locais de ocorrência da *Lippia rotundifolia* em Minas Gerais, Brasil.

Componentes da variância	Índice de compostos voláteis	
	CP1	CP2
Variabilidade (%)	90,175	6,405
Variabilidade acumulada (%)	90,175	96,58
Variáveis	Carga Fatorial (Escores)	
15 limoneno	0,987	0,024
49 cariofileno	0,959	0,167
57 germacreno	0,959	0,189
22 $\beta$ -linalol	0,998	0,016
26 tagetona	0,978	0,025
12 $\alpha$ -felandreno	0,941	0,003
45 $\beta$ -elemeno	0,949	0,014
59 eremofileno	0,659	0,105
48 $\alpha$ -cedreno	0,545	0,089

A distribuição dos dez compostos voláteis mais abundantes nos dois componentes principais corrobora a detecção destes para os 11 acessos, em que o monoterpene tagetona (26) é o composto que mais se distancia do centroide, apresentando maior desvio padrão, o que confirma sua exclusividade no acesso SGS (FIGURA 2a).

Figura 2 - Análise da componente principal e dispersão gráfica em escala bidimensional dos dez compostos voláteis principais (a) de *Lippia rotundifolia* Cham. de 11 acessos (b) pertencentes à populações de ocorrência natural em Minas Gerais, Brasil.



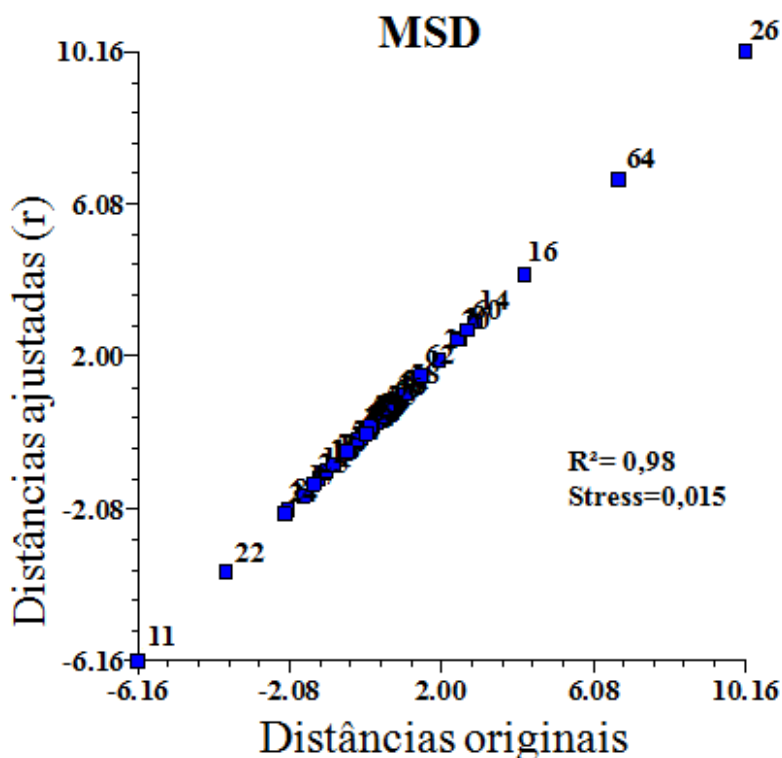
(5)  $\alpha$ -pineno; (11) mirreno; (12)  $\alpha$ -felandreno; (15) limoneno; (22)  $\beta$ -linalol; (26) tagetona; (45)  $\beta$ -elemeno; (49) cariofileno; (57) germacreno; (60)  $\alpha$ -selineno  
 SRI: Santana do Riacho município de Lapinha; PVP: Parque Estadual Veredas do Peruaçu; ODA: APA de Olhos D'água; GIG: Comunidade Gigante no município de Botumirim; RPE: Rio do Peixe no município de Botumirim; ABO: Comunidade Abóboras no município de Montes Claros; PRP: Parque Estadual do Rio Preto; JFE: Serra Geral no município de Joaquim Felício; SNO: Parque Estadual de Serra Nova; RTI: Rio Tigre no município de Gouveia e SGS: São Gonçalo do Rio das Pedras no distrito de Serro.

A projeção gráfica da análise discriminante dos 11 acessos corrobora com os resultados apresentados na Tabela 2, na qual evidencia que a espécie possui quimiotipos pertencentes às duas principais classes químicas. Os acessos com maior predomínio de monoterpênicos foram agrupados no plano superior (GIG, RPE, RTI, SGS, PRP), enquanto que os acessos com exclusividade sesquiterpênica foram agrupados no plano inferior (JFE, ABO, SRI, ODA, PVP) (FIGURA 2b). Esta análise também corrobora a observação *in loco*, em que os acessos que mais se distanciaram do centroide foram os que produziram o menor

número de voláteis n=5 para SRI e n=14 para PVP (FIGURA 2b). Sendo estes dois acessos os mais distantes química e geograficamente. A pequena quantidade de voláteis produzidos em SRI e PVP pode ser explicada pela interferência antrópica, pois em PVP registrou-se ocorrência de queimadas, enquanto que em SRI, embora o ambiente esteja próximo curso d'água, adequado para o estabelecimento da espécie, registrou-se a presença de animais domésticos forrageando no local. Nestes dois ambientes, os indivíduos apresentaram folhas coriáceas e sem aroma aparente. Estas observações evidenciam a diferença fitoquímica e morfológica dos indivíduos em resposta às condições ambientais aos quais estão expostos (CALVO-IRABIÉN et al., 2014; OSORNO-SANCHEZ et al., 2009; OSORNO-SANCHEZ; RUIZ; LINDIG-CISNEROS, 2012; TAIZ; ZEIGER, 2009).

