

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *Lychnophora pinaster* MART.**

PAULO SÉRGIO SIBERTI DA SILVA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia
(Horticultura)

BOTUCATU – SP

Abril-2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *Lychnophora pinaster* MART.**

PAULO SÉRGIO SIBERTI DA SILVA

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia
(Horticultura)

BOTUCATU – SP
Abril-2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S586c Silva, Paulo Sérgio Siberti da, 1988-
Caracterização da diversidade genética e composição química de *Lychnophora pinaster* MART. / Paulo Sérgio Siberti da Silva. - Botucatu : [s.n.], 2016
xvi, 178 f. : fots. color., grafs. color., ils. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016
Orientador: Marcia Ortiz Mayo Marques
Coorientador: Maria Imaculada Zucchi
Inclui bibliografia

1. Arnica. 2. Citotoxicidade. 3. Variação genética. 4. Essências e óleos essenciais. I. Marques, Marcia Ortiz Mayo. II. Zucchi, Maria Imaculada. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *Lychnophora pinaster* MART.

AUTOR: PAULO SÉRGIO SIBERTI DA SILVA
ORIENTADORA: MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES
CO-ORIENTADOR: MARIA IMACULADA ZUCCHI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:

DRA. MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos / INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS

Profa. Dra. ALEXANDRA CHRISTINE HELENA F. SAWAYA
Depto de Biologia Vegetal / UNICAMP - CAMPINAS

Prof. Dr. MARCOS VINICIUS BOHRER MONTEIRO SIQUEIRA
Centro de Ciências Exatas / Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA
UNESP/Botucatu / Instituto de Biociências de Botucatu

Prof. Dr. MARCELO TELASCREÁ
Depto de Engenharia Química / Universidade do Sagrado Coração

Botucatu, 29 de abril de 2016

AGRADEÇO

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos, da qual esta tese é derivada.

À Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques (IAC) por ter aceito me orientar desde o mestrado, pela amizade, sinceridade (sempre!), apoio, dedicação, conselhos, críticas, paciência, pelo exemplo de profissionalismo, sendo a minha principal referência profissional durante estes cinco anos de caminhada. Obrigado Profa. Márcia! Vou carregar comigo tudo que aprendi com você. Foi um privilégio e, onde estiver, sempre vou praticar os seus ensinamentos de rigor, transparência, sinceridade, ética e de qualidade na pesquisa e no ensino. Isso foi o que mais me marcou durante a nossa caminhada juntos;

À Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi (APTA) pela coorientação, conselhos, críticas, apoio e amizade. Ao Dr. José Baldin Pinheiro (ESALQ), pelo apoio e por ceder a estrutura necessária para realização do estudo de biologia molecular. Ao Dr. Ronei Jesus Poppi (UNICAMP), pelos ensinamentos e ajuda nas análises quimiométricas. Ao Dr. Miklos Maximiliano Bajay (ESALQ) e à Jaqueline Campos (UNICAMP), pelo apoio nas estatísticas e experimentos de biologia molecular, respectivamente. À Profa. Dra. Alexandra C. H. Frankland Sawaya (UNICAMP), por ceder a estrutura necessária, ensino e apoio nos experimentos de cromatografia líquida. À Dra. Carolina Borsoi e ao doutorando Caio Haddad, do CNPEM, pelo estrutura necessária e apoio nos experimentos de atividade biológica e citotoxicidade. Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida, pelo apoio desde o mestrado em tudo que foi preciso, pelos ensinamentos, as dicas, críticas, sugestões e gentileza. Aos proprietários das áreas de coleta, que cederam os locais para o estudo;

A todos os colegas de laboratório e pós-graduação que, de certa forma, sempre me deram força nesta caminhada.

Agradeço em particular à Deus, que indicou os caminhos certos quando solicitei. Aos meus pais, Paulo César e Guiomar Siberti, e à minha esposa Claudia pelo apoio incondicional. E mais que especial, agradeço à minha filha, Anna Julia, pelos momentos de amor, distração e alegria, sendo o meu refúgio nos momentos mais difíceis. Devido à ela, os meus problemas da pós-graduação se transformaram em inspiração e superação.

Obrigado a todos, sempre lembrarei de vocês!

DEDICO E OFEREÇO

À minha filha, Anna Julia Borba Siberti da Silva, à minha esposa, Claudia Soares de Borba e à minha mãe, Guiomar Siberti da Silva.

SUMÁRIO	PÁGINA
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	VIII
RESUMO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. Geral.....	9
2.2. Específicos	9
3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	11
3.1. O Domínio Fitogeográfico do Cerrado e os Campos Rupestres	11
3.2. A Família Asteraceae	12
3.3. O Gênero <i>Lychnophora</i> Mart.	13
3.4. A Espécie <i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	15
3.4.1. Sinônimos Botânicos, Hábitos, Ocorrência e Uso Tradicional.....	15
3.4.2. Características Ecológicas.....	16
3.4.3. Características Morfológicas e Fenológicas	17
3.4.4. Estudos das Atividades Biológicas de <i>Lychnophora pinaster</i>	18
3.5. Metabolismo Especializado Vegetal	21
3.5.1. Óleos Essenciais.....	22
3.5.1.1. Fatores Genéticos e Ambientais e a Produção dos Óleos Essenciais.....	23
3.5.2. Extratos Vegetais: Definição e Uso	24
3.5.2.1. Fatores que Influenciam na Composição Química de Extratos Vegetais	25
3.6. Marcadores Moleculares	26
3.6.1. Marcadores Microssatélites.....	28
3.7. Diversidade Genética	30
3.8. Estrutura Genética Populacional	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1. Estudo de Diversidade Genética e Estrutura Populacional de <i>Lychnophora pinaster</i> utilizando Marcadores SSR	36
4.1.1. Coleta do Material Vegetal	36
4.1.2. Extração e quantificação de DNA.....	38
4.1.3. Amplificação e Determinação dos Microssatélites	39
4.1.4. Análises Estatísticas	41

4.1.4.1. Variabilidade genética.....	41
4.1.4.2. Estrutura Populacional	42
4.2. Estudo da Composição Química dos Óleos Essenciais e dos Extratos Etanólicos das Populações de <i>Lychnophora pinaster</i>	43
4.2.1. Coleta e Beneficiamento do Material Vegetal	44
4.2.2. Análise dos Solos dos Locais de Coleta das Populações	44
4.2.3. Extração dos Óleos Essenciais das Folhas	44
4.2.4. Análise da Composição Química dos Óleos Essenciais	45
4.2.4.1 Análises Estatísticas	46
4.2.5. Obtenção dos Extratos Etanólicos.....	47
4.2.6. Análise dos Extratos por UHPLC-MS	47
4.3. Estudo <i>in vitro</i> da Atividade Tripanocida dos Extratos Etanólicos e dos Óleos Essenciais de Populações de <i>Lychnophora pinaster</i>	49
4.3.1. Cultura de Células	50
4.3.2. Parasita <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
4.3.3. Composto de Referência e Amostras	50
4.3.4. Preparo das Amostras.....	50
4.3.5. Ensaio Anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
4.3.6. Definições	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1. Estudo de Diversidade Genética e Estrutura Populacional de <i>Lychnophora pinaster</i> Utilizando Marcadores SSR	53
5.1.1. Variabilidade Genética.....	54
5.1.2. Estrutura Genética.....	60
5.1.3. Implicações para Conservação.....	67
5.2. Condições Edafoclimáticas dos Locais de Origem das Populações Avaliadas no Estudo de Composição Química.....	69
5.3. Composição Química dos Óleos Essenciais das Populações de <i>Lychnophora pinaster</i>	77
5.3.1. Polimorfismo Químico das Populações	87
5.4. Relação entre a Química e os Fatores Ambientais.....	94
5.4.1. Populações do Sul <i>versus</i> População do Sudeste.....	94
5.4.2 Populações do Sul	99

5.5. Correlação entre Química e Genética	102
5.6. Composição Química dos Extratos Etanólicos das Populações de <i>Lychnophora pinaster</i>	104
5.6.2. Busca pelos Princípios Ativos.....	106
5.7. Rendimento dos Óleos Essenciais e Extratos.....	116
5.8. Estudo <i>in vitro</i> da Atividade Tripanocida e de Citotoxicidade dos Extratos Etanólicos e dos Óleos Essenciais.....	120
5.9. Considerações Finais.....	127
6. CONCLUSÕES	128
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
APÊNDICES	155

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Estudo de Diversidade Genética e Estrutura Populacional:

- A** Número Médio de Alelos por População;
A_P Alelos Privados;
A_R Alelos Raros;
H_O Heterozigosidade Observada;
H_E Heterozigosidade Esperada;
F_{IS} Coeficiente de Endogamia;
F_{ST} mede o Grau de Diferenciação entre as Populações;
θ Teta de Weir e Cockerham (1984) (equivalente ao F_{ST} de Wright);
f SmallF de Weir e Cockerham (1984) (análogo ao F_{IS} de Wright);
T_a Taxa de Cruzamento Aparente;
R_A Riqueza Alélica;
DL Desequilíbrio de Ligação;
K Número Mais Provável de *Clusters* Genéticos;
IC Intervalo de Confiança;
TPM Modelo de Duas Fases;
SMM Modelo de Mutação *Stepwise*;
K Número Mais Provável de *Clusters*.

Estudo de Composição Química dos Óleos Essenciais e Extratos

- DA** Análise Discriminante;
MANOVA Análise de Variância Multivariada;
PCA Análise de Componentes Principais;
RDA Análise de Redundância;
UTEMC Teste Unidimensional de Igualdade das Médias das Classes;
σ² variância da população;
n número de amostras por população;
 \bar{X} média;

m/z relação massa/carga;

DAPC Análise Discriminante de Componentes Principais;

CCOF Coeficiente de Correlação Cofenético;

UHPLC-MS Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas;

ESI Ionização por *Electrospray*;

GC/MS Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (português: **CG/EM**);

EI= Impacto de elétrons;

GC/FID Cromatografia a Gás com Detector de Ionização de Chama (português: **CG/DIC**);

MS/MS Espectrometria de Massas Sequencial;

t_R= tempo de retenção;

r coeficiente de correlação matricial simples;

r_p coeficiente de correlação matricial parcial.

Estudo de Atividade Tripanocida e de Citotoxicidade dos Óleos Essenciais e Extratos

FBS Soro Bovino Fetal;

DMEM Meio Eagle Modificado por Dulbecco;

LIT Infusão de Fígado Triptose;

PBS Tampão Fosfato Salino;

DMSO Dimetilsulfóxido;

DPBS Tampão Fosfato Salino de Dulbecco;

TI Taxa de Infecção;

AN Atividade Antiparasitária Normalizada;

EC₅₀ Concentração Eficaz;

CC₅₀ Concentração Citotóxica;

IS Índice de Seletividade.

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

Tabela 1: Substâncias identificadas nos extratos de <i>Lychnophora pinaster</i> cujas atividades biológicas são descritas em literatura.	20
Tabela 2. Origem e dados de coleta das populações nativas de <i>Lychnophora pinaster</i> , Minas Gerais, Brasil.	37
Tabela 3. Marcadores microssatélites utilizados, sequência dos primers, motivo, classificação do motivo, produto (pb) e nº de acesso no Genbank.....	40
Tabela 4. Condições para amplificação dos primers. Temperatura de anelamento (TA), volumes (μL) e concentração de MgCl_2 , volume de primers forward (F) e reverse (R), tipo de fluoróforo (M13) e volume de Taq DNA polimerase utilizados para amplificação dos oito locos microssatélites utilizados na genotipagem dos 186 indivíduos de <i>Lychnophora pinaster</i>	41
Tabela 5. Gradiente otimizado para análise por UHPLC-MS. Fase móvel A- água purificada (Milli-Q) com 0.1 % de ácido fórmico e como fase móvel B- metanol.....	48
Tabela 6 Frequência dos alelos observados em cada loco polimórfico nas populações de <i>Lychnophora pinaster</i> estudadas. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.	55
Tabela 7. Estimativas de índices de diversidade genética obtidos para sete populações de <i>Lychnophora pinaster</i> . A_T : número total de alelos; A : número médio de alelos por população; A_P : alelos privados; A_R : alelos raros; H_O : heterozigosidade observada; H_E = heterozigosidade esperada; F_{IS} : coeficiente de endogamia; T_a : Taxa de cruzamento aparente; R_A : riqueza alélica.	59
Tabela 8. Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.	60
Tabela 9. Valores de p registrados para as análises estatísticas (testes de Sinal e de Wilcoxon) de diferentes modelos mutacionais utilizados para avaliar a probabilidade de eventos gargalos recentes nas populações de <i>Lychnophora pinaster</i> . As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.	67
Tabela 10. Composição química média dos solos de origem das populações (Pop) de <i>Lychnophora pinaster</i> AB e SSa, região sul, e OB, região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil. Destacadas em cinza as variáveis que mais contribuíram para discriminar os solos de origem das populações pela Análise Discriminante (Gráfico 8). $n_{AB}= 10$; $n_{SSa}= 9$; $n_{OB}=4$	74
Tabela 11. Teste Unidimensional de Igualdade das Médias das Classes de solos das populações AB, SSa e OB formadas pela Análise Discriminante (Gráfico 8). As populações AB e SSa são provenientes da região sul, e OB, região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.....	75
Tabela 12. Teste Unidimensional de Igualdade das Médias das Classes de solos de SSa e AB formadas pela Análise Discriminante. As populações SSa e AB são provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais - Brasil.....	76
Tabela 13. Porcentagem (%) Mínima (Min) e Máxima (Máx) dos constituintes registrados nos óleos essenciais das populações de <i>Lychnophora pinaster</i>	79

- Tabela 14.** Teste Unidimensional de Igualdade das Médias das Classes químicas formadas por AB, SSa e OB. As populações AB e SSa são provenientes da região sul e OB é proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil..... 90
- Tabela 15.** Teste Unidimensional de Igualdade das Médias das Classes químicas formadas pelos óleos essenciais das populações SSa e AB via Análise Discriminante. As populações AB e SSa são provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais - Brasil. 94
- Tabela 16.** Dados adquiridos na análise dos extratos das populações de *Lychnophora pinaster* AB, SSa e OB por UHPLC-ESI-MS/MS em modo negativo e GC-MS..... 109
- Tabela 17.** Massa de ácido clorogênico, ácido p-cumárico e de quercetina por grama de extrato etanólico e proporção relativa (%) de friedelina nos extratos etanólicos das populações (Pop) de *Lychnophora pinaster* (SSa, AB e OB). 116
- Tabela 18.** Valores de EC₅₀, CC₅₀ e Índice de Seletividade (IS) para o composto referência (benznidazol), os óleos essenciais e os extratos das populações de *Lychnophora pinaster* contra amastigotas intracelulares de *Tripanossoma cruzi*, cepa Y. Populações AB e SSa, provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais, e a população OB, proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil. 125

LISTA DE GRÁFICOS

PÁGINA

- Gráfico 1.** F_{st} par a par entre as sete populações de *Lychnophora pinaster* analisadas. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil..... 61
- Gráfico 2.** Valores de ΔK foram plotados contra vários valores de K, sugerindo K=2 como o mais provável número de clusters. 61
- Gráfico 3.** Atribuição Bayesiana de 186 indivíduos de *Lychnophora pinaster* em (A) K=2, (B) K=3 e (C) K=4 clusters genéticos utilizando o software STRUCTURE v.2.3.4. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil..... 62
- Gráfico 4.** Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) a partir de 8 locos SSR e 186 indivíduos de *Lychnophora pinaster* (A). Em (B) os respectivos agrupamentos no mapa de distribuição espacial. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil. 64
- Gráfico 5.** Dados de (A) temperatura (°C) e (B) precipitação (mm) interpolados referentes ao período de 28/11/2015 a 04/02/2015 nas regiões de coleta das populações de *Lychnophora pinaster* OB (sudeste) e AB e SSa (sul) para o estudo de composição química. Siglas OB_Máx e AB/SSa_Máx = temperatura máxima registrada na região de OB (sudeste) e AB/SSa (sul), respectivamente. Siglas OB_Min e AB/SSa_Min= temperatura mínima registrada na região de OB (sudeste) e AB/SSa (sul), respectivamente. Fonte dos dados: AccuWeather.com. 70
- Gráfico 6.** Altitudes (m) médias (A) e coordenadas geográficas (B1 e B2) dos locais de origem das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul, e OB, da região sudeste de Minas Gerais - Brasil. 72
- Gráfico 7.** Distância Euclidiana par a par levando em conta a composição química média dos solos de origem das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul, e OB, da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil..... 73
- Gráfico 8.** Análise Discriminante para validação da divergência química dos solos de origem das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul, e OB, da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil. Gráfico de escores (A) e Diagrama vetorial exibindo as correlações negativas e positivas das 15 variáveis do solo com o primeiro e segundo fatores (B). 74
- Gráfico 9.** Análise Discriminante para validação da divergência química dos solos de origem das populações AB e SSa, provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais - Brasil. Gráfico de escores (A) e diagrama vetorial exibindo as correlações negativas e positivas das 8 variáveis do solo com o primeiro fator (B)..... 76
- Gráfico 10.** Comportamento fenotípico diferencial dos indivíduos de *Lychnophora pinaster* provenientes da população AB (Carrancas, região sul) quanto ao acúmulo dos constituintes identificados nos óleos essenciais. Estado de Minas Gerais – Brasil..... 84
- Gráfico 11.** Comportamento fenotípico diferencial dos indivíduos de *Lychnophora pinaster* provenientes da população SSa (Carrancas, região sul) quanto ao acúmulo dos constituintes identificados nos óleos essenciais. Estado de Minas Gerais – Brasil..... 85
- Gráfico 12.** Comportamento fenotípico diferencial dos indivíduos de *Lychnophora pinaster* provenientes da população OB (entre municípios de Moeda e Itabirito, região sudeste)

- quanto ao acúmulo dos constituintes identificados nos óleos essenciais. Estado de Minas Gerais – Brasil. 86
- Gráfico 13.** Distância Euclidiana par a par levando em conta a composição química dos óleos essenciais das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul, e OB, proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil..... 87
- Gráfico 14.** Dendograma de dissimilaridade química (A) e Análise de Componentes Principais (B-C) levando em conta as populações de *Lychnophora pinaster* OB (região sudeste) e SSa e AB (sul) do Estado de Minas Gerais - Brasil. 88
- Gráfico 15.** Análise Discriminante para validação da divergência química nos óleos essenciais das populações de *Lychnophora pinaster* provenientes das regiões sul, AB e SSa, e sudeste, OB, do Estado de Minas Gerais - Brasil. Diagrama vetorial exibindo as correlações negativas e positivas dos metabólitos com o primeiro fator..... 92
- Gráfico 16.** Análise Discriminante para validação da divergência química nos óleos essenciais de AB e SSa, provenientes do município de Carrancas, localizado na região sul do Estado de Minas Gerais - Brasil. Gráfico de escores (A) e diagrama vetorial exibindo as correlações negativas e positivas dos 16 metabólitos com o primeiro fator (B). 93
- Gráfico 17.** Análise de Redundância entre as composições químicas dos solos de origem (X) e os metabólitos dos óleos essenciais (Y) característicos das populações de *Lychnophora pinaster*. Populações AB e SSa são provenientes da região sul e OB é proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil..... 97
- Gráfico 18.** Análise de Redundância entre os fatores latitude, longitude e altitude (X) e os metabólitos dos óleos essenciais (Y) característicos das populações de *Lychnophora pinaster*. AB e SSa são provenientes da região sul e OB é proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil. 98
- Gráfico 19.** Análise de Redundância entre os fatores latitude, longitude e altitude “X” e a composição química dos óleos essenciais “Y” das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul de Minas Gerais. 101
- Gráfico 20.** Análise de Redundância entre as composições químicas dos solos de origem “X” e óleos essenciais “Y” das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul de Minas Gerais. 102
- Gráfico 21.** Curva de calibração obtida pelo método do padrão externo com diferentes concentrações (ng) dos padrões comerciais de ácido clorogênico (A), ácido p-cumárico (B) e quercetina (C) para a determinação das concentrações dos analitos por grama de extrato das populações AB, SSa e OB..... 115
- Gráfico 22.** Rendimento (%) dos extratos etanólicos das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul, e OB, da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil. 117
- Gráfico 23.** Rendimento (%) dos óleos essenciais dos 55 indivíduos de *Lychnophora pinaster* estudados (A) e rendimento médio dos óleos essenciais das populações (B) AB e SSa, proveniente da região sul, e OB, proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil (B). Acessos AB_5 até AB_23: provenientes pop AB, de Carrancas (região sul); SSa_2 até SSa_25 provenientes pop SSa, de Carrancas (região sul); OB_2 até OB_36 provenientes da pop OB, entre os municípios de Moeda e Itabirito (região sudeste) 119