A análise da dispersão gráfica pelo método de escalonamento não métrico (MSD) confirma o agrupamento apresentado pela ACP, em que a maioria dos voláteis teve o mesmo nível de ajuste, os quais foram considerados altamente significativos com baixo nível de estresse (FIGURA 3). Esta análise apresentou os marcadores químicos mirceno (11) e  $\beta$ -linalol (22) mais similares, cujos constituintes possuem maior abrangência, pois esses foram detectados em nove dos 11 acessos analisados. Esta análise também confirma o monoterpeneo oxigenado tagetona (26) como o mais distante na dispersão gráfica em função da produção exclusiva para o acesso SGS (TABELA 2; FIGURA 3).

Figura 3 - Dispersão gráfica entre as distâncias ajustadas e as distâncias originais dos 67 compostos voláteis detectados em 11 acessos de *Lippia rotundifolia* pelo método de escalonamento não métrico (MDS).



O agrupamento de mais de 70% dos voláteis no mesmo grupo (FIGURAS 3) se deve à ocorrência em mais de uma população e por possuírem produção variável entre os acessos. A variação no perfil químico é explicada pela interação genética com o ambiente, uma vez que os metabólitos secundários são controlados geneticamente (provavelmente poligênico) e estão associados ao mecanismo de defesa da planta, na qual provoca alterações significativas na composição química dos voláteis. Com isso, as condições ambientais podem influenciar na expressão do gene responsável pela ativação das enzimas terpenos sintases envolvidas na biossíntese dos voláteis terpênicos (MOREIRA, 2010;



PARRA-GARCÉS et al., 2010; PAVARINI; LOPES, 2016; PINTO-ZEVALLOS et al., 2013; WINSKA et al., 2014).

Em se tratando de conservar plantas aromáticas nativas com potencial econômico, o primeiro passo é identificar os genótipos melhores adaptados e, a partir destes, trabalhar o melhoramento genético visando uniformizar o cultivo para atender a demanda de mercado. Dentro desta ideia, a influência do ambiente na variação do perfil químico da *Lippia rotundifolia* é uma característica positiva como mecanismo de sobrevivência. Esse fator, também mostra o potencial da espécie para ser explorada no mercado de produtos naturais, pois cada ambiente expressa genes responsáveis pela produção de um determinado quimiotipo, podendo este vir a ser uma fonte de renda para a região onde ocorre (WINSKA et al., 2014; YAMAMOTO et al., 2008).

O mirceno (11), por exemplo, produzido em nove acessos e marcador químico em cinco, é sintetizado pelas indústrias químicas a partir da pirólise do  $\beta$ -pineno para a obtenção de muitos álcoois terpênicos como o nerol e o linalol. Esses aromas sintéticos florais são produzidos em larga escala e utilizados como aditivo intermediário na fabricação de fragrância de cosméticos, aromas artificiais de alimentos, aditivos farmacêuticos e na produção de perfume (KOLICHESKI, 2006; GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS JÚNIOR, 2013).

O Linalol (22), obtido em dez acessos e marcador em dois, é reportado pela literatura de amplo uso nas indústrias de perfumaria (SILVA, 2013). A obtenção deste volátil obtido por *headspace* garante a eficiência da análise na investigação da composição química de aromas para o mercado de fragrâncias (STASHENKO; PUERTAS; MARTÍNEZ, 2002). Também existem relatos da atuação deste composto como antimicrobiano no tratamento de cáries (PARK et al., 2012). Estudos recentes reportaram como inibidor de oxigênio no combate ao estresse oxidativo da cadeia respiratória e indução da apoptose

(APROTOSOAIE et al., 2014; BUENO-DUARTE; MENDEZ-SÁNCHEZ, 2015).

O  $\alpha$ -pineno (5), produzido em nove acessos e marcador de um (SNO), é reportado como detentor de atividade analgésica (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS JÚNIOR, 2013). Também comercializado como aromatizante artificial e associado a outros compostos possui atividade antioxidante (LEITÃO, 2008; LIMA, 2013; MIRANDA et al., 2016).

O limoneno (15), obtido em nove acessos e marcador de um (ABO), é o feromônio natural das formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*) (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011). A forma isomérica L-limoneno é usada como aromatizante artificial de alimentos e como solventes na fabricação de adesivos (BEZERRA et al., 2013; LIMA, 2013; WINSKA et al., 2014). Devido à ação antisséptica, é usado como aditivo na fabricação de antitranspirantes (NOVACOSK; TORRES, 2006). Em sinergismo com outros compostos é um potencial fungistático (LAJES, 2014). Sendo esta atividade confirmada em estudo preliminar na germinação das sementes de *Lippia rotundifolia*. Por isso este aleloquímico é consumido na agricultura como repelente e atrativo dos inimigos naturais (SEO et al., 2014).

O composto tagetona (26), produzido apenas em um acesso (SGS), é um potencial antimicrobiano contra fungos vegetais e antibacteriano contra doenças do trato respiratório (MONTANARI, 2010; SOUSA et al., 2015; VILJOEN, 2005).