Gráfico 24. Curvas de dose-resposta para o composto de referência, benznidazol (A), e os óleos essenciais das populações de *Lychnophora pinaster* AB (B), OB (C) e SSa (D) testados em células U2OS infectadas. Populações AB e SSa, provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais, e a população OB, proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais-Brasil. Da esquerda para a direita, o eixo X contém o Log da concentração crescente de óleo essencial ou do composto referência e os 15 pontos de cada gráfico representam as diluições utilizadas para as amostras (100, 50, 25, 12.5, 6.6, 3.5, 1.7, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 e 0.005 $\mu\text{g/mL}$) e para o composto referência (400, 100, 50, 25, 12.5, 6.6, 3.5, 1.7, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 μM). Normalized Activity: Atividade antiparasitária normalizada; Cell Ratio: Taxa de células hospedeiras. 123

Gráfico 25. Curvas de dose-resposta para o composto de referência, benznidazol, e os extratos das populações de *Lychnophora pinaster* SSa (B), OB (C) e AB (D) testados em células U2OS infectadas. Populações AB e SSa, provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais, e a população OB, proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais-Brasil. Da esquerda para a direita, o eixo X contém o Log da concentração crescente de óleo essencial ou do composto referência e os 15 pontos de cada gráfico representam as diluições utilizadas para as amostras (100, 50, 25, 12.5, 6.6, 3.5, 1.7, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 e 0.005 $\mu\text{g/mL}$) e para o composto referência (400, 100, 50, 25, 12.5, 6.6, 3.5, 1.7, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 μM). Normalized Activity: Atividade antiparasitária normalizada; Cell Ratio: Taxa de células hospedeiras. 124

Gráfico 26. Curvas de dose-resposta do teste de citotoxicidade para o composto de referência benznidazol (A), os óleos essenciais (B, C, D) e extratos etanólicos (E, F, G) das populações de *Lychnophora pinaster* AB, SSa e OB em células LLC-MK2 não infectadas. Populações AB e SSa, provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais, e a população OB, proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais. *Da esquerda para a direita, o eixo X contém o Log da concentração crescente de extrato e os 15 pontos de cada gráfico representam as diluições utilizadas (100, 50, 25, 12.5, 6.6, 3.5, 1.7, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 e 0.005 $\mu\text{g/mL}$); Cell Ratio: Taxa de células hospedeiras. 126

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1. À esquerda, indivíduo jovem e, à direita, indivíduo adulto de <i>Lychnophora pinaster</i>	18
Figura 2. À esquerda, glomérulos de <i>Lychnophora pinaster</i> com aquênios sem o papus interno e, à direita, aquênios sem papus interno.....	18
Figura 3. Mapa geral dos procedimentos metodológicos utilizados.	35
Figura 4. As sete populações de <i>Lychnophora pinaster</i> utilizadas. Destacadas em laranja as populações (OB, AB, SSa) coletadas para o estudo de composição química dos óleos essenciais e extratos.....	36
Figura 5. Perfil do gel de agarose 1% corados com Syber Green®, mostrando a quantificação de vinte e uma amostras do DNA de <i>Lychnophora pinaster</i>	54
Figura 6. Perfil de um gel obtido pelo sistema de eletroforese LI-COR, correspondendo ao loco Lpin 13.....	54
Figura 7. Cromatogramas de íons totais dos óleos essenciais das folhas de <i>Lychnophora pinaster</i> provenientes das populações AB (A) e SSa (B), de Carrancas, região sul de Minas Gerais, e da população OB (C), situada entre os municípios de Moeda e Itabirito, região sudeste de Minas Gerais - Brasil.	78
Figura 8. Estrutura química das substâncias identificadas nos óleos essenciais das três populações de <i>Lychnophora pinaster</i> estudadas. A numeração das substâncias, entre parênteses, segue a sequência de numeração (No) da Tabela 13.	81
Figura 9. Espectros ESI(-)-MS dos extratos etanólicos das populações de <i>Lychnophora pinaster</i> AB (A), OB (B) e SSa (C). AB e SSa são provenientes da região sul e OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil. Scans na extensão de 100-800 m/z, modo negativo.	105
Figura 10. Cromatogramas UHPLC-MS em modo negativo dos extratos etanólicos das partes aéreas das populações de <i>Lychnophora pinaster</i> SSa (A), OB (B) e AB (C). AB e SSa são provenientes da região sul e OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.	106
Figura 11. Estruturas químicas dos compostos identificados nos extratos etanólicos da parte aérea das populações de <i>Lychnophora pinaster</i> AB, SSa e OB. AB e SSa são provenientes da região sul e OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.....	107
Figura 12. Cromatogramas UHPLC-MS em modo negativo dos padrões comerciais da (A) quercetina – m/z de 301, tR 5.41 min; (B) rutina – m/z de 609, tR 4.47 min; (C) vitexina – m/z de 431, tR 4.18 min; (D) ácido p-cumárico – m/z de 163, tR 4.05 min; (E) ácido clorogênico – m/z de 353, tR 3.05 min.....	110
Figura 13. Cromatogramas UHPLC-MS em modo negativo do extrato etanólico da população AB, selecionando os íons (A) de m/z 431 – vitexina, (B) de m/z 301- quercetina, (C) de m/z 515 – derivados do ácido dicafeoilquínico, (D) de m/z 163 – ácido p-cumárico, (E) de m/z 353 – ácido clorogênico. População proveniente de Carrancas, região sul do Estado de Minas Gerais – Brasil.	111
Figura 14. Cromatogramas UHPLC-MS em modo negativo do extrato etanólico da população SSa, selecionando os íons (A) de m/z 431 – vitexina, (B) de m/z 301- quercetina, (C) de m/z 515 – derivados do ácido dicafeoilquínico, (D) de m/z 163 – ácido p-cumárico,	

(E) de m/z 353 – ácido clorogênico. População proveniente de Carrancas, região sul do Estado de Minas Gerais – Brasil. 112

Figura 15. Cromatogramas UHPLC-MS em modo negativo do extrato etanólico da população OB, selecionando os íons (A) de m/z 431 – vitexina, (B) de m/z 301- quercetina, (C) de m/z 515 – derivados do ácido dicafeoilquínico, (D) de m/z 163 – ácido p-cumárico, (E) de m/z 353 – ácido clorogênico. População entre Moeda e Itabirito, no sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil. 113

Figura 16. Espectros de massas ESI-MS/MS em modo negativo dos íons de m/z 515 – derivados do ácido dicafeoilquínico - encontrados nos extratos etanólicos das partes aéreas das populações de *Lychnophora pinaster* AB (A-B), SSa (C-D) e OB (E-F). AB e SSa são provenientes da região sul e OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil. . 114

Figura 17. (A) Células U2OS não infectadas: controle positivo para atividade; (B) células U2OS infectadas: controle negativo para atividade tripanocida; (C) seção expandida para mostrar a eficiência na detecção dos núcleos do parasita dentro da célula hospedeira. NH= núcleo da célula hospedeira; NP= núcleo do parasita. 121

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *Lychnophora pinaster* MART. 2016, 178 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Autor: Paulo Sérgio Siberti da Silva

Orientadora: Márcia Ortiz Mayo Marques

Coorientadora: Maria Imaculada Zucchi

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram (i) fornecer a caracterização dos padrões de diversidade genética e estrutura populacional de sete populações naturais de *L. pinaster* e discutir estratégias de conservação; (ii) avaliar a composição química dos óleos essenciais de três populações naturais da espécie, duas provenientes da região sul e uma do sudeste de Minas Gerais; (iii) caracterizar os princípios ativos, registrados na literatura, dos extratos etanólicos das três populações naturais; (iv) determinar a atividade *in vitro* dos óleos essenciais e extratos etanólicos das populações contra formas amastigotas de *Tripanossoma cruzi*; e (v) avaliar as relações entre o polimorfismo químico, os fatores ambientais e genéticos. Os resultados revelaram (i) existência de diferentes níveis de diversidade genética dentro e alto nível de diferenciação genética entre populações. É estritamente necessário o monitoramento das populações remanescentes para que, de fato, seja evitada a extinção da espécie. Os esforços de conservação *in situ* devem focar na preservação dos *habitats* de *L. pinaster* da destruição e no aumento dos tamanhos populacionais, uma vez que o pequeno tamanho populacional e a fragmentação fazem de *L. pinaster* susceptível às perdas de diversidade genética causada pela endogamia e deriva genética. É sugerido planejamento de coleta de sementes provenientes dos grupos genéticos evidenciados pelo STRUCTURE ou DAPC para a conservação *ex situ* do germoplasma; (ii) não foi registrada a presença de substâncias da classe dos fenilpropanóides no óleo essencial da população de *L. pinaster* proveniente da região sudeste, apresentando como constituinte majoritário um sesquiterpeno oxigenado, enquanto as populações do sul apresentaram o *E*-cinamato de metila, *E*-cariofileno e α -humuleno como constituintes mais abundantes; (iii) mesmo padrão espacial de composição química foi observado para os extratos, onde as populações do sul apresentaram perfil químico semelhante entre si sob o ponto de vista qualitativo, diferindo da proveniente do

sudeste. Dos princípios ativos, somente a quercetina e friedelina foram identificados nos extratos das três populações, tendo as suas quantidades variado entre populações; (iv) os óleos essenciais e extratos etanólicos não apresentam *in vitro* seletividade e atividade antiparasitária com relação às formas amastigotas *T. cruzi* equivalente ou superior ao benznidazol, utilizado comercialmente para tratar doença de Chagas; (v) com o aumento das concentrações dos óleos essenciais e extratos, houve aumento da citotoxicidade e, conseqüentemente, diminuição da taxa de células hospedeiras tanto infectadas como não infectadas. Os extratos se mostraram mais citotóxicos em relação aos óleos essenciais; (vi) comparados à genética, os preditores ambientais - distância geográfica e os diferentes gradientes de solo - se mostraram os elementos mais relevantes para a variação química do óleo essencial entre populações de *L. pinaster*, indicando que o polimorfismo químico no óleo essencial esteja ocorrendo mais como um reflexo de uma seleção natural de acordo com os fatores ambientais locais e não devido à deriva genética; o que é um alerta quanto à utilização de diferentes populações de *L. pinaster* como fitoterápico de modo indiscriminado, uma vez que as diferenças na composição química podem comprometer sua eficácia terapêutica.

Palavras-chave: Atividade tripanocida; Arnica-mineira; Citotoxicidade; Conservação genética; *Lychnophora pinaster*, Polimorfismo químico.

CHARACTERIZATION OF GENETIC DIVERSITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF *Lychnophora pinaster* MART. Botucatu, 2016. 178 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Author: Paulo Sérgio Siberti da Silva

Adviser: Márcia Ortiz Mayo Marques

Coadviser: Maria Imaculada Zuchi

SUMMARY

The aims of this study were (i) to provide the characterization of the genetic diversity and population structure of seven native populations of *L. pinaster* and to provide strategies for its conservation; (ii) to study the chemical composition of essential oils of three native population of this species, being two from southern and one from southeastern region of the State of Minas Gerais; (iii) to characterize the active ingredients of the ethanolic extracts of these three native populations; (iv) to determine the *in vitro* activity of the essential oils and ethanolic extracts of the populations against amastigote forms of *Tripanossoma cruzi*; and (v) to analyze the correlation of the chemical polymorphism of the essential oil with environmental and genetic factors. It were detected (i) existence of different levels of genetic diversity within and high level of genetic differentiation among populations. It is strictly necessary monitoring of the remaining populations so that, in fact, be avoided extinction of *L. pinaster*. The efforts for *in situ* conservation should focus on preservation of habitats and the increase of populations size, once the small population size and fragmentation make *L. pinaster* vulnerable to losses of genetic diversity due to the endogamy and genetic drift. It is suggested collection of seeds from the genetic groups evidenced by STRUCTURE or DAPC for *ex situ* conservation of germplasm; (ii) It were not detected phenylpropanoids in the essential oil of the population from southeastern region, which presented as majoritary compound an oxygenated sesquiterpene, while in southern populations were detected the majoritary *E*-methyl cinnamate (phenylpropanoid), followed by *E*-caryophyllene and α -humelene; (iii) same spatial pattern of chemical composition was observed for extracts, with southern populations having similar profile quantitatively, differing of the southeastern population. Regarding the active ingredients, only quercetin and friedelin were identified in the extracts of the three populations, with quantities differing among populations; (iv) the

essential oils and extracts did not show selectivity and antiparasitic activity against *T. cruzi* amastigotes equivalent or superior to benznidazole, commercially used to treat Chagas disease; (v) the extracts were more cytotoxic than essential oils; and (vi) the environmental predictors – geographical distance and soils – were the most relevant factors to explain the chemical variation of essential oils among populations, indicating the chemical polymorphism is due to a natural selection according to the local environmental factors and not due to the genetic drift, which is an alert regarding the usage of different populations of *L. pinaster* in an indiscriminate way, once differences in chemical composition could compromise their therapeutic efficacy.

Keywords: Arnica-mineira; Chemical polymorphism; Cytotoxicity; Genetic conservation; *Lychnophora pinaster*; Trypanocidal activity.

1. INTRODUÇÃO

Muitas plantas medicinais e aromáticas do Cerrado possuem forte importância cultural e econômica, porém, são insustentavelmente utilizadas por populações humanas locais, como é o exemplo da *Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae: Lychnophorinae) ($2n=34$, $x=17$) (MANSANARES *et al.*, 2002). Conhecida popularmente como “arnica-mineira” ou “arnica-da-serra”, esta espécie pode ser encontrada na natureza como subarbusto ou arbusto candelabroforme e endêmica aos campos rupestres e campos de canga do Cerrado do Estado de Minas Gerais (SEMIR *et al.*, 2011).

Na medicina tradicional, ramos, folhas e inflorescências de *L. pinaster* são intensamente utilizados como agentes anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante contra contusões, pancadas, torções, hematomas e desinfecção de picadas de insetos (RODRIGUES e CARVALHO 2001; HABER *et al.*, 2009). Estudos com a espécie (CHIARI *et al.*, 1991, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1996; SILVEIRA *et al.*, 2005a; ALCÂNTARA *et al.*, 2005; GUZZO *et al.*, 2008; ABREU *et al.*, 2011; FERRAZ-FILHA *et al.*, 2012; ABREU *et al.*, 2013) justificam o seu uso tradicional como medicinal e fonte em potencial de agentes quimioprolifáticos.

Devido ao uso tradicional medicinal insustentável e ao desmatamento desordenado em Minas Gerais, muitas populações naturais de *L. pinaster* foram extintas, ao passo que muitas remanescentes se encontram reduzidas. Este cenário tornou a espécie vulnerável à extinção (COPAM, 1997) e, como consequência, seus

compostos ativos são encontrados cada vez mais num estoque natural reduzido e vulnerável às atividades antrópicas.

Associando ao fato de que estimativas das mudanças climáticas apontam para ocorrência de mudanças ambientais significativas ao longo dos anos, com efeitos sobre a biodiversidade mundial (WALTHER *et al.*, 2002; PARMESAN e YOHE, 2003; IPCC R4, 2007; COLLINS *et al.*, 2013; DONAT *et al.*, 2013), o grupo de pesquisadores do Instituto Agrônomo (IAC), Campinas-SP, iniciou em 2004 estudos para explorar a composição química e estrutura populacional de populações naturais da espécie. Com o uso de marcadores microssatélites, até o presente momento, foram exploradas a diversidade e estrutura genética de três populações naturais de *L. pinaster* provenientes da região sul e duas da região norte do Estado de Minas Gerais (HABER, 2008; HABER *et al.*, 2009; VIEIRA, 2012). No entanto, ainda existe a necessidade do conhecimento da diversidade genética e estrutura populacional de uma maior quantidade de populações da espécie. Isto é primordial para a tomada de decisão com relação a elaboração de estratégias efetivas de conservação genética, que é dependente do conhecimento prévio da distribuição da variabilidade genética intra e interpopulacional.

Com relação à composição química, muitos estudos têm dedicado esforços para caracterizar o perfil metabólico de *L. pinaster*. Foi constatado que nos extratos da espécie substâncias como a lactona sesquiterpênica 15-deoxi-goiazensolido, os triterpenos α -amirina e lupeol, o flavonol quercetina e os esteroides estigmasterol e sitosterol são alguns dos responsáveis por importantes atividades biológicas descritas para a mesma na medicina tradicional (SILVEIRA *et al.*, 2005a; ABREU *et al.*, 2011; ANTONISAMY *et al.*, 2011; ABREU *et al.*, 2013). Os extratos aquoso e etanólico da parte aérea de *L. pinaster*, bem como substâncias isoladas dos extratos etanólico e hexânico (15-deoxi-goiasensolido e ácido *E*-lichnofórico) também são capazes de inibir o crescimento da forma tripomastigota (infectante) de *Trypanosoma cruzi* (CHIARI *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1996; ALCÂNTARA *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2005a), agente etiológico da doença negligenciada tropical de Chagas, que infecta entre 7 e 8 milhões de pessoas no mundo (MORAES *et al.*, 2014; WHO, 2014). Quanto à composição química do óleo essencial de *L. pinaster*, foram identificados (HABER, 2008; ISOBE, 2012; VIEIRA, 2012; SILVA, 2013) os sesquiterpenos *E*-cariofileno e α -humuleno, dois anti-inflamatórios (FERNANDES *et al.*, 2007), sendo o último de uso tópico (ACHÉ, 2013); o fenilpropanóide *E*-cinamato de metila e os monoterpenos α -pineno e β -pineno, três agentes antimicrobianos (BURT, 2004;

HUANG *et al.*, 2009a; ALI *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012). O cinamato de metila também é utilizado como ingrediente fragrante sintético (EFSA, 2009; EUROPEIA UNION, 2012) para fabricação de cosméticos, produtos de limpeza, de higiene pessoal e alimentos (SHARMA e KANWAR, 2012). Tais constituintes, portanto, podem ser utilizados como parâmetros qualitativos para o óleo essencial e extrato de *L. pinaster* para potencial uso terapêutico ou industrial.

A busca por novos fármacos contra *T. cruzi* é imediatamente necessária, uma vez que novas cepas resistentes do parasita vêm emergindo ao longo dos anos e o repertório de fármacos disponíveis para combate da doença de Chagas é limitado, contando com apenas duas drogas registradas - benznidazol (Rochagan®, da Roche) e nifurtimox (Lampit®, da Bayer) (DIAS *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2014)-, sendo os metabólitos formados através do mecanismo de ação destes dois compostos causadores de efeitos adversos no organismo humano (CASTRO *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2009).

Observações prévias de campo indicam que, dependendo da população de *L. pinaster*, o aroma dos espécimes pode variar consideravelmente, podendo ou não apresentar o aroma agradável, característico da arnica (HABER, 2008; ISOBE, 2012; VIEIRA, 2012; SILVA, 2013).

Uma hipótese é a de que os locais de coleta sejam os principais fatores que podem alterar a composição química do óleo essencial ou extrato de *L. pinaster* e, conseqüentemente, sua eficácia terapêutica; merecendo ser investigado. Em populações naturais da espécie, foi verificado que uma população próxima ao município de Lavras, região sul de Minas Gerais, apresentou como constituinte majoritário do óleo essencial o sesquiterpeno oxigenado cedr-8-(15)-en-9-alfa-ol, diferindo de sete populações provenientes da mesma região (Lavras, Ingaí, Carrancas e Itumirim), cujo constituinte majoritário foi o *E*-cinamato de metila (HABER, 2008; ISOBE, 2012; SILVA, 2013). Mesmo entre populações de Carrancas consideradas próximas, cerca de 1.5 Km, diferenças significativas nas proporções relativas médias entre monoterpenos e sesquiterpenos foram observadas (SILVA, 2013). Populações da região norte, localizadas nas proximidades dos municípios de Olho D'Água e Diamantina, apresentaram como constituintes majoritários dos óleos essenciais os sesquiterperenos oxigenados 14-hidroxi-*Z*-cariofileno e 14-hidroxi- α -humuleno, respectivamente, não apresentando traço do fenilpropanóide *E*-cinamato de metila (VIEIRA, 2012); diferindo das populações provenientes da região sul.

Mesmo com a considerável quantidade de informações disponíveis sobre a divergência química intraespecífica no óleo essencial de *L. pinaster*, nenhuma ênfase até o momento foi dada à interação entre a genética, os fatores ambientais e a diversidade química das populações. Estudos prévios indicam que a variação da composição química do óleo essencial e extrato de plantas medicinais e aromáticas é atribuída principalmente às características ambientais (KORICHEVA *et al.*, 1998; KONDO e KAWASHIMA, 2000; BRENES-ARGUEDAS e COLEY, 2005; YAVARI *et al.*, 2010; CONFORTI *et al.*, 2011; HASSIOTIS *et al.*, 2014; KHADIVI-KHUBA *et al.*, 2014; MÜLLER *et al.*, 2015) ou genéticas (VERNET *et al.*, 1986; MELITO *et al.*, 2013).

Para o gênero *Lychnophora* Mart., por exemplo, estudos prévios com *Lychnophora ericoides* Mart. e *Lychnophora salicifolia* Mart. comprovaram que a altitude, latitude, longitude e os solos de origem desempenham um papel relevante em explicar a variabilidade química dos óleos essenciais e dos extratos hidroalcoólicos (CURADO *et al.*; 2006; GOUVEA *et al.*, 2012). Um estudo desta natureza com *L. pinaster* é necessário para aprofundar o conhecimento dos fatores que influenciam a composição química desta espécie endêmica e de valor cultural e potencialmente econômico do Estado de Minas Gerais, a fim de fornecer subsídios para o seguro uso medicinal.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Caracterizar a diversidade genética e química de populações naturais de *Lychnophora pinaster* a fim de fornecer subsídios para programas de conservação da espécie e uso medicinal.

2.2. Específicos

Para tanto, tem como objetivos específicos:

- (i) Caracterização dos padrões de diversidade genética e estrutura populacional de *L. pinaster* utilizando marcadores microssatélites;
- (ii) Avaliar a composição química dos óleos essenciais entre populações naturais da espécie de diferentes proveniências;
- (iii) Caracterizar os princípios ativos descritos na literatura nos extratos das populações naturais de *L. pinaster*;
- (iv) Determinar a atividade *in vitro* dos óleos essenciais e extratos etanólicos das populações naturais de *L. pinaster* contra formas amastigotas de *T. cruzi*;

- (v) Avaliar as relações entre o polimorfismo químico, os fatores ambientais (solo, distancia geográfica, altitude) e genéticos.

3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3.1. O Domínio Fitogeográfico do Cerrado e os Campos Rupestres

O Cerrado é um domínio fitogeográfico composto pelos biomas campo tropical (fisionomia campo limpo), savana (fisionomias campo sujo, campo cerrado e cerrado *sensu stricto*) e floresta estacional (fisionomia cerradão) (BATALHA *et al.*, 2011). Contém alta diversidade de plantas, concentrando o equivalente a um terço da biodiversidade nacional e 5% da fauna e flora mundiais, com cerca de 4000 a 7000 espécies (RODRIGUES e CARVALHO, 2001; MACHADO *et al.*, 2004).

Ocupa um quarto do território nacional, o equivalente a pouco mais de 200 milhões de hectares, dos quais 155 milhões estão no planalto central e abrangem o Estado de Minas Gerais, representando cerca de 50% da área total do estado, cuja localização em sua maior parte está a oeste e partes disjuntas a sudoeste e sul (MAROUELLI, 2003).

Algumas de suas regiões formam grandes blocos de vegetação nativa, como é o caso das regiões centrais e a oeste do estado de Minas Gerais (na área da Serra da Canastra), do oeste da Bahia, norte de Goiás, sul do Maranhão, Piauí e da região da Ilha do Bananal em Tocantins (MACHADO *et al.*, 2004). Em outras regiões, ocorre ocupação humana discreta ou a cobertura vegetal é muito esparsa, como no leste do Mato Grosso do Sul e no Triângulo Mineiro (MACHADO *et al.*, 2004).

Calcula-se que 40% das espécies lenhosas do Cerrado são endêmicas, que o torna, ao lado da Mata Atlântica, um *hotspot* mundial (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2002; BONVICINO *et al.*, 2012). Cerca de 7.3% de suas áreas encontram-se sobre solos litólicos e afloramentos rochosos (REATTO *et al.*, 1998), onde são encontrados tipos vegetacionais bem característicos, como exemplo, o campo rupestre, presente no bioma savana. Este é um tipo de vegetação predominantemente herbáceo-arbustivo, que pode crescer nas frestas de afloramentos rochosos ou em solos geralmente ácidos, pobres em nutrientes e em altitudes acima de 900 m – ocasionalmente a partir de 700 m -, cujas áreas apresentam variações extremas de temperaturas (noites frias e dias quentes), ventos constantes e restrições hídricas (GIULIETTI *et al.*, 1997; RIBEIRO e WALTER, 2007). Faz parte desta fisionomia a Cadeia do Espinhaço, um conjunto de terras altas, cujas rochas são de origem pré-cambriana, com forma de bumerangue de direção geral norte-sul centrado no meridiano 43°W e convexidade orientada para oeste (SAADI, 1995; VASCONCELOS, 2011) que contém desde áreas abertas, com predominância de gramíneas e outras ervas, até habitats com predominância de pequenas árvores e arbustos, com ou sem afloramento rochoso (VASCONCELOS, 2011), onde crescem, por exemplo, representantes de Asteraceae, Bromeliaceae, Cactaceae, Cyperaceae, Eriocaulaceae, Gentianaceae, Iridaceae, Lamiaceae, Fabaceae, Lentibulariaceae, Lythraceae, Melastomataceae, Myrtaceae, Orchidaceae, Poaceae, Rubiaceae, Velloziaceae, Vochysiaceae e Xyridaceae (RIBEIRO e WALTER, 2007).

3.2. A Família Asteraceae

Sendo a maior família das Eudicotiledôneas, Asteraceae contém por volta de 1600-1700 gêneros e 24000-30000 espécies (NAKAJIMA, 2000; FUNK *et al.*, 2005; SOUZA e LORENZI, 2008). Seus representantes são encontrados com pouca frequência em florestas tropicais úmidas e, comumente, em áreas de formações abertas (FUNK *et al.*, 2005). No Brasil, representa o equivalente a 10% das plantas vasculares existentes (HEIDEN *et al.*, 2007).

Asteraceae é caracterizada pela alta capacidade de adaptação aos mais diversos *habitats* e condições climáticas, variando desde subarbustos, ervas anuais ou perenes até arbustos ou lianas, tendo a inflorescência do tipo capítulo e o fruto do tipo cípselo

- também, chamado de aquênio - como as principais características (FUNK *et al.*, 2005; CANCELI *et al.*, 2007; HEIDEN *et al.*, 2007; SOUZA e LORENZI, 2008).

Asteraceae subdivide-se em duas subfamílias, Cichorioideae, caracterizada pela ocorrência de plantas geralmente com látex, e Asteroideae, que inclui espécies sem látex (LONGHI-WAGNER *et al.*, 2008). Muitas de suas espécies contêm potencial aromático e medicinal, como por exemplo, as pertencentes ao gênero *Lychnophora* (denominação que significa “portador de velas”, devido ao aspecto candelabroforme de seus representantes).

3.3. O Gênero *Lychnophora* Mart.

Lychnophora Mart. é um gênero botânico polifilético pertencente à classe Equisetopsida, subclasse Magnoliidae, ordem Asterales (TROPICOS® 2013; LOEUILLÉ *et al.*, 2015). É dividido em seis seções: *Lychnophora*, *Lychnophoriopsis*, *Lychnophorioides*, *Lychnocephaliopsis*, *Sphaeranthus* e *Chronopappus*, que se distribuem ao longo do domínio fitogeográfico do Cerrado dos Estados de Minas Gerais (representado pelas suas seis seções e 52 espécies, o equivalente a 76.5% do total de espécies do gênero), Bahia (3 seções e 19 espécies, correspondendo a 28% do total de espécies do gênero) e Goiás (2 seções e 5 espécies, correspondendo a 7.3% do total de espécies do gênero) (SEMIR, 1991; SEMIR *et al.*, 2011).

Portador de um endemismo bastante pronunciado, no total, *Lychnophora* é composto por aproximadamente 68 espécies, sendo que 36 são endêmicas a algumas Serras ou determinadas localidades (SEMIR, 1991; CURADO, 2006; SEMIR *et al.*, 2011). Seus ecossistemas de ocorrência são extremamente rústicos, com clima e solo secos, topografia irregular e insolação intensa, podendo as espécies apresentar restrições edáficas a substratos específicos e, até mesmo, a diferentes regimes pluviométricos (COYLE e JONES, 1981; SEMIR, 1991; MANSANARES *et al.*, 2002; SEMIR *et al.*, 2011).

Quanto às características morfológicas, seus representantes contêm um receptáculo comum cilíndrico, com várias brácteas involucrais imbricadas e capítulos apresentando flores hermafroditas; sua corola é tubulosa e o pappus paleáceo bisseriado, com série externa curta e persistente e a interna longa e caduca, além de uma fitotaxia, em que as folhas rígidas se dispõem em múltiplos espirais ao redor de um caule circular com epiderme uniestratificada, contendo estômatos e muitas células epidérmicas como base dos

tricomas, formando uma capa grossa envolta do caule, agindo como proteção contra a transpiração excessiva, altas temperaturas e ataque de fungos (MARTIUS, 1822; LUQUE e MENEZES, 2003; SOUZA e LORENZI, 2008).

Quanto às formas, se observa os aspectos mais diversos, o que parece ser uma adaptação morfológica ao fogo e *habitats* xeromórficos, sendo frequentemente registradas *in situ* espécies com hábitos de arvoretas ou arbustos com alturas variáveis e, menos frequentemente o hábito de subarbustos e, nunca, o hábito arbóreo (SEMIR, 1991; SEMIR *et al.*, 2011).

As características genéticas entre espécies também variam. Mansanares *et al.* (2002) apresentaram dados referentes ao número de cromossomos de espécies pertencentes a três seções: *Lychnocephaliopsis*, *Lychnophora* e *Lychnophoriopsis*), sendo observados *pools* gênicos distintos, com $n=17$ ($2n=34$) para *Lychnophora diamantinana* Coile & Jones S.B. Jones, *Lychnophora ericoides* Mart, *Lychnophora passerina* (Mart. ex DC.) Gardner, *L. pinaster*, *Lychnophora prostrata* Semir & Leitão e *Lychnophora rupestris* Semir & Leitão; $n=18$ ($2n=36$) para *Lychnophora gardneri* Sch. Bip., *Lychnophora joliana* Semir & Leitão, *Lychnophora pohlii* Sch. Bip. e *Lychnophora salicifolia* Mart.; e $n=19$ ($2n=38$) para *Lychnophora cipoensis* Semir & Leitão, *Lychnophora mello-barretoii* G.M. Barroso, *Lychnophora sellowii* Sch. Bip. e *Lychnophora tomentosa* (Mart. ex DC.) Sch. Bip. Uma população poliplóide de $n=34$ foi detectada por Mansanares *et al.* (2002) em *Lychnophora staavioides* Mart. Segundo os autores, esta variação no número de cromossomos pode ter ocorrido devido alterações numéricas causadas por disploidia ou aneuploidia.

Quanto ao perfil químico, em representantes de *Lychnophora* podem ser encontrados metabólitos especializados pertencentes às classes dos monoterpenos, triterpenos sesquiterpenos, fenilpropanóides, derivados benzênicos, esteróis, flavonoides, lactonas sesquiterpênicas, ácidos e lignanas (BOHLMANN *et al.*, 1980; BOHLMANN *et al.*, 1981; BORELLA *et al.*, 1992; COSTA *et al.*, 1993; SAÚDE *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1996; SAÚDE *et al.*, 1999; BORSATO *et al.*, 2000; GRAEL *et al.*, 2000; SAÚDE *et al.*, 2002; SARTORI *et al.*, 2002; TAKEARA *et al.*, 2003; CHICARO *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2004; ALCÂNTARA *et al.*, 2005; GRAEL *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2005ab; HABER, 2008; PAVARINI *et al.*, 2008; SALVADOR *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2010; ABREU *et al.*, 2011; ISOBE, 2012; PETACCI *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012; SILVA, 2013).

As propriedades biológicas das espécies variam desde tripanocida [*L. pinaster*, *Lychnophora markgravii* G. M. Barroso, *L. salicifolia*, *L. passerina*, *Lychnophora trichocarpa* Spreng. e *L. pohlii* (OLIVEIRA *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1996; JORDÃO *et al.*, 2004; ALCÂNTARA *et al.*, 2005; GRAEL *et al.*, 2005; SALVADOR *et al.*, 2009)], analgésica [*L. ericoides* (CERQUEIRA *et al.*, 1987; SANTOS *et al.*, 2005; SANTOS, 2006)], anti-inflamatória [*L. ericoides* Mart. (PAVARINI *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2010)], anti-bacteriana [*L. pinaster* (ABREU *et al.*, 2011)] até anti-fúngica [*L. salicifolia* (MIGUEL *et al.*, 1996)].

Devido a sua ampla aplicabilidade na medicina tradicional e ao fato de que as espécies de *Lychnophora* ainda não são domesticadas, ocorre em seu *habitat* natural alta pressão de extrativismo por parte de populações locais. Este fato levou a inclusão de 23 espécies do gênero na lista de espécies ameaçadas de extinção da flora nacional e do Estado de Minas Gerais, estando estas distribuídas nas categorias vulneráveis, em perigo, criticamente em perigo e provavelmente extintas (COPAM, 1997; MENDONÇA e LINS, 2000; BIODIVERSITAS, 2005).

3.4. A Espécie *Lychnophora pinaster* Mart.

3.4.1. Sinônimos Botânicos, Hábitos, Ocorrência e Uso Tradicional

Lychnophora pinaster Mart., sinônimos: *Lychnophora affinis* Gardner e *Lychnophora trichocarpa* (Spreng.) Spreng. (SEMIR *et al.*, 2011), popularmente conhecida como "arnica", "arnica-da-serra" ou "arnica-mineira", é uma espécie medicinal diploide ($2n=34$, $x=17$) (MANSANARES *et al.*, 2002) que pode ser encontrada na natureza como subarbusto ou arbusto no formato candelabroforme, sendo endêmica às fitofisionomias dos campos rupestres e campos de canga (conhecido também como campos rupestres ferruginosos) do Cerrado somente no Estado de Minas Gerais (SEMIR *et al.*, 2011), onde apresenta elevado valor cultural e potencial valor econômico.

Na medicina tradicional, preparados alcoólicos dos ramos, folhas e inflorescências da espécie são tradicionalmente indicados para o tratamento de contusões, pancadas, torções, hematomas e desinfecção de picadas de insetos (RODRIGUES e CARVALHO, 2001) como agente anti-inflamatório e analgésico, bem como agente anti-reumático, suavizador de pele (ALMEIDA *et al.*, 1998), contra otite e cicatrizante. A

forma de uso dos preparados - frescos ou secos - são por administração epidérmica na forma de compressa, alcoolatura (RODRIGUES e CARVALHO, 2001), pomada, sabonete (ALMEIDA *et al.*, 1998) ou via oral, macerados em cachaça (SILVEIRA *et al.*, 2005a).

A obtenção do material vegetal utilizado popularmente está estritamente relacionada ao extrativismo desordenado, realizado por populações locais, tanto para o próprio uso quanto para a venda como agente fitoterápico; o que é comum nas regiões onde ocorre a espécie. Este fator contribuiu para a sua classificação na categoria vulnerável à extinção pelo Conselho Estadual de Política Ambiental do Estado de Minas Gerais (COPAM), em 1997.

3.4.2. Características Ecológicas

L. pinaster distribui-se entre regiões de grandes altitudes, acima de 900 m, ao longo da Cadeia do Espinhaço mineira (SEMIR, 1991; CARVALHO, 1992; ANDRADE, 2013). Pode estar associada a ambos, ao campo rupestre vinculado a afloramentos predominantemente quartizíticos, e ao campo rupestre vinculado a afloramentos hematíticos, comum à região do Quadrilátero Ferrífero do Estado de Minas Gerais, sendo este último conhecido também como campo rupestre ferruginoso ou vegetação de canga (VIANA e LOMBARDI, 2007).

No campo rupestre, populações de *L. pinaster*, além de crescerem sobre afloramentos rochosos litólicos, crescem também sobre solos arenosos mais profundos, onde, no primeiro, o solo apresenta maior proporção de partículas finas e teores mais elevados de matéria orgânica e, no segundo, a drenagem é menor, sendo pobre em nutrientes (RAPINI *et al.*, 2008). No campo rupestre ferruginoso existem áreas associadas a gigantescos depósitos de minério de ferro (JACOBI e CARMO, 2008) e as populações de *L. pinaster* situadas nestas localidades são menos abundantes.

Como outras populações vegetais rupícolas que crescem nestas regiões, as de *L. pinaster* encontram-se distribuídas de forma disjunta devido à descontinuidade das cadeias montanhosas e dos afloramentos rochosos que compõe os seus locais de ocorrência. Nenhum estudo, até o presente momento, avaliou a estrutura populacional de populações desta espécie. Uma hipótese é a de que, devido ao isolamento geográfico, exista elevada diferenciação genética entre populações.

3.4.3. Características Morfológicas e Fenológicas

L. pinaster varia desde subarbusto ereto com muitos ramos, a pequenos arbustos ericóides e mais raramente arbustos mais altos candelabroiformes com 0.4 a 2.4 m, raramente com até 3.6 m; ramos alternos a subverticilados flexuosos e delicados até mais robustos, densamente tomentosos a velutinos ou curtamente subvilosos, geralmente de coloração cinérea a nigriscente abaixo e mais ou menos canescente acima, às vezes variadamente ocrácea até atrofusca, com ramos de 0.5 a 2.0 cm de diâmetro, com o tronco atingindo 2.5 a 5.0 cm de diâmetro nas regiões mais velhas das plantas arbustivas maiores; folhas muito imbricadas e ascendentes na parte superior dos ramos e mais patentes até pouco reflexas abaixo, geralmente lineares, linear-oblongas, rasmarinióides a ericóides, base arredondada a auriculada às vezes ligeiramente atenuada, ápice obtuso a pouco arredondado, raramente pouco agudo, margem revoluta; venação broquidódroma; nervura principal alargada afinando da base para o ápice; inflorescência em glomérulos simples folhosos, geralmente congestos e hemisféricos; flores com coloração variando do lilás a púrpura, medindo 8.0 a 10.0 mm de comprimento; aquênio obcônico a oval cilíndrico, glabro, glanduloso oliváceo a castanho, com 1.5 a 3.0 mm de comprimento e 0.8 a 1.5 mm de diâmetro (SEMIR 1991; SEMIR *et al.*, 2011) (FIGURAS 1 e 2).