O cariofileno (49) comum a todos os ambientes, associado ao isômero  $\alpha$ -humuleno (54) foi reportado como detentor de atividade anti-inflamatória e anestésico local com boa absorção cutânea. O que justifica o uso da planta como escalda-pés desde o século XIII (COUTINHO et al., 2015; GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS JÚNIOR, 2013; LEITÃO, 2008; LUCCA et al.,

2015; PAVARINI; LOPES, 2016; SOUSA et al., 2015; VEIGA JUNIOR et al., 2007).

Por fim, os resultados da análise química dos voláteis obtidos pelo método de espaço confinado (*headspace* estático), permitiu identificar diferentes quimiotipos para a *Lippia rotundifolia*. Dos 67 compostos detectados, propõe-se que a base da variação química está em seis diferentes quimiotipos, sendo estes mirceno,  $\beta$ -linalol,  $\alpha$ -pineno, limoneno, tagetona e germacreno. O maior número de compostos foi obtido em SGS (n=40), GIG (n=38) e PRP (n=35) e o menor número de compostos foi obtido em SRI (n=5) e PVP (n=14).

#### **4 CONCLUSÃO**

A *Lippia rotundifolia* apresenta variação na composição química. O acesso SGS possui o maior número de compostos químicos. Os voláteis mirceno,  $\beta$ -linalol e o cariofileno são os mais frequentes, detectados na maioria dos acessos. O acesso PVP é o detentor de maior distância química. Os seis compostos voláteis mais abundantes são os quimiotipos da espécie.



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. B. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. 804 p.
- \_\_\_\_\_. **Identification of essential oil components by gas chromatography/Mass Spectrometry**. Illinois: Allured Business Media, 2009. 804 p.
- APROTOSOAIE, A. C. et al. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 29, p. 193–219, Mar. 2014.
- BEZERRA, L. M. D. et al. Atividade antibacteriana in vitro de fitoconstituintes sobre microrganismos do biofilme dentário. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, São Caetano do Sul, v. 17, n. 1, p. 79-84, 2013.
- BUENO-DUARTE, Y.; MENDEZ-SÁNCHEZ, S. C. Efecto del linalool sobre la bioenergética de mitocôndrias de hígado de rata. **Vitae**, Medellín, v. 22, n. 1, p. 33-41, Jan./Apr. 2015.
- CALVO-IRABIÉN, L. M. et al. Phytochemical diversity of the essential oils of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* KUNTH) populations along an edapho-climatic gradient. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v. 11, n. 7, p. 1010–1021, July 2014.
- CARVALHO, F. et al. The mosaico f habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot from arbuscular mycorrizal fungi. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 9-19, 2012.
- COUNCIL OF EUROPE EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **European directorate for the quality of medicines**. 7th ed. Strasbourg: CRC Press, 2010. 241 p.
- COUTINHO, H. D. M. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de Geraniol e Cariofileno sobre *Staphylococcus aureus*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Ciudad de la Habana, v. 20, n. 1, p. 98-105, 2015.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed). **Formigas cortadeiras: da biologia ao manejo**. Viçosa: Editora da UFV, 2011. p. 14-26.

DURIGAN, G. et al. **Manual para recuperação da vegetação de cerrado**. 3. ed. São Paulo: SMA, 2011. 19 p.

FERNANDES, G. W. et al. Hail impact on leaves and endophytes of the endemic threatened. *Coccoloba cereifera* (Polygonaceae). **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 212, n. 10, p. 1687-1697, Oct. 2011.

GASTAUER, M.; MESSIAS, M. C. B.; MEIRA NETO, J. A. Florística composition, species richness and diversity of campo rupestre vegetation from the Itacolomi State Park, Minas Gerais, Brazil. **Environment and Natural Resources Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 115-130, 2012.

GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS JÚNIOR, L. J. Monoterpenes with analgesic activity: a systematic review. **Phytotherapy Research**, London, v. 27, N. 1, p. 1–15, Jan. 2013.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F. do; CAMPOS, I. C. de. Soaring extinction threats to endemic plants in Brazilian metal-rich regions. **Ambio**, Stockholm, v. 40, n. 5, p. 540-543, July 2011.

KOLICHESKI, M. B. **Síntese do mirceno a partir da isomerização térmica do  $\beta$ -pineno**. 2006. 121 p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LAJES, T. C. A. **Identificação de metabólitos secundários e estudo de bioatividades de interesse agroquímico e farmacológico de plantas e líquen da Serra do Brigadeiro – MG**. 2014. 296 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

LEITÃO, S. G. Analysis of the chemical composition of the essential oils extracted from *Lippia lacunose* Mart. e Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, São Paulo, v. 19, n. 7, p. 1388-1393, 2008.

LEITÃO, S. G. et al. Analysis of the chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 23, n. 5, p. 20-24, Sept. 2011.

LIMA, R. G. Identificação dos compostos da arruda através de cromatografia e uso do amostrador Headspace. **Pindorama**, São Paulo, v. 4, n. 4, p. 100-109, jan./jul. 2013.

LUCCA, L. et al. Determination of  $\beta$ -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 104, p. 144-148, Feb. 2015.

MARTENS, L. A. **Flores da Serra da Calçada**. Belo Horizonte: Editora da UFMG, 2008. 478 p.

MESHKATASADAT, M. H.; PAPZAN, A. H.; ABDOLLAHI, A. Determination of bioactive volatile organic components of *Lippia citriodora* using ultrasonic assisted with headspace solid phase microextraction coupled with GC-MS. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, Washington, v. 6, n. 1, p. 319-323, Jan. 2010.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**. Belo Horizonte: Editora da UFMG, 2007. 295 p.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 213-220, jan./mar. 2016.

MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de anacardiaceae, suparunaceae e verbenaceae**. 2010. 173 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

MOREIRA, L. S. D. **Expressão gênica e voláteis induzidos pela herbivoia de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho, *Zea mays* L. (Poaceae)**. 2010. 80 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior Luiz de Agricultura Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

NATIONAL INSTITUTE STANDARDS AND TECHNOLOGY – NIST. **NIST speaker recognition evaluation**. [S.l.: s.n.], 2008. Disponível em: <<http://www.itl.nist.gov/iad/mig/Tests/ser/2008>>. Acesso em: 25 jun. 2016.



NOVACOSK, R.; TORRES, R. S. L. Atividade Antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), Cedro (*Juniperus virginiana*), Tomilho (*Thymus vulgaris*) e Cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Revista Analytica**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 1, p. 36-39, 2006.

OSORNO-SÁNCHEZ, T. et al. Management and extraction of *Lippia graveolens* in the Arid Lands of Queretaro, Mexico. **Economic Botany**, Bronx, v. 63, n. 3, p. 314-318, Sept. 2009.

OSORNO-SÁNCHEZ, T. G.; RUIZ, A. T.; LINDIG-CISNEROS, R. Effects of harvesting intensity on population structure of *Lippia graveolens* (Verbenaceae, Lamiales) in the Semidesert of Queretaro, Mexico. **African Journal of Agricultural Research**, Nigéria, v. 7, n. 1, p. 100-108, Jan. 2012.

PARK, S. et al. Antimicrobial effect of linalool and  $\alpha$ -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. **Anaerobe**, London, v. 18, n. 3, p. 369-372, June 2012.

PARRA-GARCÉS, M. I. et al. Morfología, anatomia, ontogenia y composición química de metabolitos secundários em inflorescencias de *Lippia alba* (Verbenaceae). **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 58, n.4, p. 1533-1548, Dec. 2010.

PAVARINI, D. P.; LOPES, N. P. Ecologia química e a biossíntese dos terpenos voláteis das Arnicas-da-Serra (*Lychnophora* spp.). **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 8, n. 1, p. 242-262, jan./fev. 2016.

PIMENTA, M. R. et al. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 211-220, 2007.

PINTO-ZEVALLOS, D. M. et al. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 1395-1405, 2013.

PRAÇA-FONTES, M. M.; VICCINI, L. F. Estudo meiótico e viabilidade do pólen de três espécies de *Lippia* (verbenaceae) da Cadeia do Espinhaço-MG. **Revista Univap**, Paraíba, v. 13, n. 24, 2006. Disponível em: <[http://www.univap.br/univap/pro\\_reitorias/int\\_uni\\_soc/revista/RevistaUni](http://www.univap.br/univap/pro_reitorias/int_uni_soc/revista/RevistaUni)>. Acesso em: 21 jun. 2016.

RAPINI, A. et al. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 4, n. 1/2, p. 15-23, dez. 2008.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.11**. New York: Applied Biostatistics, 2000. Disponível em: <<http://www.ExeterSoftware.com>>. Acesso em: 15 set. 2010.

SALIMENA, F. R. G.; MÚLGURA, M. E. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 1, p. 191-197, 2015.

SALIMENA, F. R.; SILVA, T. R. S. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais, Verbenaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 119-120, 2009.

SAMPAIO, F. **Hipóteses filogenéticas de espécies sul americanas do gênero *Lippia* Spp. (Verbenaceae) com base em sequências nucleotídicas**. 2009. 78 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biotecnologia) - Universidade Federal de Juíz de Fora, Juíz de Fora, 2009.

SEO, S.-M. et al. Fumigant toxicity and acetylcholinesterase inhibitory activity of 4 Asteraceae plant essential oils and their constituents against Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 113, p. 55-61, July 2014.

SILVA, F. S. **Estudo fitoquímico e farmacológico de *Lippia thymoides* Mart. e Schauer (Verbenaceae)**. 2012. 143 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

\_\_\_\_\_. **Aromas do Cerrado: estudo da composição química volátil de plantas aromáticas do cerrado**. 2013. 113 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SOUSA, D. S. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia organoides* e *Lippia rotundifolia* frente a enterobactérias isoladas de aves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 3, p. 940-944, maio/jun. 2015.

\_\_\_\_\_. Relationship between pollen morphology and chromosome numbers in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 147-157, mar. 2013.

SOUSA, S. M.; TORRES, G.; VICCINI, L. F. Karyological studies in Brazilian species of *Lippia L.* (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 4, p. 1029-1037, dez. 2012.

STASHENKO, E. E.; PUERTAS, M. A.; MARTÍNEZ, J. R. SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of *in-vitro* antioxidant activity. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, n. 1/2, p. 70-74, May 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2009. 848 p.

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

VEGA-VELA, N. E.; DELGADO-ÁVILA, W. A.; CHACÓN-SÁNCHEZ. Genetic structure and essential oil diversity of the aromatic shrub *Lippia origanoides* Hunth (Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. **Agronomia Colombiana**, Bogotá, v. 31, n. 1, p. 7-17, Jan./Apr. 2013.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 112, n. 2, p. 248-254, June 2007.

VICCINI, L. F. et al. Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD Markers. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 246, n. 1, p.1-8, Apr. 2004.

VILJOEN, A. M. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 96, n. 1/2, p. 271-277, Jan. 2005.

WINSKA, K. et al. Isomers and odor or nose as stereochemist. **Chemik**, Poland, v. 68, v. 2, p. 83-90, 2014.