Com relação aos aspectos vegetativos, reprodutivos e de dispersão dos frutos, caracteriza-se como uma planta semidecídua e tolerante ao estresse, com tendências a uma floração não sazonal e intermitente, com brotação e frutificação durante todo o ano (GARCIA, 2007).

Figura 1. À esquerda, indivíduo jovem e, à direita, indivíduo adulto de *Lychnophora pinaster*.



*Fotos: Paulo Sérgio Siberti da Silva (2012).

Figura 2. À esquerda, glomérulos de *Lychnophora pinaster* com aquênios sem o papus interno e, à direita, aquênios sem papus interno.



*Fotos: Paulo Sérgio Siberti da Silva (2012).

3.4.4. Estudos das Atividades Biológicas de *Lychnophora pinaster*

Bioensaios realizados com extratos *L. pinaster* comprovaram sua eficácia tripanocida. Foi verificado que seu extrato etanólico, proveniente da parte aérea, eliminou em 100% cepas Y tripomastigota de *T. cruzi* (CHIARI *et al.*, 1996). Outro componente tripanocida anteriormente identificado no extrato etanólico de *L. pinaster* foi a lactona sesquiterpênica 15-deoxi-goiasensolido (DUARTE *et al.*, 1993), cuja eficácia já havia sido comprovada previamente (CHIARI *et al.*, 1991). Eliminação de 100% de cepas

Y de *T. cruzi* também foi constatada para o extrato aquoso liofilizado da parte aérea da planta (113.62 µg/mL), de onde foram identificados os compostos fenólicos ácido caféico, vitexina, isovitexina, quercetina e ácido isoclorogênico (SILVEIRA *et al.*, 2005a).

Estudo identificou pela primeira vez no extrato hexânico da parte aérea de *L. pinaster* um composto relacionado ao cariofileno, denominado ácido lychnophoico (OLIVEIRA *et al.*, 1996) – mais tarde classificado por Silveira *et al.* (2005b) como ácido *E*-lichnofórico-, capaz de inibir em 50% o crescimento das cepas CL e Y de *T. cruzi*. Nas concentrações de 5.68, 6.48 e 13.86 µg/mL a eficácia do ácido *E*-lichnofórico e de seus derivados éster e álcool em controlar as tripomastigota chegou em 100% (ALCÂNTARA *et al.*, 2005). Do extrato hexânico/diclorometânico das folhas de *L. pinaster* também foi isolado o triterpeno pentacíclico α -amirina, que junto aos extratos apolares do caule e das folhas, apresentou ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (ABREU *et al.*, 2011), uma bactéria virulenta que pode ser fatal (SHORR, 2007).

Foram comprovadas as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico da parte aérea da espécie (GUZZO *et al.*, 2008). Posteriormente, atividade anti-inflamatória dos extratos e de compostos isolados dos extratos de *L. pinaster* foi investigada através de aplicação transdermal via fonoforese em patas de ratos com significativa degeneração das fibras musculares (ABREU *et al.*, 2013), onde observou-se após injúria, que o extrato hexânico exerceu moderada atividade anti-inflamarória após 72h da aplicação, ao passo que o extrato aquoso reduziu drasticamente no mesmo período o processo inflamatório, comparando-se ao tratamento com dexametasona, uma potente droga anti-inflamatória (GUZZO *et al.*, 1996; CUPOLILO *et al.*, 2007). O mesmo foi verificado para o flavonóide quercetina, o triterpeno lupeol, uma mistura de α -amirina e lupeol e a mistura dos esteróides estigmasterol e sitosterol, todos isolados do extrato hexânico da planta; justificando o uso tradicional da espécie.

Ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina* comprovou que o extrato etanólico das folhas de *L. pinaster* apresenta baixa letalidade ($LC_{50} = 678.73 \mu\text{g mL}^{-1}$) (FERRAZ-FILHA *et al.*, 2012) - testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES e FORBES, 1994) -, apontando para uma possível ação tóxica seletiva dos compostos com potencial atividade farmacológica. Desta forma, até o presente momento, as principais atividades biológicas de *L. pinaster* podem ser atribuídas aos metabólitos especializados dispostos na Tabela 1.

Tabela 1: Substâncias identificadas nos extratos de *Lychnophora pinaster* cujas atividades biológicas são descritas em literatura.

Substância	Classe	Fórmula Molecular	Massa molecular (Da)	Extrato	Parte da Planta	Atividade Biológica	Referência
15-deoxi-goiazensolido	LS	C ₁₉ H ₂₀ O ₆	344	etanólico	parte aérea	tripanocida; antibacteriana	Duarte <i>et al.</i> (1993) Chiari <i>et al.</i> (1991) Keles <i>et al.</i> (2011)
ácido cafeico	FE	C ₉ H ₈ O ₄	180	aquoso	parte aérea	tripanocida	Silveira <i>et al.</i> (2005a)
ácido isoclorogênico	FE	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354				
vitexina	FLA	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432				
isovitexina	FLA	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432				
ácido <i>E</i> -lichnofórico	ST	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	254	hexânico	parte aérea	tripanocida	Oliveira <i>et al.</i> (1996) Alcântara <i>et al.</i> (2005)
α -amirina	TRI	C ₃₀ H ₅₀ O	426	hexânico /aquoso/ etanólico	parte aérea/ folhas	antibacteriana anti-inflamatória	Abreu <i>et al.</i> (2011) Abreu <i>et al.</i> (2013)
quercetina	FOL	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302				
lupeol	TRI	C ₃₀ H ₅₀ O	426				
estigmasterol	EST	C ₂₉ H ₄₈ O	412				
sitosterol	EST	C ₂₉ H ₅₀ O	414				
friedelina	TRI	C ₃₀ H ₅₀ O	426				

LS= lactona sesquiterpênica; FE= fenilpropanóide; FLA= flavona; ST= sesquiterpeno; TRI= triterpeno; FOL= flavonol; EST= esteroide.

3.5. Metabolismo Especializado Vegetal

Todas as substâncias citadas (Seção 3.4.4) fazem parte do metabolismo especializado vegetal, também denominado de metabolismo secundário. No reino vegetal, metabólitos especializados são compostos que estão presentes em algumas espécies vegetais e não estão presentes em outras e, logicamente, não estão envolvidos no metabolismo básico (metabolismo primário) que opera em todas as plantas (PICHERSKY e LEWINSOHN, 2011).

A habilidade das plantas de sintetizarem estes metabólitos é resultado de um processo evolutivo, onde diferentes funções foram adquiridas pelos compostos para atenderem às necessidades específicas de diferentes unidades taxonômicas. Estima-se que 15 a 25% dos genes do genoma vegetal são responsáveis por codificação de enzimas para o metabolismo especializado (BEVAN *et al.*, 1998; SOMERVILLE e SOMERVILLE, 1999).

Através do surgimento de novas enzimas por mutação, alta diversidade estrutural de compostos pode ter surgido no metabolismo especializado. Em muitos casos, parece que sua evolução em plantas pode ter sido resultado de uma evolução convergente, o que explicaria o aparecimento dos mesmos compostos químicos, com a mesma função, em espécies diferentes. Como exemplo, temos o caso dos flavonóis e das flavonas, que são sintetizadas pela ação de duas flavonas sintase (FNS), uma pertencente à família OGD (oxoglutarate-dependent dioxygenase) (FNSI), encontrada em *Petroselinum crispum* (Mill.) Mansf. (Apiaceae), ao passo que em muitas outras famílias, a enzima que cataliza a mesma reação é pertencente à família das proteínas citocromos P450 (FNSII) (TANAKA *et al.*, 2008). Relacionado a este último caso, é comprovado que para a flavona apigenina, a síntese é controlada por genes não relacionados em linhagens distintas (PICHERSKY e LEWINSOHN, 2011).

Geralmente em alta diversidade estrutural em nível de espécie, metabólitos especializados podem estar presentes no organismo vegetal no estado ativo (como defesas constitutivas) ou como pró-drogas (como defesas indutivas), que se tornam ativas após o ferimento ou a infecção por patógenos (exemplo: fitoalexinas) (WINK, 2003). Também servem como fragrâncias ou atrativos para polinizadores (exemplo: monoterpênicos, antocianinas coloridas ou carotenoides em flores), podem apresentar funções fisiológicas importantes (exemplo: flavonoides, que atuam como protetores UV) (WINK, 2003), ou

mesmo servir como mediadores de interações bioquímicas interespecíficas, contribuindo para a evolução de estratégias competitivas (exemplo: aleloquímicos).

Estes metabólitos, portanto, são o resultado da adaptação vegetal aos diferentes nichos ecológicos, conferindo às plantas aumento do *fitness* devido produção de um conjunto de metabólitos apropriados para seu ambiente (PICHERSKY e LEWINSOHN, 2011). Torna-se razoável esperar que, em alguns casos, metabólitos especializados produzidos por vegetais possam alterar outros componentes do ecossistema, que dirigem processos e interações fundamentais, que determinam, por fim, a natureza de sua comunidade (WARDLE *et al.*, 1998).

3.5.1. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de metabólitos especializados voláteis, lipofílicas, geralmente líquidas e odoríferas obtidas de partes de plantas via destilação por arraste com vapor d'água ou por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (SIMÕES e SPITZER, 2003). Amplamente utilizados na indústria, tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentícia, cosmética, na produção de aromas e fragrâncias e na agroindústria (MACTAVISH e HARRIS, 2002; BIZZO *et al.*, 2009), são constituídos por diferentes classes de substâncias orgânicas, como os fenilpropanóides e os terpenos.

Nos óleos essenciais, monoterpenos e sesquiterpenos são os mais abundantes e sua produção varia em função do compartimento celular e da rota biossintética. A formação de sesquiterpenos ocorre a partir da via do mevalonato no citosol e a dos monoterpenos pela via do metil eritritol fosfato (MEP) nos cloroplastos (PERES, 2004; JAKIEMIU, 2008; TAIZ e ZEIGER, 2009; MARQUES *et al.*, 2012).

Quanto aos fenilpropanóides, a rota de produção ocorre exclusivamente no citoplasma (WINKEL-SHIRLEY, 1999) através da via do ácido chiquímico, cujo precursor origina os aminoácidos aromáticos tirosina, triptofano e fenilalanina. A ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) sobre a fenilalanina origina o ácido cinâmico, que por meio de reduções enzimáticas dá origem aos derivados fenilpropenos (LORENZO *et al.*, 2002; JAKIEMIU, 2008; MARQUES *et al.*, 2012). Estes metabólitos, através de vários eventos de cascata, são amplificados pela combinação de várias superfamílias de enzimas redutases, oxigenases e transferases, cuja expressão é regulada em função do órgão e de fatores bióticos e abióticos (VOGT, 2010).

Assim como os demais metabólitos especializados, óleos essenciais não apresentam função direta no crescimento e no desenvolvimento do vegetal, mas atuam principalmente na competição ou na simbiose entre plantas e organismos, na atração de polinizadores, na proteção contra infecção por patógenos ou na proteção contra herbívoros (TAIZ e ZEIGER, 2009).

3.5.1.1. Fatores Genéticos e Ambientais e a Produção dos Óleos Essenciais

Cada espécie botânica produz um óleo essencial de composição química característica e apesar de sua produção ser controlada genética e epigeneticamente, componentes ambientais influenciam na sua qualidade e quantidade (TRAPP e CROTEAU, 2001).

O fator sazonalidade, por exemplo, pode afetar processos bioquímicos e/ou rotas metabólicas, interferindo na síntese de compostos especializados importantes, como os terpenos (SCHUH *et al.*, 1997; SHAO *et al.*, 2001; GOBBO-NETO e LOPES, 2007). O mesmo para a fenologia, que afeta, por exemplo, o acúmulo de 1,8-cineol no óleo essencial de *Salvia lavandulifolia* Vahl., cujo maior acúmulo ocorre durante o florescimento (ALEMANY *et al.*, 2014).

Juntos, sazonalidade e fenologia elevam a importância da época de coleta do óleo essencial (o mesmo para extrato – ver exemplos no tópico seguinte), uma vez que sua composição e quantidade não são constantes no decorrer do ano e ao longo do ciclo de vida do vegetal. Para *Lavandula angustifolia* Mill. (Lamiaceae), a produção do óleo essencial parece ser influenciada por ambos, os fatores fenológicos, como o florescimento, e os fatores ambientais, como chuva e temperatura, existindo evidências de que a temperatura influi na biossíntese de linalol (HASSIOTIS *et al.*, 2014). Variações no conteúdo do óleo essencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae) possivelmente estão relacionadas a adaptação de indivíduos às condições ambientais, bem como às necessidades da planta ao longo do seu ciclo de vida (AMARAL *et al.*, 2015).

Influência dos fatores Ca, K, matéria orgânica, altitude, temperatura e textura de solo na produção do óleo essencial de *Thymus migricus* (Lamiaceae) foi comprovada (YAVARI *et al.*, 2010), bem como correlação entre a poluição e rendimento do óleo essencial de *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae), havendo maior rendimento de óleo

essencial e acúmulo de β -tujeno (nove vezes mais) em plantas de *T. vulgare* provenientes de regiões mais poluídas (STEVOVIĆ *et al.*, 2011).

Quanto ao gênero *Lychnophora*, estudo prévio com *Lychnophora ericoides* Mart. revelou dependência dos componentes do óleo essencial - monoterpenos, sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos sesquiterpênicos - sobre características de solo (CURADO *et al.*, 2006). Para *Lychnophora salicifolia* Mart., existe correlação entre acúmulo dos metabólitos secundários e os fatores altitude, latitude e longitude (GOUVEA *et al.*, 2012).

O padrão de variação geográfica na composição do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) sugere que hidrocarbonetos monoterpênicos sejam produzidos, principalmente, por plantas localizadas em região de maior latitude e altitude independente da fase de crescimento (OLIVEIRA *et al.*, 2005). A diversificação química de metabólitos especializados em função da localidade também é documentada para representantes de Icacinaceae, cuja produção de sesquiterpenos parece acompanhar uma transição entre sítios de origem de espécies na América Latina (KAPLAN *et al.*, 1991). Gradiente similar é o observado para os monoterpenos oxigenados de espécimes de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) distribuídos desde o Cerrado brasileiro até Argentina (SILVA *et al.*, 2007).

3.5.2. Extratos Vegetais: Definição e Uso

Por definição da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), extrato é um preparado de consistência líquida, sólida ou intermediária obtido a partir de material animal ou vegetal, sendo preparado por percolação, maceração ou outro método adequado e validado, utilizando como solvente álcool etílico, água ou outro solvente adequado.

Recentemente desenvolvidos, produtos cujas formulações contêm extratos vegetais são utilizados na medicina (RISHI BHATIA, 2015; LI TZU PAO MEI REGIMAN BEAUTY PUBLIC LTD COMPANY, 2015), como cosméticos (WANG LI-REN e HUA GUAN BIOCHEMICAL TECH CO LTD, 2015), inseticidas (MOUNTAIN PROVINCE STATE POLYTECHNIC COLLEGE, 2015) e na indústria alimentícia (NESTEC SA, 2014).

Substâncias como a hinoquinina, quercetina e o ácido clorogênico, por exemplo, são encontradas em extratos de espécies vegetais, como: *Hydrocotyle*

leucocephala Cham. & Schltdl. (Araliaceae), *Achillea collina* Becker ex Rchb (Asteraceae), *Spinacia oleracea* L. (Amaranthaceae), *Brassica oleracea* L. (Brassicaceae), *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae), *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner (Rubiaceae) e apresentam propriedades biológicas importantes sob o ponto de vista medicinal (FRANÇA *et al.*, 2005; KOSHIRO *et al.*, 2007; SULTANA e ANWAR, 2008; GIORGI *et al.*, 2010; MÜLLER *et al.*, 2015). A hinoquinina é uma lignana cujas atividades tripanocida, imunomodulatórias, anti-inflamatória e anti-genotóxica foram comprovadas (SILVA *et al.*, 2005; RAMOS *et al.*, 2006; MEDOLA *et al.*, 2007; SARAIVA *et al.*, 2007). Quanto ao flavonol quercetina, existem estudos que comprovam suas atividades antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória, hepatoprotetora e anti-câncer (TAPAS *et al.*, 2008; JOSHI *et al.*, 2011; VEVERKA *et al.*, 2015). Alguns exemplos das atividades biológicas do ácido clorogênico são: antioxidante, inibidor da formação de compostos mutagênicos e inibidor de danos no DNA *in vitro* (CASTELLUCCIO *et al.*, 1995; KONO *et al.*, 1995; SHIBATA *et al.*, 1999; KASAI *et al.*, 2000).

3.5.2.1. Fatores que Influenciam na Composição Química de Extratos Vegetais

Como apresentados em alguns exemplos, assim como os óleos essenciais, a composição química dos extratos vegetais pode ser influenciada por vários fatores, que inclusive, podem alterar suas atividades biológicas. Investigações químicas dos extratos de várias populações de *Capparis orientalis* Veill. e *C. sicula* Veill. ssp. *Sicula* (Capparaceae) demonstraram existir diferenças quanto ao acúmulo de vitamina E, γ -sitosterol, ácido palmítico, substâncias fenólicas, entre outros, em função da espécie e das populações, bem como a existência de variações quanto a atividade antioxidante entre os extratos das populações, podendo isso estar associado à composição de solo, geografia, altitude e exposição solar (CONFORTI *et al.*, 2011).

Müller *et al.* (2015) constataram maior acúmulo de hinoquinina em extratos do caule de *H. leucocephala* quando comparado aos extratos de outros órgãos do vegetal, bem como maior produção da substância em função de radiação UV-B, sugerindo que a mesma contribui para a estabilização das paredes celulares do caule, conferindo maior estabilidade estrutural e resistência aos fatores ambientais. Também foi constatado por Müller *et al.* (2015) maior acúmulo de derivados de quercetina nos extratos das folhas de

plantas da espécie submetidas a altas quantidades de UV-B e PAR (radiação fotossintética ativa), o que pode estar relacionado à habilidade destas substâncias em eliminar espécies reativas de oxigênio e de participarem do processo de aclimação vegetal aos diferentes regimes de luz. Aumento do acúmulo de compostos fenólicos após exposição à radiação UV-B também foi comprovado por Kondo e Kawashima (2000).

Influência da altitude e da radiação também podem causar alterações da propriedade antioxidante e modificar a composição química do extrato de *A. collina*. Em local com maior altitude (e, conseqüentemente de radiação), por exemplo, plantas da espécie acumularam nas folhas maior quantidade de ácidos fenólicos, em particular do ácido clorogênico e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante do que plantas crescidas em local com menor altitude, sugerindo a participação destes compostos no processo de proteção vegetal contra danos oxidativos causados por fatores de estresse relacionados à altitude (GIORGI *et al.*, 2010).

Níveis significantes de variação na composição do extrato de folhas maduras de fenótipos químicos de uma população de *Quararibea asterolepsis* Pitt. (Malvaceae) em função de diferentes escalas espaciais (dois locais de coleta), fontes de variação ambiental (clareiras e sub-bosques) e do desenvolvimento de espécimes (indivíduos juvenis e adultos) foram verificados (BRENES-ARGUEDAS e COLEY, 2005). O principal grupo de metabólitos responsável pela diferença dos espécimes entre os locais de coleta respondeu às mudanças quanto à disponibilidade de luz, sendo acumulados em maior proporção em plantas de clareiras do que aquelas presentes em sub-bosques, ao passo que indivíduos juvenis também apresentaram maior acúmulo destes metabólitos.

Além disso, o fato de indivíduos jovens vegetais apresentarem maior acúmulo de metabólitos em comparação aos adultos é consistente com a hipótese de que defesas são alocadas preferencialmente em função dos estádios ou estruturas consideradas mais vulneráveis ou valiosas (McKEY, 1979; RHOADES, 1979).

3.6. Marcadores Moleculares

Quando o objetivo é a efetiva conservação, manejo e a utilização eficiente dos recursos genéticos vegetais, ter o conhecimento da base molecular dos fenômenos biológicos torna-se crucial (MONDINI *et al.*, 2009), sendo, para isto, utilizados os marcadores moleculares.

Os marcadores moleculares podem ser definidos como locos genéticos que podem ser facilmente rastreados e quantificados em uma população, podendo estar associados com um gene em particular ou um traço de interesse (HAYWARD *et al.*, 2015). Este tipo de marcador proporciona a detecção de genótipos superiores, o acesso a diversidade genética dentro de cultivares e germoplastmas, o exame da genética de espécies ameaçadas de extinção, a realização de análises de sistemas de cruzamento, de eventos gargalos e análises de outras características que podem afetar os padrões de diversidade genética (RAO e HODGKIN, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006; KORDROSTAMI e RAHIMI, 2015).

Devido a sua sensibilidade e especificidade, o uso de marcadores moleculares é cada vez mais frequente e baseia-se na ocorrência natural de polimorfismos no DNA (KUMAR *et al.*, 2009; JINGURA e KAMUSOKO, 2015). O seu uso é o meio mais efetivo para o entendimento da base da diversidade genética (de VICENTE e FULTON, 2003).

Entre as vantagens da utilização dos marcadores moleculares, estão a obtenção de polimorfismos genéticos, identificação direta do genótipo sem a influência do seu ambiente, possibilidade de detecção de polimorfismos independente do *status* fenológico da planta e, no caso de marcadores codominantes, possibilidade de gerar maior quantidade de informação genética por loco (FALEIRO, 2007).

Com a descoberta da técnica de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR- *Polymerase Chain Reaction*) nos anos 80 por Kary Mullis, marcadores de DNA como RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), STS (*Sequence Tagged Sites*), CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) ou PCR-RFLP, SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), PCR-sequencing e SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) surgiram (COUTINHO *et al.*, 2006).

A PCR consiste na replicação enzimática do DNA em laboratório a partir de pequenos fragmentos sintéticos de nucleotídeos, denominados *primers*, complementares as sequências específicas que flanqueiam a região-alvo a ser amplificada (COUTINHO *et al.*, 2006; SARTORETTO e FARIAS, 2010). Em todos os casos, a amplificação do DNA via PCR irá produzir múltiplas bandas que servirão para indicar a presença ou ausência de variação entre indivíduos (SCHLÖTTERER, 2004).

Marcadores codominantes, como RFLP, CAPS, SSCP e os microssatélites permitem fazer distinção entre os locos em heterozigose dos locos em homozigose (FALEIRO, 2007).

3.6.1. Marcadores Microssatélites

Também chamados de SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*), marcadores moleculares microssatélites são formados por sequências curtas de 1-6 bases nitrogenadas repetidas em “*tandem*” (ANTIQUERA, 2013). Codominantes, multialélicos em uma população e bialélicos em um indivíduo, constituem fração considerável do DNA não-codificante e são menos encontrados em regiões codificadoras de proteínas (YOU-CHUN *et al.*, 2002; WAN *et al.*, 2004; MIAH *et al.*, 2013), representando regiões instáveis do genoma distribuídas aleatoriamente (ANTIQUERA, 2013). Podem ser encontrados tanto em eucariotos como em procariotos.

Marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados em estudos de genética de populações vegetais (CHASE *et al.*, 1996; JADWISZCZAK *et al.*, 2012; CRUZ NETO *et al.*, 2014; LAVOR *et al.*, 2014; TANAKA *et al.*, 2014), se mostrando ferramentas extremamente eficientes. Sua frequência é negativamente correlacionada ao tamanho do genoma (MORGANTE *et al.*, 2002) e podem ser classificados como repetições mono-, di-, tri-, tetra- e hexanucleotídicas (WANG *et al.*, 2009; MIAH *et al.*, 2013). De acordo com o tipo de sequência repetitiva podem ser: perfeitos, sem interrupções na sequência, *e.g.*, (AT)₂₀; imperfeitos, quando existe interrupção por diferentes nucleotídeos que alteram o padrão do motivo repetitivo, por exemplo, (AT)₁₂GC(AT)₈; e compostos, onde existem dois ou mais motivos *in tandem*, por exemplo, (AT)₇(GC)₆ (HOSHINO *et al.*, 2012). Em humanos e mamíferos, a repetição mais abundantes é a do dinucleotídeo CA, ao passo que em plantas são os motivos AT/TA (KALIA *et al.*, 2011).

A alta variação genética em muitos locos microssatélites caracteriza-se pela alta heterozigosidade e presença de alelos múltiplos e, por ser um marcador seletivamente neutro, o grau de polimorfismo dos microssatélites é proporcional à taxa de mutação, que é estimada ser de 10^{-2} a 10^{-4} por geração (ELLEGREN, 2004; MIAH *et al.*, 2013). As mutações podem ser explicadas por erros durante a recombinação, *crossing-over* desigual e *slippage* (escorregamento) da polimerase durante recombinação ou reparo (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Quanto à origem, é sugerido que microssatélites podem surgir espontaneamente através de eventos de inserções ou deleções que duplicam as sequências adjacentes, inicialmente formando proto-microssatélites ou através de elementos transponíveis, que inserem formas primitivas de microssatélites em localizações receptivas do genoma (ZHU *et al.*, 2000; WILDER e HOLLOCHER, 2001; KALIA *et al.*, 2011).

A amplificação dos microssatélites é feita por *primers* ou iniciadores específicos, que complementam as regiões que os flanqueiam e cada segmento que é amplificado pode ter um tamanho diferente, correspondendo a um diferente alelo do mesmo loco (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; WAN, *et al.*, 2004). Seus principais atributos são fácil detecção pela reação de cadeia da polimerase (PCR), alto nível de diversidade alélica, natureza multialélica, codominância, alto nível de polimorfismo intraespecífico no loco, relativa abundância, cobertura extensiva do genoma (incluindo genomas organelares), alto rendimento na genotipagem, praticidade na integração e na comparação dos dados obtidos (MCCOUCH *et al.*, 1997; HOSBINO *et al.*, 2002; FALEIRO, 2007; PARIDA *et al.*, 2009; MIAH *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2014).

Microssatélites são extensivamente utilizados em mapeamento genético e populacionais, bem como no estudo de inúmeras questões biológicas, desde nível individual, de família, populacional até de espécie (BUSCHIAZZO e GEMMELL, 2006). A codominância e o elevado polimorfismo, por exemplo, fazem dos microssatélites ideais para estudos de sistemas de cruzamento em populações, auxiliando na determinação da origem do pólen e do quanto de fecundação cruzada ou autofecundação ocorrem intrapopulacionalmente, possibilitando ao pesquisador elaborar estratégias *in situ* e *ex situ* de conservação (HOSBINO *et al.*, 2002).

A enorme diversidade alélica destes marcadores também proporciona caracterização acurada de indivíduos, bem como o monitoramento, ao longo das gerações, da transmissão de genes, acelerando o progresso na estimativa de parâmetros genéticos (CHASE *et al.*, 1996).

Microssatélites também são utilizados para acessar a variação genética em coleções de germoplasma para escolha de genitores em cruzamentos, no mapeamento e marcação de genes, mapeamento de genoma, estudos de estrutura populacional e de relações filogenéticas (KALIA *et al.*, 2011).

3.7. Diversidade Genética

Aplicando das Leis de Mendel e de outros princípios genéticos em nível de populações inteiras de organismos, estudos de genética de populações buscam descrever as frequências alélicas, genóticas e os fatores que influenciam nestas frequências. A combinação de dados moleculares com conjuntos de dados ambientais, biológicos e ecológicos em abordagens multidisciplinares permitem uma visão mais compreensiva dos processos evolucionários que afetam as populações, tais como a deriva genética e a seleção natural (HABEL *et al.*, 2015).

Com este tipo de estudos também é possível ter o entendimento da extensão e distribuição da diversidade genética, essencial para adotar estratégias efetivas de conservação (RAO e HODGKIN, 2002). A diversidade genética é a variação de alelos ou genótipos em um grupo de estudo e é frequentemente descrita através do polimorfismo (presença em uma espécie de dois ou mais alelos em um loco, onde o alelo mais comum tem frequência inferior a 0.99 ou 0.95), das heterozigosidades (observada e esperada) e da diversidade alélica (FRANKHAM *et al.*, 2004; ALLENDORF e LUIKART, 2007).

Por definição, a heterozigosidade observada (H_O) é a proporção observada de heterozigotos e a heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E), também conhecida como diversidade gênica (D), a proporção esperada de heterozigotos levando em conta a premissa de cruzamento aleatório (ALLENDORF e LUIKART, 2007). Para um único loco, $H_E = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$, onde p_i é a frequência do i -ésimo alelo dos n alelos em um loco e $H_O = 1 - \sum p_{ii}$, onde p_{ii} é a frequência observada de genótipos homozigotos do alelo i .

Em uma população x para múltiplos locos, dados médios de H_E e H_O são a média aritmética sobre todos os locos e as divergências entre H_O e H_E podem ser utilizadas para inferir sobre a dinâmica populacional (por exemplo, excesso ou deficiência de heterozigotos na população).

Como o número de alelos é altamente dependente do tamanho amostral (*e.g.* em maiores subpopulações espera-se maior quantidade de alelos) e resultados da comparação entre amostras de diferentes tamanhos podem ser viesados (ALLENDORF e LUIKART, 2007), o cálculo da riqueza alélica utilizando rarefação (R_A) é uma alternativa.

Este método compara a quantidade de alelos de amostras com diferentes tamanhos, usualmente com base no menor tamanho amostral.

Juntos, H_O , H_E e R_A podem servir para descobrir como o fluxo gênico pode ser direcionado entre subpopulações. Em níveis suficientes, o fluxo gênico tende a homogeneizar as frequências alélicas (ELLSTRAND, 2014), mantendo o polimorfismo e a diversidade genética; o que conseqüentemente, exerce efeito na estrutura populacional.

O fluxo gênico pode ser quantificado via métodos indiretos e diretos, sendo os diretos via corantes, marcadores morfológicos e análise de paternidade e os indiretos via o F_{ST} , alelos privados, autocorrelação espacial e coalescência (ZUCCHI, 2002).

Através do F_{ST} , por exemplo, o número de migrantes por geração ou fluxo gênico aparente (Nm) (WRIGHT, 1951) é $Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$, onde m é a taxa de migração, N o tamanho populacional, Nm o número de migrantes/geração e F_{ST} a proporção da variância genética total contida em uma subpopulação (S) em relação ao da variância genética total (T) (MALLETT, 2001).

Através da mutação também pode ocorrer ganho de diversidade genética (AMOS e HARWOOD, 1998; YANG *et al.*, 2015). Este fator gera continuamente variação genética, mas a nova mutação persistirá somente se for benéfica ao indivíduo (WRIGHT, 2005).

Em última análise, todos os alelos em todos os locos presentes em qualquer população surgiram como mutações (JOHNSTON, 2001) e três são os modelos propostos para explicar o papel da mutação na evolução de marcadores moleculares, o IAM (*Infinite Alleles Model*) (KIMURA e CROW, 1964), o SMM (*Stepwise Mutation Model*) (KIMURA e OHTA, 1978) e o TPM (*Two-Phase Model*) (DI RIENZO *et al.*, 1994). O IAM assume que cada novo alelo mutante é considerado diferente daquele que já existe na população (TAJIMA, 1996). No SMM, um novo alelo (microssatélite) tem origem a partir do momento em que ocorre o ganho ou a perda de uma repetição (SAINUDIIN *et al.*, 2004), ao passo que no TPM as mutações podem introduzir perda ou ganho de múltiplas unidades de repetição, sendo o mais apropriado para microssatélites.

Mutação e fluxo gênico podem garantir o processo evolucionário de populações ou espécies, conferindo aos indivíduos habilidade de responder às ameaças de doenças, predadores, parasitas e mudanças ambientais (AMOS e HARWOOD, 1998). Uma vez que as diferenças no genótipo conferem aos indivíduos capacidades de sobrevivência e

reprodução diferenciais, através da seleção natural os alelos que aumentam o *fitness* aumentam gradualmente em frequência de geração a geração (HARTL e CLARK, 2010).

Em contrapartida, a deriva genética pode resultar em diminuição da diversidade genética dentro de populações e aumento de diferenciação interpopulacional (COLE, 2003; HUANG *et al.*, 2009b), tratando-se de uma flutuação aleatória das frequências alélicas, que pode levar à fixação (homozigose) e consequente redução do potencial evolucionário, principalmente, de populações pequenas (FRANKHAM, *et al.*, 2004).

O sistema de cruzamento, a distribuição espacial e os fatores demográficos também devem ser considerados importantes no processo de distribuição da variação genética. O efeito gargalo, por exemplo, faz que uma população seja descendente de poucos antecedentes, gerando perda de diversidade genética.

3.8. Estrutura Genética Populacional

A estrutura populacional é caracterizada pelo número de subpopulações intrínsecas à população, bem como pela frequência dos diferentes alelos em cada subpopulação e o grau de isolamento genético destas (CHAKRABORTY, 1993). Trata-se, portanto, do desenvolvimento de uma distribuição não aleatória dos alelos em uma dada escala espacial que é resultante da dispersão limitada de indivíduos, da seleção, deriva genética e do histórico da população (ALBERTO *et al.*, 2005).

Os efeitos do cruzamento não aleatório sobre as frequências genotípicas podem ser medidos pela comparação da frequência esperada de heterozigotos em equilíbrio HW (H_E) com a observada (H_0) através do índice de fixação (F), onde $F = \frac{H_E - H_0}{H_E}$. Este índice compara quanto de heterozigosidade está presente em uma atual subpopulação relativo aos níveis esperados de heterozigosidade levando em conta cruzamento ao acaso (HAMILTON, 2009).

Valores de F variam entre uma escala de +1 a -1 e valores próximos a +1 indicam excesso de homozigotos e de -1 excesso de heterozigotos.

As extensões de F são as estimativas F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} e são conhecidas como Estatísticas-F ou Índices de Fixação de Wright (WRIGHT, 1951, 1965). Elas podem ser utilizadas para o estudo de casos mais complexos, envolvendo múltiplas subpopulações, onde existem desvios das frequências esperadas de heterozigotos em nível inter e

intrasubpopulacional, devido à estrutura populacional e cruzamento não aleatório, respectivamente (HAMILTON, 2009). Estes parâmetros são os mais amplamente utilizados para descrever estrutura populacional.

Através do F_{IS} é possível caracterizar o nível médio de endogamia relativo às subpopulações (coeficiente de endogamia), sendo $F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S}$, onde H_S é a heterozigosidade média esperada das subpopulações assumindo cruzamento aleatório dentro de cada subpopulação e H_I a heterozigosidade média observada das subpopulações (HAMILTON, 2009). Com o F_{ST} estima-se o coeficiente de endogamia devido à diferenciação entre as subpopulações em relação à população total, sendo $F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$, onde H_T é a heterozigosidade esperada da população total assumindo cruzamento ao acaso dentro das subpopulações e nenhuma divergência das frequências alélicas entre subpopulações, sendo $H_T = 2\bar{p}\bar{q}$, onde $\bar{p}\bar{q}$ são as frequências alélicas médias para todas as subpopulações (HAMILTON, 2009).

Amplitudes do F_{ST} podem ser classificadas em diferentes formas, implicando em diferentes consequências biológicas para a espécie quanto à estruturação genética. Segundo Wright (1978), um valor de F_{ST} variando de 0 a 0.05 é indicativo de *pequena* diferenciação genética, entre 0.05 a 0.15 é um indicativo de ocorrência de *moderada* diferenciação genética, entre 0.15 a 0.25 a diferenciação genética pode ser considerada *grande*, ao passo que valores de F_{ST} acima de 0.25 são resultados de uma diferenciação genética *muito grande* entre subpopulações.

Com o F_{IT} estima-se o coeficiente de fixação total, onde $F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$, referindo-se aos indivíduos em relação à população total (HAMILTON, 2009). As estatísticas F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} são medidas análogas às estimativas f , θ e o F de Weir e Cockerham (1984).

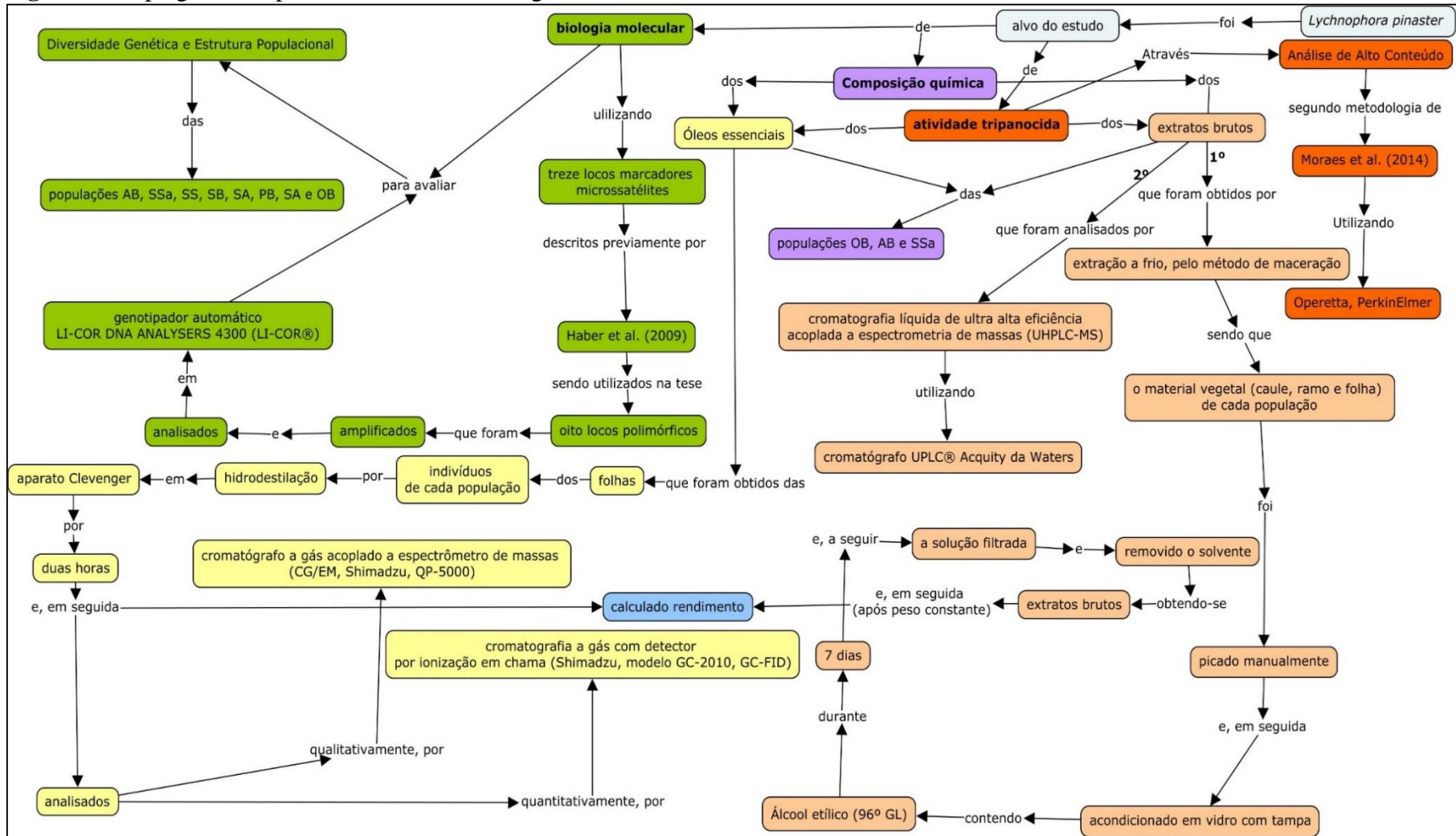
Com base na estatística bayesiana levando em conta o método MCMC (Monte Carlo via cadeias de Markov), pacotes estatísticos, como, por exemplo, o STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000) também são utilizados para o estudo de estrutura populacional, atribuição de indivíduos a populações e identificação de migrantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este tópico é dividido em três seções, referentes às metodologias do estudo genético (biologia molecular) (seção 4.1.), estudo de composição química dos óleos essenciais e extratos (seção 4.2.) e estudo *in vitro* da atividade tripanocida dos óleos essenciais e extratos de *L. pinaster* (seção 4.3.).