YAMAMOTO, P. V. et al. Performance of ginger Grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 5, p. 481-489, 2008.

## COSIDERAÇÕES FINAIS

A *Lippia rotundifolia* ocorre preferencialmente em ambientes de altitude, pedregosos, pobres em nutrientes e próximos a cursos de água. O estágio fenológico da espécie varia entre os locais de ocorrência e seu estado de conservação. A planta possui característica de espécies pioneiras colonizadoras de ambientes antropizados. Todas essas características ecogeográfica e microambientais enfatizam que a espécie é um ecótipo bem adaptado, portanto, não é considerada como ameaçada de extinção.

A espécie é representada por seis quimiotipos, em que a população São Gonçalo do Rio das Pedras (SGS) representa o monoterpeno tagetona. O Parque Estadual de Serra Nova (SNO) representa o monoterpeno  $\alpha$ -pineno. A Comunidade Abóboras representa o monoterpeno limoneno. A Comunidade Gigante, Rio do Peixe, Joaquim Felício, Olhos D'água e Rio Tigre representam o monoterpeno mirceno. O Parque Estadual do Rio Preto e Santana do Riacho representam o monoterpeno oxigenado  $\beta$ -linalol e o Parque Estadual Veredas do Peruaçu representa o sesquiterpeno germacreno.

Embora a condição microclimática e o isolamento geográfico tenham contribuído para a baixa variabilidade genética da espécie, a interação alélica com o ambiente resultou na detecção de um grande número de compostos voláteis. Os seis quimiotipos acima citados são bioativos de valor econômico e podem ser transformados em produtos de interesse comercial. Portanto esses acessos merecem estudos de manejo para conservar as populações nativas. Dentre as estratégias, está o plantio de enriquecimento com a produção de mudas para serem plantadas em campo a fim de aumentar a densidade populacional, conseqüentemente a estrutura genética da espécie. Dessa forma, garantindo a perpetuação dos recursos genéticos no ambiente natural para as próximas gerações.

Esta pesquisa é a primeira contribuição quanto à caracterização ambiental, genética e química da espécie proveniente de várias populações naturais de Minas Gerais. Os resultados desta pesquisa mostram o quanto a espécie é promissora para ser introduzida na lista de espécies medicinais do Sistema Único de Saúde (SUS). Espera-se que esta pesquisa subsidie outros estudos de ensaios biológicos com a espécie, bem como incentive pesquisas com outras espécies nativas, sempre visando o uso racional desses recursos.

## ANEXO A - CONDIÇÕES ANALÍTICAS

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GC\_MS

C:\MSDCHEM\1\METHODS\HS-MESSULAN.M  
Thu Nov 12 15:21:12 2015

Control Information

```
-----
Sample Inlet      : GC
Injection Source  : CTC PAL ALS
Mass Spectrometer : Enabled
=====
```

CTCPAL METHOD

```
-----
Injection Volume: 1000.00 ul
Syringe Size: 2.5ml-HS
Cycle File: HS-Inj
=====
```

CYCLE DETAILS

```
-----
Incubation Temperature (°C): 75
Incubation Time (s): 300
Syringe Temperature (°C): 75
Agitator Speed (rpm): 500
Fill Speed (µl/s): 500
Fill Strokes (): 0
Pullup Delay (ms): 0
Inject to: GC Inj1
Injection Speed (µl/s): 500
Pre Inject Delay (ms): 0
Post Inject Delay (ms): 0
Flush Time (s): 10
GC Runtime (s): 3060
=====
```

No Sample Prep method has been assigned to this method.

```
Oven
Equilibration Time          2 min
Max Temperature             325 degrees C
Slow Fan                    Disabled
Oven Program                On
  35 °C for 2 min
  then 3 °C/min to 150 °C for 10 min
Run Time                    50.333 min
1 min (Post Run)           300 °C
```

Sample Overlap  
Sample overlap is not enabled

```
Front SS Inlet He
Mode                        Splitless
Heater                      On 220 °C
Pressure                     On 6.7776 psi
Total Flow                   On 19 mL/min
Septum Purge Flow            On 3 mL/min
Gas Saver                    Off
Purge Flow to Split Vent     15 mL/min at 1 min
```

```
Thermal Aux 2 (MSD Transfer Line)
Heater                       On
Temperature Program          On
  240 °C for 0 min
Run Time                     50.333 min
```

Column #1  
J&W 122-5532: 1911.42479

DB-5ms  
 325 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm  
 In: Front SS Inlet He  
 Out: Vacuum

(Initial)	35 °C
Pressure	6.7776 psi
Flow	1 mL/min
Average Velocity	36.169 cm/sec
Holdup Time	1.3824 min
Flow Program	On
1 mL/min for 0 min	
Run Time	50.333 min
1 min (Post Run)	0.57353 mL/min

PCM C-1 N2  
 \*\*\*Excluded from Affecting GC's Readiness State\*\*\*  
 Pressure Program Off  
 10 psi for 0 min  
 Run Time 50.333 min

PCM C-2 N2  
 \*\*\*Excluded from Affecting GC's Readiness State\*\*\*  
 Pressure Program Off  
 10 psi for 0 min  
 Run Time 50.333 min

Signals	
Signal #1: Test Plot	Save Off
	50 Hz
Signal #2: Test Plot	Save Off
	50 Hz
Signal #3: Test Plot	Save Off
	50 Hz
Signal #4: Test Plot	Save Off
	50 Hz

## MS ACQUISITION PARAMETERS

General Information  
 -----

Tune File : atune.u  
 Acquisition Mode : Scan

MS Information  
 -- -----

Solvent Delay : 3.50 min

EMV Mode : Relative  
 Relative Voltage : 0  
 Resulting EM Voltage : 1482

## [Scan Parameters]

Low Mass	: 35.0	
High Mass	: 550.0	
Threshold	: 150	
Sample #	: 2	A/D Samples 4
Plot 2 low mass	: 35.0	
Plot 2 high mass	: 550.0	

## [MSZones]

MS Source	: 230 C	maximum 250 C
MS Quad	: 150 C	maximum 200 C

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

TUNE PARAMETERS for SN: US11373805

-----  
Trace Ion Detection is OFF.

EMISSION : 34.610  
ENERGY : 69.922  
REPPELLER : 28.783  
IONFOCUS : 90.157  
ENTRANCE\_LE : 28.500  
EMVOLTS : 1482.353

Actual EMV : 1482.35  
GAIN FACTOR : 0.36

AMUGAIN : 2025.000  
AMUOFFSET : 121.750  
FILAMENT : 1.000  
DCPOLARITY : 1.000  
ENTLENSOFFS : 17.569  
MASSGAIN : -644.000  
MASSOFFSET : -37.000

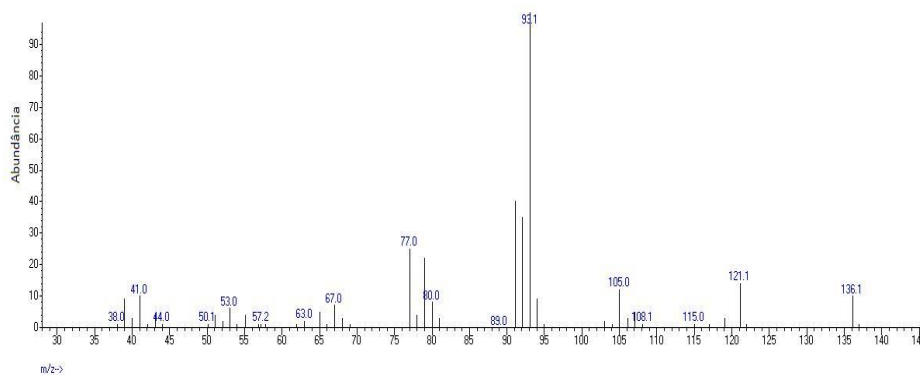
END OF TUNE PARAMETERS

-----  
END OF INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS

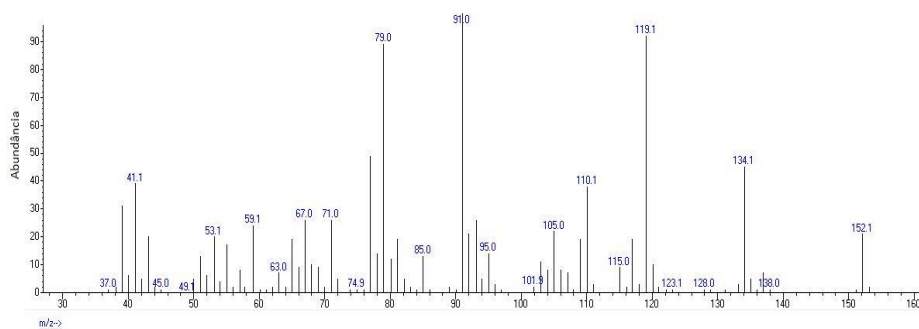


**ANEXO B - ESPECTROS DE MASSA DOS COMPOSTOS  
DETECTADOS E NÃO IDENTIFICADOS PELA LITERATURA  
ADAMS (2007; 2009)**

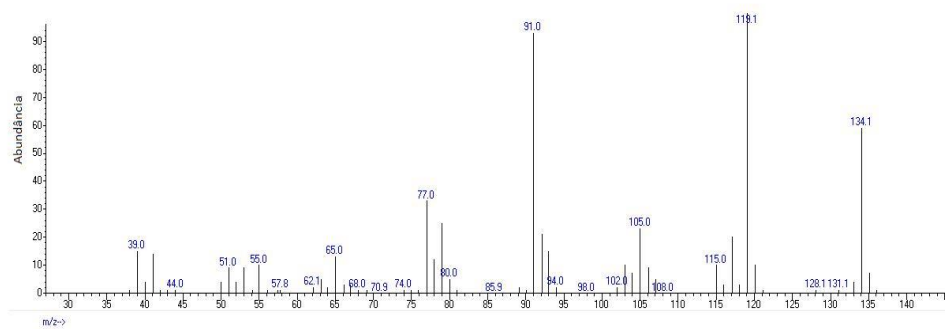
**Espectro de massas do composto 6**



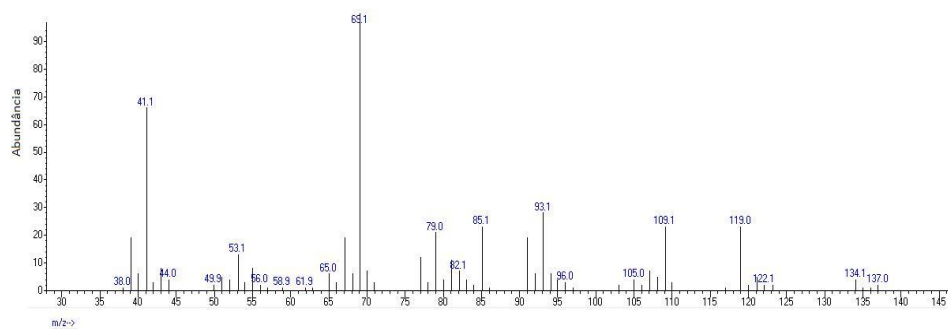
**Espectro de massas do composto 21**

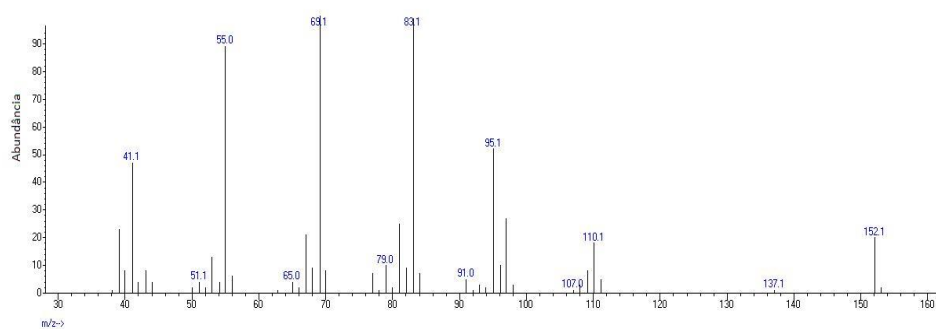
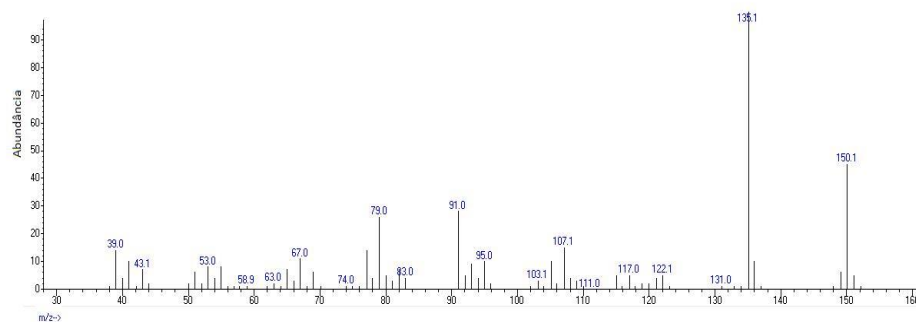
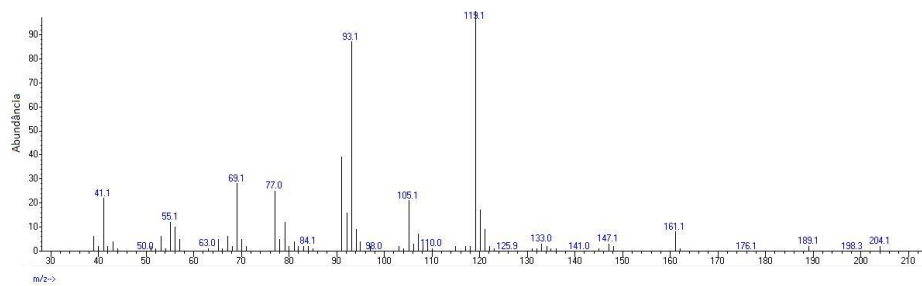