A Figura 3 mostra um mapa geral dos procedimentos metodológicos utilizados, sendo que as caixas em verde indicam o esquema geral do estudo de biologia molecular; as caixas em amarelo, o esquema geral do estudo de composição química dos óleos essenciais; as caixas em rosa, o esquema geral do estudo de composição química dos extratos; e as caixas em laranjado, o esquema geral do estudo da atividade tripanocida *in vitro* dos óleos essenciais e dos extratos de *L. pinaster*.

Figura 3. Mapa geral dos procedimentos metodológicos utilizados.



4.1. Estudo de Diversidade Genética e Estrutura Populacional de *Lychnophora pinaster* utilizando Marcadores SSR

4.1.1. Coleta do Material Vegetal

Foram coletadas, nos anos de 2011, 2012 e 2015, folhas jovens de sete populações naturais de *L. pinaster* distribuídas ao longo das regiões sul e sudeste do Estado de Minas Gerais (FIGURA 4) denominadas de Poço Bonito (PB); Serra do Sofá (SS); Serra da Arnica (SA); Serra do Salto (SSa); Serra Branca (SB); Areia Branca (AB) e Ouro Branco (OB). A distância entre populações variou de no mínimo, aproximadamente, 1.6 km entre as populações SB e AB, e no máximo, aproximadamente, 152 km entre OB e as populações provenientes da região sul (PB, SS, SA, SSa, SB, AB). A altitude variou de 940 m (população SS) até 1292 m (população SSa) (TABELA 2).

Figura 4. As sete populações de *Lychnophora pinaster* utilizadas. Destacadas em laranja as populações (OB, AB, SSa) coletadas para o estudo de composição química dos óleos essenciais e extratos.



Tabela 2. Origem e dados de coleta das populações nativas de *Lychnophora pinaster*, Minas Gerais, Brasil.

Nome da população	Sigla	Número de indivíduos	Localidade /Região	Posição Geográfica		Altitude (m)	Número do Voucher
				Latitude (S)	Longitude (W)		
Poço Bonito	PB	20	Ingaí-Lavras/Sul	21°20'03.6"	44°58'20.5"	1044	UEC 167209
Serra do Sofá	SS	28	Ingaí-Itumirim/Sul	21°21'30.4"	44°51'31.4"	940	UEC 167208
Serra da Arnica	AS	25	Luminárias-Ingaí/Sul	21°26'40.56"	44°56'29.9"	1055	UEC 179320
Serra do Salto	SSa	25	Carrancas/Sul	21°26'55.25"	44°38'17.54"	1292	UEC 179322
Serra Branca	SB	25	Carrancas/Sul	21°26'44.96"	44°35'15.95"	1124	UEC 179321
Areia Branca	AB	25	Carrancas/Sul	21°27'26"	44°35'48.85"	1143	UEC 167207
Ouro Branco	OB	38	Moeda-Itabirito/Sudeste	20°20'19.6"	43°55'32.5"	1240	UEC 8
Total		186					

O número de indivíduos coletados variou por população (TABELA 2). Cada indivíduo foi etiquetado e dele foram obtidas as respectivas coordenadas geográficas (ANEXO). As folhas de *L. pinaster* coletadas foram armazenadas, individualmente, em tubos Falcon (50 mL) contendo sílica-gel e conduzidas ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico, Campinas - SP, onde foram armazenadas a -80°C até extração do DNA.

Foram preparadas exsiccatas das sete populações amostradas e depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas (TABELA 2). A identificação botânica da espécie foi feita pelo Prof. Dr. João Semir do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, especialista no gênero *Lychnophora*.

4.1.2. Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA dos 186 indivíduos de *L. pinaster* foi feita a partir de 10 mg de material vegetal, previamente triturado em nitrogênio líquido, momentos antes de iniciar o procedimento de extração do DNA, utilizando protocolo CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990), com modificações, conforme a seguir.

Em tubos de 2 mL identificados para cada indivíduo foi colocado o material vegetal triturado e adicionados 1 mL de tampão de extração CTAB 2%, pré-aquecido a 65°C, contendo: água Milli-Q (q.s.p.); TRIS (tris- (hidroximetil-aminometano)) – HCl pH 8.0 100 mM; NaCl 1.42 M; CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) 2%; EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 20 mM pH 8; β-mercaptoetanol 0.2%; PVP (polivinilpirrolidona) 2%. Os tubos com tampão de extração + DNA foram fechados e agitados para homogeneização do tecido e, posteriormente, aquecidos em banho-maria (65°C) por 60 minutos e, agitados a cada 15 minutos.

A mistura foi resfriada em temperatura ambiente, a seguir foram adicionados 900 µL de clorofórmio-isoamílico (24:1), agitando-se levemente os tubos até a formação de uma emulsão homogênea, sendo, então, centrifugados por 5 minutos a 10000 rpm; para a desnaturação e precipitação das proteínas. O sobrenadante (360 µL) foi transferido para tubos de 1.5 mL devidamente identificados, adicionando-se, nesta etapa, 500 µL de isopropanol (2-propanol) gelado, misturando levemente até formar um precipitado. Os tubos foram mantidos à -20°C por 30 minutos e, depois, centrifugados durante 10 minutos a 10000 rpm, Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado

(*pellet*) posto para secar em temperatura ambiente por 15 minutos. As próximas etapas constituíram: lavagem do *pellet*, com a adição de 500 μL de etanol 70% seguida por centrifugação durante 7 minutos a 12000 rpm e retirada do sobrenadante; adição de 500 μL de etanol 95% seguida por centrifugação durante 7 minutos a 12000 rpm e retirada do sobrenadante; secagem do *pellet* em temperatura ambiente; dissolução dos *pellets* utilizando 60 μL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) acrescido de 2 μL RNase (10mg/mL); adição das amostras em banho-maria a 37°C por 60 minutos para atividade da RNase e, depois, as amostras foram deixadas sobre bancada *overnight* a temperatura ambiente e, por fim, armazenadas em freezer à -20°C .

No Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, *Campus* de Piracicaba – SP, foi feita verificação das amostras dos DNAs em eletroforese com gel de agarose 1%, corado com Syber Green®. A visualização da quantificação de DNA foi por meio de um transluminador ultravioleta e a quantificação realizada por meio de comparações entre o tamanho e a intensidade das bandas do DNA com as bandas de concentrações conhecidas de DNA do fago λ (12.5, 25, 50, 100 e 200 ng/ μL).

Após a quantificação do DNA extraído, realizou-se diluição das amostras com água ultra-pura até a concentração de trabalho, aproximadamente, 5 ng/ μL .

4.1.3. Amplificação e Determinação dos Microssatélites

Treze locos microssatélites descritos e testados durante *screening* preliminar em *L. pinaster* (HABER *et al.*, 2009) foram avaliados. Foram utilizados para análise oito locos que apresentaram polimorfismo (TABELA 3).

Tabela 3. Marcadores microssatélites utilizados, sequência dos *primers*, motivo, classificação do motivo, produto (pb) e nº de acesso no Genbank.

<i>Primer</i>	Sequência	Motivo	Classificação	Produto (pb)	Nº acesso no Genbank
Lpin 4	F: CGG GTC ACA TAT TAC TCG CC R: ATA ATG GGC TCC ACG AAA CA	(AC) ₅ (AG) ₂₀	Composto interrompido	161	BV722920
Lpin 6	F: AGT TCA GCT GTT TAG GGG CA R: GCT GGA ACC CGT TAT TGC TA	(TA) ₅ (AC) ₁₆	Composto interrompido	284	BV722922
Lpin 9	F: GGT TGG CGA AAG ACA GAG AA R: CAC AAT CCT AGC CCA ACC AC	(AAAA) ₂ (AAAAG) ₂ (GA) ₁₄ (AAAGG) ₂	Composto interrompido	268	BV722924
Lpin 11	F: GCA CGG CTG GTC ACT AAT CT R: GAA GTT CCA TGG CCT ACC AA	(TC) ₁₁	Perfeito	230	BV722926
Lpin 13	F: TTG AAG GCT CAA GGT TTT GG R: CCC ATC GCA CCG AAT AAT AA	(TC) ₁₉	Perfeito	296	BV722927
Lpin 14	F: TAG TGC CAA AGA GCA GCA AA R: CAA AAA TGG GTC TCT TTT CAT TTC	(CT) ₂₂	Perfeito	182	BV722928
Lpin 16	CGG TTT GGA CAA AAA GGT GG GAT TGG GAG ATT TGG AAG CA	(TC) ₇ (ATTTG) ₂ (TTG) ₅ (TTG) ₄	Composto interrompido	179	BV722929
Lpin 17	F: AGA ACG AAT CAT ACG GGT GC R: CCA AAG AGC AGA AGG ATT GC	(ACCTG) ₂ (AC) ₁₄	Composto interrompido	179	BV722930

*Desenvolvido por Harber *et al.* (2009).

As reações de polimerase em cadeia (PCRs) foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 2 µL de *buffer* 10X; 1.0 µL de dNTPs 2.5 mM; 0.4 µL de BSA 2.5 mM; 0.2 µL de cauda M13 10 mM (CACGACGTTGTAAAACGAC), complementar às sondas contendo fluorescências IRDye700 e IRDye800; 1 µL de DNA molde \cong 5ng/µL; 1 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Variou-se o volume de *primer* 10 mM, o volume e a concentração de MgCl₂ (25-50 mM) e, também, variou-se a temperatura de anelamento (50-52°C) (TABELA 4). O volume final da reação foi completado com água ultra-pura.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Bio-Rad My Cycler) e, para os *primers* Lpin 4 a 16, foi utilizada a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 2 min; 32 ciclos de 94°C por 1 min, temperatura apropriada de anelamento por 1 min, 72°C por 10 min. Para o *primer* Lpin 17 a programação utilizada foi: desnaturação inicial a 95°C por 5 min; 10 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 45 s, 72°C por 45 s; 30 ciclos de 94°C por 30 min, 40°C por 45 s, 72°C por 45 s, 72°C por 10 min.

Tabela 4. Condições para amplificação dos *primers*. Temperatura de anelamento (TA), volumes (μL) e concentração de MgCl_2 , volume de primers *forward* (F) e *reverse* (R), tipo de fluoróforo (M13) e volume de Taq DNA polimerase utilizados para amplificação dos oito locos microssatélites utilizados na genotipagem dos 186 indivíduos de *Lychnophora pinaster*.

Nº <i>Primer</i>	TA (°C)	MgCl ₂		F (10 mM)	R (10 mM)	M13 (10 mM)	
		μL	mM	mM	μL	IRDye700	IRDye800
Lpin 4	50	1.6	X		0.32	0.4	X
Lpin 6	50	1.0		X	0.32	0.4	X
Lpin 9	52	1.0		X	0.32	0.4	X
Lpin 11	50	1.3		X	0.32	0.4	X
Lpin 13	50	1.0		X	0.32	0.4	X
Lpin 14	50	1.0		X	0.32	0.4	X
Lpin 16	50	1.0	X		0.32	0.4	X
Lpin 17	50	3.0	X		1.00	1.00	X

*X= na coluna, indica as concentrações de MgCl_2 ou o fluoróforo utilizados.

A eletroforese foi feita em genotipador automático LI-COR DNA ANALYSERS 4300 (LI-COR®) em gel de poliacrilamida 6.5% pré-aquecido por 30 min. 0.25 μL de um marcador 10 mM contendo fragmentos de 50 a 350 pb marcados com fluorescências IRDye700 e IRDye800 também foi aplicado. Imagens em formato eletrônico dos géis foram geradas automaticamente durante a eletroforese para cada um dos pares de *primers* e, posteriormente, as imagens utilizadas para determinação do tamanho dos alelos obtidos em cada loco através dos programas SAGA LITE e SAGA MX GENERATION (LICOR®) (mapa metodológico FIGURA 3).

4.1.4. Análises Estatísticas

4.1.4.1. Variabilidade genética

Níveis de diversidade genética dentro e entre populações foram descritos pelo cálculo dos seguintes parâmetros: frequência alélica, A_T : número total de alelos; A : número médio de alelos por população; A_P : alelos privados; A_R : alelos raros; H_O : heterozigosidade observada; H_E : heterozigosidade esperada; F_{IS} : coeficiente de endogamia; T_a : Taxa de cruzamento aparente; R_A : riqueza alélica. As estimativas A_T , H_O , H_E , R_A e F_{IS} foram estimados para cada população utilizando o pacote DIVERSITY (KEENAN *et al.*,

2013) da plataforma R v. 3.1.2, e A_P através do *software* GDA (LEWIS e ZAYKIN, 2001). Os intervalos de confiança foram obtidos por meio de 1000 reamostragens *bootstrap*. Como as populações apresentaram tamanhos amostrais diferentes, as estimativas de R_A foram corrigidas com base no menor tamanho amostral através de rarefação (HURLBERT, 1971). T_a foi estimada conforme procedimento descrito por Weir (1996) e Vencovsky (1994), de acordo com a equação:

$$T_a = 1 - \frac{(1-f)}{(1+f)}$$

Onde T_a = taxa de cruzamento aparente e f = índice de fixação da espécie.

O f de Weir e Cockerham (1984) (análogo ao F_{IS} de Wright) foi estimado pelo *software* FSTAT v. 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). O teste exato, feito para verificar se as populações aderem às proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e o teste para a detecção de desequilíbrio de ligação (DL) foram ambos feitos através do *software* GENEPOP v. 3.1 (RAYMOND e ROUSSET, 1995). DL foi estimado segundo Guo e Thompson (1992), mediante o algoritmo da cadeia de Monte Carlo Markov (100 *batches*, 5000 iterações). Foi aplicada correção de Bonferroni (HOLM, 1979) ajustando-se o nível de significância (5%) ao número de testes aplicados.

4.1.4.2. Estrutura Populacional

O *software* FSTAT v. 2.9.3.2 (GOUDET, 1995) também foi usado para estimar o θ de Weir e Cockerham (1984) (equivalente ao F_{ST} de Wright). A correção de θ (WEIR e COCKERHAM, 1984) para alelos nulos foi calculada utilizando o *software* FREENA (CHAPUIS e STOUP, 2007). O F_{ST} par a par e os intervalos de confiança (1000 *bootstraps*) foram estimados pelo pacote HIERFSTAT (GOUDET, 2005) da plataforma R. Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada pelo *software* ARLEQUIN v. 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) e a inferência sobre o fluxo gênico feita pelo método indireto do F_{ST} , sendo estimado o número de migrantes por geração (Nm) (WRIGHT, 1951) para o conjunto de populações estudadas.

A estrutura das populações também foi avaliada pelo método de agrupamento Bayesiano utilizando o programa STRUCTURE v. 2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000). O número mais provável de *clusters* (K) foi determinado pelo condicionamento dos dados a valores de K variando de 1 a 10, 500.000 *burn in* e 10^6 iterações, repetidos 20 vezes. Para determinar o número mais provável de K foi utilizado o método de Evanno *et al.* (2005) baseado na medida *ad hoc* ΔK pelo *software* online STRUCTURE HARVESTER v. 0.6.93 (EARL e VON HOLDT, 2012).

A correlação das matrizes de distâncias “genética vs geográfica” e “genética vs altitude” foi realizada pelo teste de Mantel utilizando o método de Monte Carlo com 1000 permutações e o índice de correlação de Pearson ao nível de 5% de significância através do *software* PAST v. 3 (HAMMER *et al.*, 2001). As matrizes de distância geográfica e de altitude entre populações foram calculadas através do *software* PROGRID v. 1.1, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), utilizando como dados de entradas os parâmetros latitude, longitude e altitude, registrados para cada indivíduo. A matriz de distância genética de Nei (1972) foi calculada através do pacote ADEGENET (JOMBART, 2008) da plataforma R v.3.1.2.

Foram utilizados dois métodos para detectar potencial redução de tamanhos populacionais pelo *software* BOTTLENECK v. 1. 2. 02 (CORNUET e LUIKART, 1996; PIRY *et al.*, 1999), onde recente redução do tamanho populacional efetivo foi testada sobre o modelo de duas fases (*Two Phase Model* ou TPM) (DI RIENZO *et al.*, 1994) e o modelo de mutação *stepwise* (*Stepwise Mutation Model* ou SMM) (KIMURA e OHTA, 1978). A significância levando em conta TPM e SMM foi estimada usando o teste *Two-tailed* de Wilcoxon e o teste de Sinal.

4.2. Estudo da Composição Química dos Óleos Essenciais e dos Extratos Etanólicos das Populações de *Lychnophora pinaster*

Para o estudo da caracterização química de *L. pinaster* foram selecionadas três populações, as quais foram coletadas em fevereiro de 2015, com base nos resultados do estudo genético, sendo o critério de escolha características genéticas diferenciadas. Foram escolhidas, portanto, a população da região sudeste (Ouro Branco, OB), localizada entre os municípios de Moeda e Itabirito, e duas da região sul (Areia Branca, Serra do Salto; AB, Ssa), localizadas no município de Carrancas (FIGURA 4).

Partes aéreas (aproximadamente 150g) dos indivíduos das populações OB, SSa, AB foram coletadas. Os indivíduos amostrados nas três populações foram os mesmos coletados no estudo genético (TABELA 2).

Para o estudo da caracterização dos princípios ativos dos extratos etanólicos foram coletadas partes aéreas de uma amostra composta de indivíduos das populações OB, SSa e AB, consistindo em uma amostra por população.

4.2.1. Coleta e Beneficiamento do Material Vegetal

O material vegetal coletado dos indivíduos de *L. pinaster* para o estudo dos óleos essenciais (total 55 indivíduos: 27 em OB, 11 em AB e 17 em SSa) foi armazenado, individualmente, em sacos plásticos identificados e transportados ao Laboratório de Produtos Naturais do Instituto Agronômico, Campinas - SP. O mesmo procedimento foi adotado para as amostras (amostra composta das populações) destinadas ao preparo dos extratos (1 amostra por população).

4.2.2. Análise dos Solos dos Locais de Coleta das Populações

A caracterização quanto à fertilidade dos solos dos três locais de coleta foi realizada com base na análise química de macro e micronutrientes. Foram coletadas aleatoriamente quatro amostras do solo da área de coleta da população OB com pá, devido ao solo superficial e pedregoso, que impossibilitou o uso de trado e a coleta do solo a 20 cm de profundidade, que é o procedimento padrão. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Solos da Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu/SP.

Os dados das amostras de solo das populações AB ($n=10$) e SSa ($n=9$) foram obtidos de estudos prévios (ISOBE, 2012; SILVA, 2013). O procedimento de coleta e da análise da fertilidade do solo foram os mesmos realizados para a população OB.

4.2.3. Extração dos Óleos Essenciais das Folhas

Os óleos essenciais das folhas de cada indivíduo foram então extraídos por meio de hidrodestilação em aparato Clevenger por período de duas horas. Após

extração, os óleos essenciais foram armazenados em frascos de vidro de 5 mL, e mantidos a 4°C até o momento do cálculo de rendimento e da análise de composição química (mapa metodológico FIGURA 3).

O rendimento de óleo essencial foi calculado individualmente em base seca de material vegetal. A umidade do material vegetal de cada indivíduo utilizado nas extrações de óleo essencial foi obtida a partir da secagem de 4g de folhas, em triplicata, acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada de ar a 40°C até obtenção de peso constante.

4.2.4. Análise da Composição Química dos Óleos Essenciais

As análises qualitativas dos óleos essenciais foram realizadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS, Shimadzu, QP-5000), dotado de coluna capilar de sílica fundida OV - 5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.), operando por impacto de elétrons (70 eV), injetor a 240°C, detector a 230°C, modo de injeção split (1/20).

Os óleos essenciais foram diluídos em acetato de etila (1 mg óleo essencial/ 1 mL solvente), grau cromatográfico, hélio como gás de arraste (1.0 mL/min.), volume de injeção (1 µL) e o seguinte programa de temperatura: 60°C - 180°C, 3°C. min⁻¹; 180°C - 240°C, 10°C. min⁻¹ para as populações AB e SSa, e para OB 60°C - 240°C, 3°C. min⁻¹. As análises foram feitas em triplicata.

A quantificação dos óleos essenciais pelo método de normalização de áreas foi conduzida por cromatografia a gás com detector por ionização em chama (Shimadzu, modelo GC-2010, GC-FID), empregando-se as mesmas condições operacionais das análises por GC-MS.

Os índices de retenção foram obtidos por meio da injeção de uma série de *n*-alcanos (C₉-C₂₄ - Sigma Aldrich 99%), aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963).

A identificação dos constituintes químicos foi efetuada através da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema CG/EM (NIST 62.lib) e índices de retenção (ADAMS, 2007).

O rendimento dos extratos etanólicos foi calculado seguindo a mesma metodologia para os óleos essenciais. Porém, para este caso, o cálculo foi realizado em base seca de amostras compostas de cada população.

4.2.4.1 Análises Estatísticas

As diferenças entre altitudes e rendimentos médios populacionais dos óleos essenciais foram avaliadas através de análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, *software* XLSTAT v.2015 (ADDINSOFT®, 2015).

Para análise interpopulacional da composição química do óleo essencial e dos solos de origem foram utilizadas Análise de Componentes Principais (PCA), Análise de Cluster Aglomerativa Hierárquica (HCA) (algoritmo UPGMA, índice de dissimilaridade da distância Euclidiana) e Análise Discriminante (DA), *software* XLSTAT v.2015 (ADDINSOFT®, 2015).

Para as análises multivariadas foi realizado pré-processamento dos dados utilizando autoescalamiento (AS), onde matrizes $X_{ij(AS)}$ foram obtidas quando os parâmetros originais de cada amostra da matriz X_{ij} foram subtraídos da média \bar{X}_j e divididos pelo desvio padrão S_j da variável ($X_{ij(AS)} = X_{ij} - \bar{X}_j / S_j$), tendo média igual a zero (0) e desvio padrão igual a um (1).

Nos modelos DA os dados autoescalados foram submetidos à MANOVA (Teste do Lambda de Wilks Multivariado, $\alpha = 0.05$) e, em seguida, foi feito o Teste de Igualdade das Médias das Classes (UTEMC) para avaliar a igualdade ou não das médias entre classes da DA variável por variável, *software* XLSTAT v.2015 (ADDINSOFT®, 2015).

Através da Análise de Redundância (RDA) foi analisado se a variação contida no óleo essencial de *L. pinaster* tende a ser explicada pelos fatores altitude, latitude, longitude e composição dos solos de origem das populações. As análises RDA foram conduzidas através do *software* XLSTAT v.2015 (ADDINSOFT®, 2015). O teste de permutação de Monte Carlo foi aplicado considerando 500 permutações aleatórias para avaliar a existência ou não de relação linear (p -valor < 0.005) entre as matrizes.

A análise de correlação entre os dados genéticos (SSR), químicos (dados óleos essenciais) e distância geográfica (latitude; longitude) foi realizada também

pela correlação simples e parcial das matrizes das distâncias Euclidianas (10.000 permutações), onde se estimou a correlação entre duas matrizes e, posteriormente, controlou o efeito de uma terceira. Foi utilizado o *software* XLSTAT v.2015 (ADDINSOFT®, 2015) para o cálculo das distâncias Euclidianas e a realização dos testes de Mantel e Mantel parcial.

4.2.5. Obtenção dos Extratos Etanólicos

O procedimento para obtenção dos extratos se deu por extração a frio, pelo método de maceração.

Material vegetal (caule, ramos e folhas) de cada população, previamente seco a temperatura ambiente, foi picado manualmente com tesoura de poda e acondicionado em frasco de vidro com tampa. A seguir foi adicionado álcool etílico 96° GL até completa imersão do material vegetal e a solução mantida a temperatura ambiente, por sete dias. Para a população OB foram utilizados 880.7 g de material vegetal e 17 L de etanol; população SSa, 721.5 g de material vegetal e 10.5 L de etanol; para a população AB, 1203.5 g de material vegetal e 14.5 L de etanol.

A seguir, a solução foi filtrada em papel filtro e o solvente removido em evaporador rotativo a temperatura de 60°C. Os extratos foram armazenados em frascos de vidro e acondicionados em dessecador até obtenção de peso constante para o cálculo do rendimento e análise da composição química (mapa metodológico FIGURA 3).

4.2.6. Análise dos Extratos por UHPLC-MS

As análises dos princípios ativos dos extratos pertencentes as classes dos fenilpropanóides, sesquiterpenos, lactona sesquiterpênica, flavona e flavonol (TABELA 1) foram realizadas por Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UHPLC-MS) no Laboratório de Metabolômica e Espectrometria de Massas (LabMetaMass) do Instituto de Biologia da Unicamp.

Para as análises foi utilizado um Cromatógrafo UPLC® Acquity da Waters. A coluna utilizada foi uma C18 BEH Acquity da Waters (1.7 µm x 2.1 mm x 50 mm) com temperatura do forno em 30 °C. A eluição das amostras foi feita por gradiente, com fluxo de 200 µL min⁻¹, utilizando como fase móvel-A água purificada (Milli-Q) com

0.1% de ácido fórmico e como fase móvel-B metanol (grau cromatográfico), conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Gradiente otimizado para análise do extrato etanólico por UHPLC-MS. Fase móvel A- água purificada (Milli-Q) com 0.1 % de ácido fórmico e como fase móvel B- metanol

Tempo (min)	%A (H ₂ O)	%B (MeOH)
Inicial	95.0	5.0
8.00	0.0	100.0
8.50	0.0	100.0
8.60	95.0	5.0
10	95.0	5.0

Foi usado um espectrômetro de massas triplo-quadrupolar (TQD-Acquity da Waters) com ionização por eletrospray (ESI) realizando varredura em modo negativo nas seguintes condições: capilar de 3000 V, cone de 35 V, extrator de 1.0 V, temperatura da fonte de 150 °C e temperatura de dessolvatação de 300 °C. Espectros ESI-MS/MS em modo negativo foram adquiridos para os íons dos princípios ativos da Tabela 1 que foram registrados nas amostras.

Para tanto, foram pesados em *vials* 9.4, 9.2 e 8.9 mg de amostras dos extratos das populações AB, OB e SSa, respectivamente. As amostras foram diluídas em 1000 µL de metanol, grau cromatográfico, e homogeneizadas em ultrassom por aproximadamente 5 minutos, sendo designadas de solução estoque. Alíquotas de 100 µL das soluções estoque foram transferidas para *vials* de 2 mL e adicionados 900 µL de metanol. Alíquotas de 10 µL de cada amostra foram injetadas em UHPLC-MS para a realização do *fingerprinting*, que foi realizado sem separação cromatográfica, por espectrometria de massas, com ionização por electrospray (ESI) e injeção direta por seringa.

Em seguida, a separação cromatográfica foi utilizada para a busca dos íons dos princípios ativos da Tabela 1 (pag. 35) utilizando o recurso Cromatograma de Íons Extraídos (XIC, *Extracted Ion Chromatogram*). Para tanto, alíquotas de 100 µL das amostras de extratos inicialmente diluídas em metanol (solução estoque) foram transferidas para *vials* e diluídas com 900 µL de água Milli-Q e, destas alíquotas de 7 µL injetadas no UHPLC-MS.

Para a identificação dos princípios ativos foram utilizados os padrões comerciais da quercetina (1.4 mg) (Sigma, 98%), vitexina (1 mg) e do ácido clorogênico

(1.3 mg) (Sigma, 95%). Adicionalmente, foram utilizados os padrões da rutina (1.5 mg) (Sigma, 95%) e do ácido *p*-cumárico (1 mg) (Sigma-Aldrich, 99%)

Alíquotas de 7.0 µL de uma solução contendo cerca de 100 µg de cada padrão (valores corrigidos pelo peso exato utilizado de cada padrão inicialmente) por mL de água Milli-Q foram injetadas em UHPLC-MS para a determinação dos tempos de retenção (t_R). Os t_{Rs} dos padrões foram comparados com os dos princípios ativos dos extratos.

A análise quantitativa dos analitos foi feita pelo método de padrão externo. Para a curva de calibração foram preparadas soluções nas seguintes concentrações: quercetina (0.14, 0.7, 1.4, 7 e 14 µg/mL), ácido clorogênico (0.065, 0.13, 0.65, 1.3 e 6.5 µg/mL) e ácido *p*-cumárico (0.05, 0.1, 0.5 e 1 µg/mL) em água Mili-Q. Foram injetadas 7 µL de cada solução-padrão nas mesmas condições operacionais dos extratos.

As análises dos princípios ativos pertencentes às classes dos triterpenos e esteróides (TABELA 1) foram realizadas por GC/MS no Laboratório de Fitoquímica do Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônomo, Campinas – SP. Para cada população, aproximadamente 5 mg de extrato etanólico foram diluídos em 1 mL de álcool etílico P.A (99.5%) e injetado 1µL de solução no cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS, Shimadzu, QP-5000), dotado de coluna capilar de sílica fundida OV - 5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.), com ionização por impacto de elétrons (EI) (70 eV). Condições cromatográficas: injetor a 240°C, detector a 230°C, gás de arraste hélio (1mL. m⁻¹), modo de injeção split (1/20). Programa de temperatura: 100°C - 280°C, 5°C/min; 280°C/20min.

A identificação das substâncias foi realizada por meio da comparação do espectro de massas das substâncias com o banco de dados do sistema GC/MS e literatura e a injeção de padrão de estigmasterol nas mesmas condições analíticas das amostras.

4.3. Estudo *in vitro* da Atividade Tripanocida dos Extratos Etanólicos e dos Óleos Essenciais de Populações de *Lychnophora pinaster*

Os ensaios foram realizados no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM).

4.3.1. Cultura de Células

Foram utilizadas células da linhagem celular U2OS (derivada de um paciente com osteossarcoma) e LLC-MK2 (isolada dos rins de *Macaca mulatta*). As células U2OS foram compradas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Xerém, Rio de Janeiro e LLC-MK2 foi adquirida do laboratório do professor Sérgio Schenkman, Universidade Federal de São Paulo. O cultivo celular *in vitro* foi realizado em meio DMEM de alta glicose (HyClone), suplementado com soro bovino fetal (FBS) 10% (Gibco) e com os antibióticos estreptomicina 100 U/ml e penicilina 100µg/ml (Gibco), e mantidas em estufas a 37°C e 5% de CO₂.

4.3.2. Parasita *Trypanosoma cruzi*

A cepa Y foi doada por Sérgio Schenkman (Universidade Federal de São Paulo).

4.3.3. Composto de Referência e Amostras

O composto referência benznidazol, utilizado comercialmente no tratamento da doença de Chagas, foi obtido da empresa Nortec Química (Duque de Caxias, RS, Brasil). As amostras dos óleos essenciais e extratos utilizadas foram as mesmas do estudo de composição química (Seção 4.2).

4.3.4. Preparo das Amostras

O benznidazol foi dissolvido em 100% dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 40mM, enquanto as amostras naturais foram preparadas a uma solução estoque de 10 mg/mL, também em 100% DMSO. Alíquotas de pequeno volume foram estocadas sob -80°C. Com intuito de conservar as propriedades das amostras triadas, as alíquotas estocadas foram submetidas a ciclo de congelamento e descongelamento de no máximo três vezes.

A partir da solução estoque, as amostras foram diluídas 100x na placa de ensaio a fim de se obter uma concentração máxima na curva dose resposta de 400 μ M e 100 μ g/mL para o benznidazol e amostras naturais (óleos essenciais/extratos), respectivamente; a concentração final de DMSO na placa de ensaio foi de 1%.

4.3.5. Ensaio Anti-Tripanossoma cruzi

Os ensaios foram conduzidos segundo Moraes *et al.* (2014). No primeiro dia, foram semeadas 700 células U2OS em placas pretas de 384 poços (Greiner Bio-One), em 40 μ l de DMEM alta glicose, com ajuda do dispensador automático Wellmate Liquid Handler (Thermo-Scientific) e incubadas por 24h, a 37°C/5% de CO₂ (APÊNDICE 1). No segundo dia, foram colhidos tripomastigotas do sobrenadante de cultura de células LLC-MK2 infectadas com *T. cruzi*, que foram adicionados na multiplicidade de 20 parasitas por células em 10 μ l de DMEM alta glicose e incubado por 24h a 37°C/5% de CO₂ (APÊNDICE 1). No terceiro dia, foram adicionados 10 μ L do benznidazol na concentração inicial de 400 μ M e das amostras de óleos essenciais e extratos de *L. pinaster* na concentração inicial de 100 μ g/mL, seguidos de 14 pontos de diluição 2x (APÊNDICE 1); as amostras foram adicionadas em réplica na placa. Foram incluídos 16 poços de infecção na ausência de qualquer composto (apenas células U2OS infectadas), denominado de controle negativo e 16 poços sem infecção (contendo apenas células U2OS), denominado de controle positivo; o volume final dos poços tratados foi de 60 μ L. Após 96 horas de exposição, prosseguiu-se com os passos de fixação e de lavagem com paraformaldeído 4% e DPBS. Após, a placa de ensaio foi corada utilizando corante de DNA fluorescente vermelho (DRAq5, Biostatus) que marca a célula hospedeira e núcleos de parasitas. Em seguida, a placa foi imageada no sistema automatizado de geração de imagem em alto conteúdo (Operetta, PerkinElmer). As imagens adquiridas em alta resolução (20x magnificado) foram analisadas com o *software Harmony* para identificação, segmentação e quantificação de núcleo e citoplasma da célula hospedeira e parasita intracelular (APÊNDICE 2). O ensaio foi realizado em duplicata (dois experimentos independentes)

O fator estatístico Z' foi adotado para avaliar a qualidade estatística do ensaio. Este mede a confiança da triagem, considerando a janela de separação entre os valores médios e os desvios entre os controles positivo e negativo.

O Z' pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$$Z' = 1 - [3 \cdot (DP_p + DP_n) / (M_p - M_n)]$$

Onde **DP** corresponde ao desvio padrão, **M** corresponde à média, **p** representa o valor de taxa de infecção no controle positivo (células infectadas tratadas com Nifurtimox a 100µM) e **n** representa o valor da taxa de infecção no controle negativo (células infectadas tratadas apenas com DMSO 1%).

Todos os experimentos foram avaliados por meio do Z' , sendo que se considerou como satisfatório o ensaio cujo este parâmetro fosse igual ou superior a 0.5.

4.3.6. Definições

Para os propósitos deste estudo, (i) EC_{50} foi definido como a concentração de composto correspondente a 50% da atividade normalizada após 96 horas de incubação. A potência dos compostos é relacionada ao valor de EC_{50} , onde quanto mais potente o composto, menor é o valor de EC_{50} ; (ii) CC_{50} é definido como a concentração de composto correspondente à redução de 50% das células hospedeiras em comparação ao controle negativo, onde maior o valor de CC_{50} menor é a citotoxicidade; (iii) Índice de Seletividade (IS) é definido como a razão entre o valor de CC_{50} e EC_{50} . Quando o cálculo de CC_{50} não é possível, o valor de IS tende a ser maior do que a razão entre a concentração máxima de composto e EC_{50} .

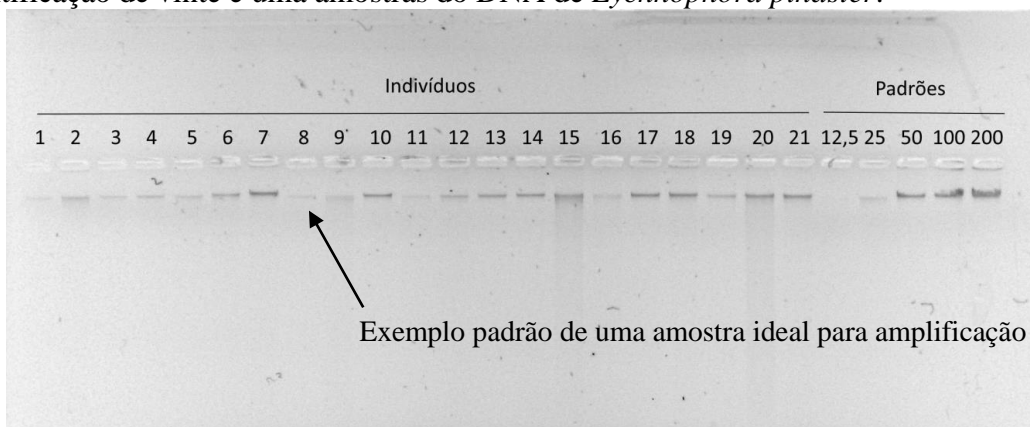
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo de Diversidade Genética e Estrutura Populacional de *Lychnophora pinaster* Utilizando Marcadores SSR

A extração de DNA dos 186 indivíduos de *L. pinaster* foi bem-sucedida quando utilizado o protocolo CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990), com as modificações sugeridas por Haber (2008) (FIGURA 5).

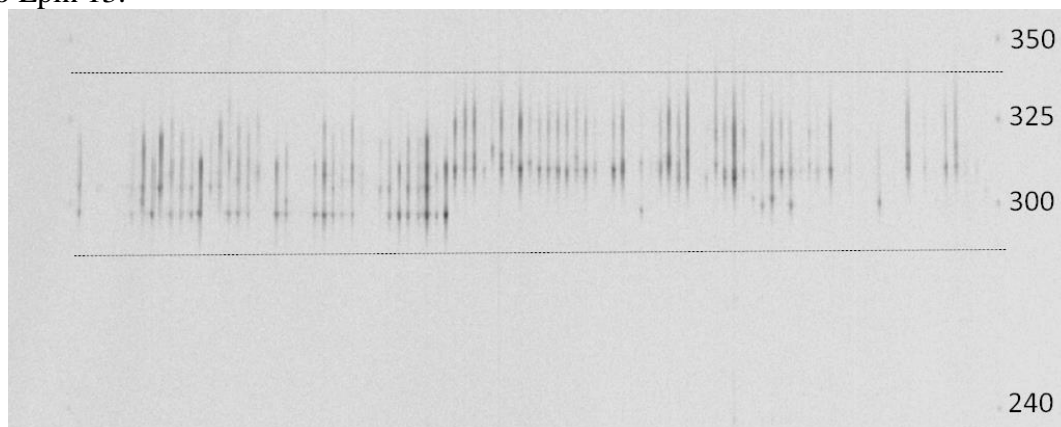
O perfil de um gel obtido pelo sistema de eletroforese LI-COR, correspondendo ao loco Lpin 13, é apresentado na Figura 6. As imagens obtidas para cada loco foram utilizadas para determinação do tamanho dos alelos e, posteriormente, para a determinação dos parâmetros genéticos utilizados nos estudos de diversidade genética e estrutura populacional de *L. pinaster*.

Figura 5. Perfil do gel de agarose 1% corados com Syber Green®, mostrando a quantificação de vinte e uma amostras do DNA de *Lychnophora pinaster*.



*As últimas cinco bandas correspondem aos padrões do DNA do bacteriófago Lambda à 12,5, 25, 50, 100 e 200 ng/μL.

Figura 6. Perfil de um gel obtido pelo sistema de eletroforese LI-COR, correspondendo ao loco Lpin 13.



*Entre as linhas tracejadas está a região de amplificação deste loco.

5.1.1. Variabilidade Genética

Levando em conta a iminente necessidade de preservação de *L. pinaster* e a carência de estudos genéticos com a espécie, os marcadores SSR se mostraram uma ferramenta apropriada para ser utilizada neste tipo de estudo.

As frequências alélicas de cada loco estão apresentadas na Tabela 6. Os três locos mais polimórficos foram Lpin14, Lpin 13 e Lpin 4 com, respectivamente, 20, 17 e 13 alelos. Com os oito locos SSR foram gerados 81 alelos nos 186 indivíduos estudados e estes foram utilizados na análise genética populacional.

Tabela 6. Frequência dos alelos observados em cada loco polimórfico nas populações de *Lychnophora pinaster* estudadas. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.

Loco	Alelo	População						
		PB	SS	SA	SSa	SB	OB	AB
Lpin 4	160	8.82	2.08	-	-	-	-	-
	164	-	20.83	6.00	-	-	-	-
	167	-	-	-	-	6.52	48.53	-
	171	2.94	6.25	28.00	70.00	30.43	5.88	78.00
	172	14.71	12.50	14.00	-	-	-	-
	173	5.88	22.92	16.00	-	4.35	8.82	-
	175	8.82	16.67	16.00	28.00	36.96	11.76	12.00
	179	-	-	-	-	-	7.35	2.00
	180	-	-	12.00	-	-	-	-
	181	20.59	4.17	2.00	-	15.22	10.29	2.00
	183	38.24	14.58	4.00	2.00	-	2.94	-
	185	-	-	2.00	-	4.35	4.41	2.00
	187	-	-	-	-	2.17	-	4.00
Lpin 6	247	-	-	-	-	-	36.36	-
	289	-	4.76	6.25	-	6.82	-	16.67
	291	76.92	52.38	83.33	82.00	90.91	-	73.81
	293	-	-	-	-	2.27	-	7.14
	297	19.23	7.14	-	-	-	-	-
	303	-	-	-	-	-	6.06	-
	305	-	-	-	-	-	56.06	-
	309	-	-	-	-	-	1.52	-
	321	3.85	35.71	10.42	18.00	-	-	2.38
	Lp9	280	-	-	2.08	31.25	26.00	94.59
281		-	-	-	-	-	-	2.08
284		61.11	51.85	64.58	68.75	34.00	-	16.67
286		27.78	33.33	31.25	-	20.00	-	22.92
288		11.11	14.81	2.08	-	20.00	5.41	-
Lpin 11		245	-	9.26	35.42	2.27	-	-
	248	36.84	18.52	25.00	27.27	56.00	-	47.83
	250	-	-	-	-	4.00	1.61	21.74
	252	7.89	25.93	29.17	20.45	4.00	64.52	26.09
	254	39.47	38.89	10.42	50.00	36.00	33.87	4.35
	257	13.16	7.41	-	-	-	-	-
	258	2.63	-	-	-	-	-	-
	Lpin 13	291	-	-	-	-	-	-
296		-	-	-	-	-	36.11	-
298		-	-	-	-	2.17	-	-
305		14.29	3.70	-	-	-	2.78	8.33
307		7.14	22.22	8.00	-	-	-	4.17

Tabela 6. Continuação...

Loco	Alelo	População						
		PB	SS	SA	SSA	SB	OB	AB
Lpin 13	309	3,57	-	-	2,00	-	30,56	2,08
	311	-	-	-	24,00	-	-	-
	313	7.14	42.59	52.00	44.00	-	2.78	8.33
	315	14.29	20.37	20.00	28.00	73.91	13.89	47.92
	316	-	-	-	-	2.17	4.17	6.25
	317	-	-	4.00	-	15.22	2.78	4.17
	319	46.43	7.41	-	-	-	-	4.17
	321	-	1.85	16.00	2.00	6.52	1.39	6.25
	323	-	1.85	-	-	-	5.56	4.17
	327	-	-	-	-	-	-	2.08
	328	3.57	-	-	-	-	-	-
	331	3.57	-	-	-	-	-	-
Lpin 14	164	-	-	-	-	-	80.30	-
	166	-	-	-	-	-	12.12	-
	168	-	-	-	-	2.50	7.58	-
	181	16.67	-	-	-	-	-	2.63
	185	3.33	-	-	13.64	2.50	-	-
	187	-	2.27	4.00	2.27	7.50	-	-
	189	16.67	-	-	-	2.50	-	-
	191	3.33	20.45	30.00	11.36	5.00	-	-
	192	-	-	-	-	7.50	-	5.26
	193	3.33	13.64	2.00	-	12.50	-	5.26
	195	-	9.09	26.00	6.82	2.50	-	13.16
	197	13.33	-	20.00	25.00	-	-	-
	199	10.00	-	-	-	15.00	-	31.58
	201	30.00	11.36	16.00	4.55	7.50	-	7.89
	203	-	25.00	-	27.27	2.50	-	2.63
	206	-	4.55	-	-	7.50	-	5.26
	207	-	4.55	-	-	10.00	-	13.16
209	3.33	9.09	2.00	9.09	5.00	-	10.53	
212	-	-	-	-	5.00	-	-	
215	-	-	-	-	5.00	-	2.63	
Lpin 16	195	26.47	30.77	46.00	26.00	14.00	16.22	32.00
	197	58.82	69.23	54.00	74.00	86.00	83.78	68.00
	199	14.71	-	-	-	-	-	-
Lpin 17	173	-	-	-	-	13.04	1.61	-
	179	50.00	-	10.42	48.00	-	22.58	5.88
	181	26.47	72.00	31.25	40.00	80.43	25.81	94.12
	183	14.71	8.00	47.92	8.00	-	37.10	-
	185	-	2.00	2.08	2.00	6.52	12.90	-
	187	8.82	6.00	8.33	-	-	-	-
	189	-	12.00	-	2.00	-	-	-

O número médio de alelos foi de 5.00 ± 0.24 , muito similar ao obtido por Haber *et al.* (2009) (5.82), que utilizando os mesmos *primers*, estudaram duas populações nativas da espécie provenientes da região sul de Minas Gerais. A população AB apresentou o maior número de alelos, $A_T = 45$, e a população SSa o menor, $A_T = 31$ (TABELA 7).

Quanto ao número de alelos privados, média de 2.57 ± 0.90 , a população OB (região sudeste), mais distante das demais (aprox. 152 Km) (FIGURA 4), se destacou, com sete alelos privados (TABELA 7). Destes alelos, quatro são pertencentes ao loco Lpin 6 (309, 303, 305, 247), dois ao loco Lpin 14 (166 e 164) e um pertencente ao loco Lpin 13 (296) (TABELA 6). O alelo privado 164 foi o mais frequente (80.30%) na população OB, seguido do 305 (56.06%) (TABELA 6). A população SA apresentou um único alelo privado (180) no loco Lpin 4, com frequência de 12%, assim como SSa (311) no loco Lpin 13, cuja frequência foi de 24% (TABELAS 6 e 7). A população SS não apresentou nenhum alelo privado (TABELA 7). O número de alelos raros (frequência alélica 0–5%) variou de 17 em AB e SB até oito em SSa (TABELA 7).

Quanto à riqueza alélica (R_A), média 4.31 ± 0.19 , os menores valores foram registrados nas populações SSa e OB, $R_A = 3.41$ e 3.83 , respectivamente (TABELA 7). Embora a população SS tenha apresentado maior riqueza alélica ($R_A = 4.73$), não diferiu (sobreposição IC 95%) das populações PB, SA, SB, AB e OB (TABELA 7).

Com relação à diversidade gênica (H_e), as populações SS (0.647) e SA (0.614) apresentaram os maiores valores registrados, diferindo de SSa (0.527), AB (0.576), SB (0.51) e OB (0.484), ao passo que PB ($H_e = 0.644$) diferiu significativamente de SB e OB (Tabela 7). A maior heterozigosidade observada (H_o) foi de SA (0.551), que diferiu de AB (0.405), SB (0.387), SSa (0.363) e OB (0.352). A população SS ($H_o = 0.487$), com o segundo maior valor de H_o , diferiu de OB. A população PB ($H_o = 0.435$) não diferiu de nenhuma das populações quanto a esta estimativa (TABELA 7).

A heterozigosidade média esperada em equilíbrio Hardy-Weinberg (0.565) foi maior que a heterozigosidade média observada (0.425), indicando existência de endogamia. Como já era o esperado, estes valores médios são consistentes com os obtidos para espécies endêmicas ($H_o = 0.42$; $H_e = 0.32$) e estritamente distribuídas ($H_o = 0.56$; $H_e = 0.52$) (NYBOM, 2004).

Os valores das estimativas R_A , H_O e H_E indicam que as populações não estão na mesma proporção antropogenicamente afetadas. As populações SS, PB e SA, por exemplo, apresentaram maior variabilidade genética do que OB e SSa (TABELA 7).

Com relação aos coeficientes de endogamia (F_{IS}), as populações PB, SSa e OB apresentaram os maiores valores, $F_{IS}= 0.321$, 0.306 e 0.283 , respectivamente, diferindo de SA, que apresentou o menor valor, $F_{IS}= 0.105$ (TABELA 7). As populações PB, SS, SSa, SB, OB e AB não diferiram entre si com relação ao F_{IS} (TABELA 7). O F_{IS} global foi de 0.221 e significativamente diferente de zero ($IC= 0.275-0.172$), sugerindo desvios de panmixia.

A taxa de cruzamento aparente (T_a) média foi de 0.638 , valor compatível com o de uma espécie com sistema de cruzamento misto. Entre populações, T_a variou entre 0.514 (PB) a 0.810 (SA), tendo, portanto, maior prevalência de fecundação cruzada entre indivíduos na população SA; o que reflete, conseqüentemente, no seu menor e maior valor de F_{IS} (0.105) e H_O (0.551), respectivamente (TABELA 7).

O sistema de cruzamento pode influenciar significativamente na diversidade genética da população (HUANG *et al.*, 2009b). Dois exemplos são as populações OB e SSa, que apresentam dois dos menores valores de T_a ($OB= 0.559$; $SSa= 0.531$), a menor variabilidade genética (considerando R_A , H_O e H_E) e coeficientes de endogamia alto (F_{IS}) ($OB= 0.283$; $SSa= 0.306$) (TABELA 7).

Tabela 7. Estimativas de índices de diversidade genética obtidos para sete populações de *Lychnophora pinaster*. A_T: número total de alelos; A: número médio de alelos por população; A_P: alelos privados; A_R: alelos raros; H_O: heterozigosidade observada; H_E= heterozigosidade esperada; F_{IS}: coeficiente de endogamia; T_a: Taxa de cruzamento aparente; R_A: riqueza alélica.

Parâmetros	População						
	-----Região sul-----						-Região Sudeste-
	PB -Poço Bonito-	SS -Serra do Sofá-	S A -Serra da Arnica-	SSa -Serra do Salto-	SB -Serra Branca-	AB -Areia Branca-	OB -Ouro Branco-
A _T	42	43	39	31	44	45	36
A	5.25	5.38	4.88	3.88	5.50	5.63	4.5
A _P	4	0	1	1	2	3	7
A _R	10	10	10	8	17	17	10
H _O	0.431	0.485	0.551	0.363	0.387	0.405	0.353
^a IC _{H_O}	0.352-0.516	0.408-0.568	0.496-0.604	0.307-0.433	0.315-0.469	0.318-0.481	0.302-0.397
H _e	0.644	0.647	0.614	0.527	0.510	0.526	0.484
^a IC _{H_e}	0.549-0.666	0.589-0.672	0.559-0.631	0.474-0.554	0.446-0.548	0.447-0.555	0.445-0.513
F _{IS}	0.321	0.247	0.105	0.306	0.236	0.231	0.283
^a IC _{FIS}	0.190- 0.452	0.131-0.362	0.021-0.182	0.190-0.416	0.087-0.383	0.097-0.372	0.188-0.376
T _a	0.514	0.604	0.810	0.531	0.618	0.625	0.559
^b R _A	4.60	4.73	4.37	3.41	4.61	4.63	3.83
IC _R	4.00-5.000	4.125-5.125	4.000-4.750	3.000-3.750	4.000-5.125	4.000-5.250	3.375-4.250

^aIC= intervalo de confiança a 95%; ^bR_A= rarefação por amostra para 13 indivíduos

Através do Teste Exato de Fisher foi possível verificar que os locos SSR estão com frequências compatíveis ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg em somente poucas populações, isto devido ao sistema de cruzamento e cruzamento entre indivíduos aparentados (TABELA 8). Os casos mais extremos foram para SA, SB e PB. Em SA e PB seis dos oito locos estudados não se encontraram em equilíbrio HW, ao passo que em PB, seis locos se encontraram em equilíbrio. Em nenhuma das populações foi verificado desequilíbrio de ligação (DL) significativo ($\alpha = 0.0002$; correção de Bonferroni) entre locos, significando que todas as marcas SSR estudadas são independentes.

Tabela 8. Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.

Loco	PB	SS	AS	SSa	SB	OB	AB
Lpin 4	0.098	0.132	0.534	0.365	0.000*	0.255	0.820
Lpin 6	0.197	0.000*	0.811	0.791	0.003*	0.067	0.117
Lpin 9	MN	MN	0.001*	0.000*	0.004*	MN	0.020
Lpin 11	0.187	0.000*	0.001*	0.255	0.000*	0.562	0.006*
Lpin 13	0.230	0.369	0.001*	0.000*	0.002*	0.375	0.384
Lpin 14	0.011	0.004*	0.001*	0.002*	0.567	0.000*	0.002*
Lpin 16	0.229	0.023	0.000*	0.079	0.396	0.215	0.186
Lpin 17	0.000*	0.128	0.004*	0.000*	0.000*	0.000*	MN
MÉDIA	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

*MN= loco monomórfico na população;

Valor seguido de asterisco ()= não adere às proporções esperadas; $\alpha = 0.006$ (correção de Bonferroni).

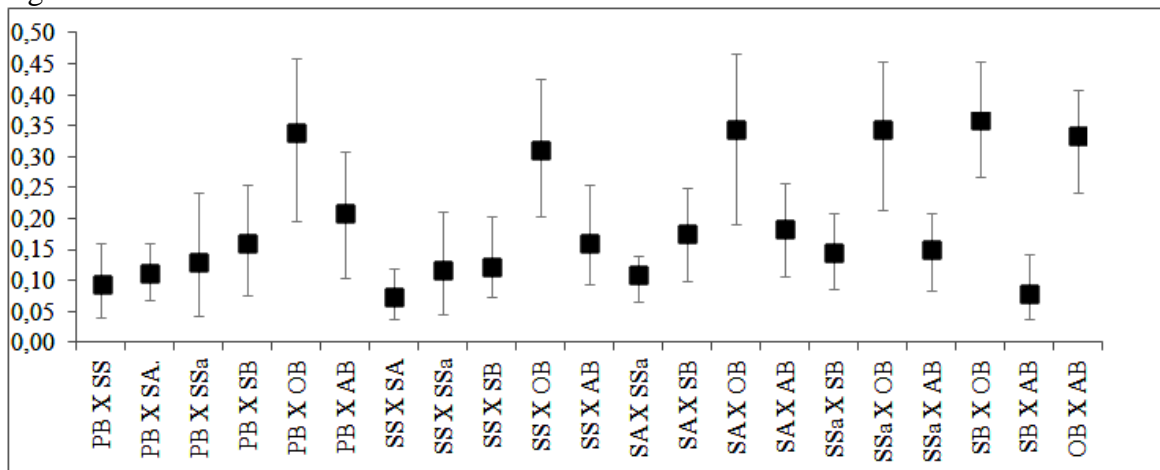
5.1.2. Estrutura Genética

O F_{ST} calculado foi de 0.266 (IC= 0.454-0.081), indicando uma diferenciação genética muito grande entre as populações analisadas (WRIGHT, 1978). Este valor é equivalente ao F_{ST} médio obtido para outras espécies vegetais endêmicas (0.26) (NYBOM, 2004). Após correção feita para alelos nulos, este valor foi reduzido para 0.193.

A diferenciação genética entre as populações é ressaltada principalmente quando se compara OB das demais (populações do sul), apresentando os maiores valores de F_{ST} par a par (min. de 0.3140 entre OB x SS e máx. de 0.3600 entre OB x SB) (Gráfico 1); o que pode ser atribuído à grande distância geográfica (aprox. 152 km) (FIGURA 4), que, conseqüentemente, torna o fluxo gênico muito restrito. Os três menores valores de F_{ST} par a par foram apresentados entre SB x AB (0.0813), SS x SA (0.0742) e PB

x SS (0.0971) (GRÁFICO 1); o que pode ser atribuído ao fluxo gênico pronunciado entre as populações, que são espacialmente próximas.

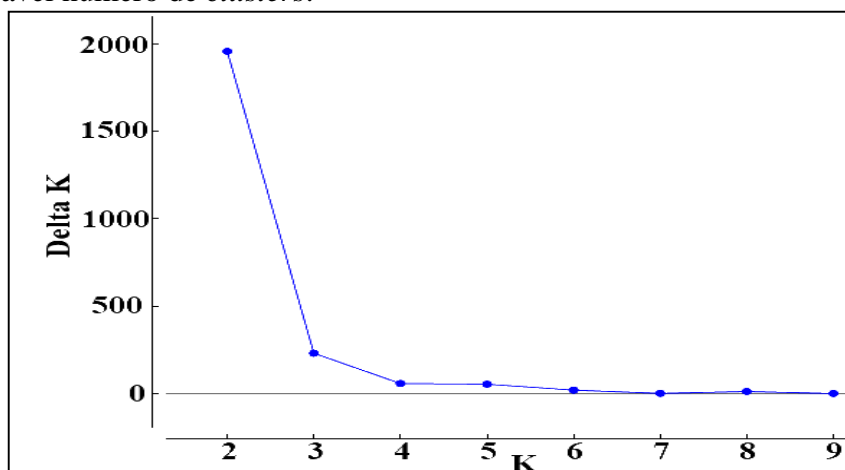
Gráfico 1. F_{st} par a par entre as sete populações de *Lychnophora pinaster* analisadas. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.



*Barras na vertical são equivalentes ao intervalo de confiança a 95%.