### Espectro de massas do composto 24

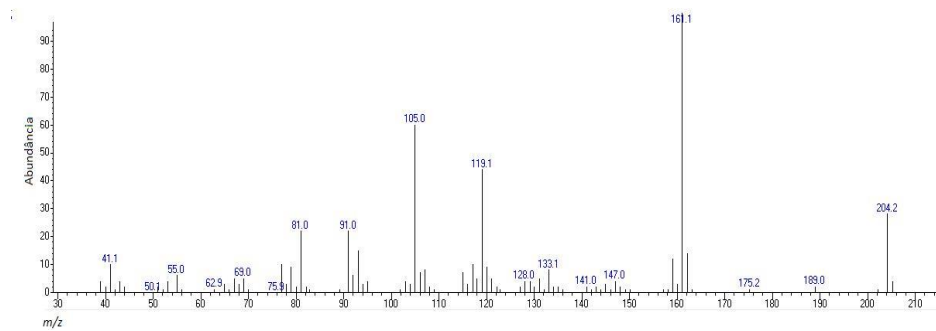


### Espectro de massas do composto 28

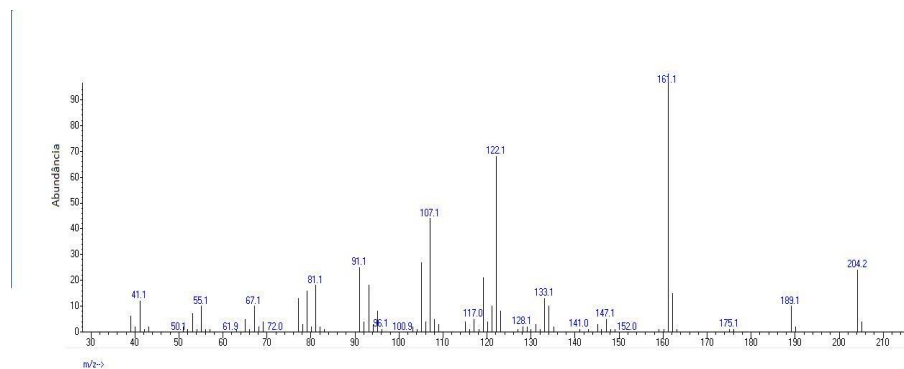


**Espectro de massas do composto 30****Espectro de massas do composto 36****Espectro de massas do composto 46**

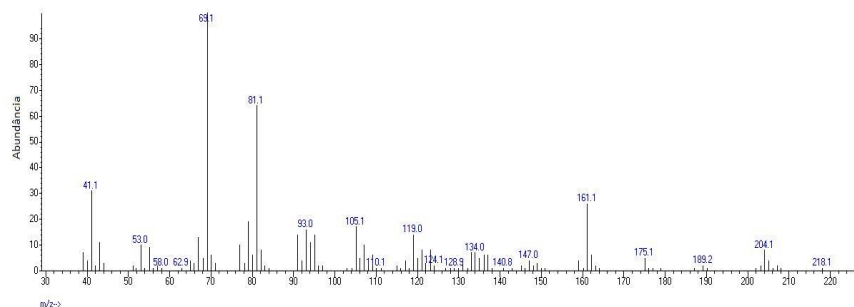
### Espectro de massas do composto 53



### Espectro de massas do composto 64



### Espectro de massas do composto 66



## ANEXO C - DECLARAÇÃO DE DEPÓSITO DO MATERIAL BOTÂNICO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
Cx. Postal 3037 - 37200-000 LAVRAS - MG  
Telefax.: (35)3829-1919

Lavras, 02 de dezembro de 2014

Declaro, como Curadora do Herbário ESAL - Herbário da Universidade Federal de Lavras (UFLA), que o mesmo possui infra-estrutura e disponibilidade para o depósito e registro e exsicatas advindas do projeto de pesquisa "CONSERVAÇÃO DE *Lippia rotundifolia* Cham.: COLETA, PROPAGAÇÃO, ESTUDO QUÍMICO E MOLECULAR", desenvolvido pela discente de pós-graduação *Messulan Rodrigues Meira* da UFLA e suas equipes.

ESAL 28086

A handwritten signature in black ink, which appears to read 'M. Esteves Mansaneres', is written over a horizontal line.

Profa. Dra. Mariana Esteves Mansaneres  
Curadora do Herbário ESAL  
Universidade Federal de Lavras  
Departamento de Biologia  
Cx. Postal 3037  
CEP 37200-000, Lavras, MG  
Tel (35)3829-1919



**EPAMIG** EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS



Avenida José Cândido da Silveira, 1647 - Bairro União - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil  
 CEP 31.170-495 Fone: 31 3480-5069 Fax: 31 34895064  
 E-mail: herbario@epamig.br ou andraasilva@epamig.br

#### DECLARAÇÃO

Declaro que Messulan Rodrigues Meira, estudante de doutorado em Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), depositou no Herbário PAMG da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) vouchers (exemplares-testemunho) da espécie: *Lippia rotundifolia* Cham. da Família Verbenaceae.

Registro PAMG	Local de coleta (Em MG)	Data
58090	Parque Estadual Veredas do Paruaçu, Januária	2014
58091	Parque Estadual do Rio Preto, São Gonçalo do Rio Preto	2014
58092	Ponte do Rio Tigre, Gouveia	2014
58093	Joaquim Felício	2014
58094	Rio do Peixe, Botumirim	17/08/2014
58095	Próximo ao Rio do Peixe Botumirim	27/09/2014
58096	Córrego Escuro, Grão Mogol	29/09/2014
58097	Região Gigante, Botumirim	21/10/2014
58098	Brumas do Espinhaço, Serra do Cipó, Santana do Riacho	11/04/2015
58099	Brumas do Espinhaço, Serra do Cipó, Lapinha	11/04/2015

O material listado foi herborizado, registrado e incluído no acervo do Herbário PAMG da qual sou curadora.

Belo Horizonte, 02/09/2016

Andraia Fonseca Silva  
 CRBio 49428/04-D  
 CPF: 957.839.108-72  
 Curadora do Herbário PAMG  
 Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG)



**EPAMIG** EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS



Avenida José Cândido da Silveira, 1847, Bairro União - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil  
 CEP 31.170-495 - Fone: 31 3486-5069 - Fax: 31 34895064  
 E-mail: herbario@epamig.br ou androisilva@epamig.br

#### DECLARAÇÃO

Declaro que Messulan Rodrigues Meira, estudante de doutorado em Plantas Mediciniais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), depositou no Herbário PAMG da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) vouchers (exemplares-testemunho) das espécies listadas abaixo:

Nome Científico	Família	Local	Registro PAMG
<i>Lippia rotundifolia</i> Cham.	Verbenaceae	São Gonçalo	58100
<i>Lippia rotundifolia</i> Cham.	Verbenaceae	Abóboras	58101
<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> (Spreng.) R.M King & H. Rob.	Asteraceae	Abóboras	58102
<i>Microlicia fasciculata</i> Mart. ex Naudin	Melastomataceae	Abóboras	58103
<i>Lavoisiera imbricata</i> (Thunb.) DC.	Melastomataceae	Abóboras	58104
<i>Cambessedesia espora</i> (A. St.-Hil. ex Bonpl.) DC.	Melastomataceae	Abóboras	58105
<i>Microlicia serpyllifolia</i> D. Don	Melastomataceae	Abóboras	58106

O material listado foi herborizado, registrado e incluído no acervo do Herbário PAMG da qual sou curadora.

Belo Horizonte, 15/09/2016

*A. Fonseca*

Andréia Fonseca Silva

CRB 49428/04-D

CPF: 957.639.106-72

Curadora do Herbário PAMG

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG)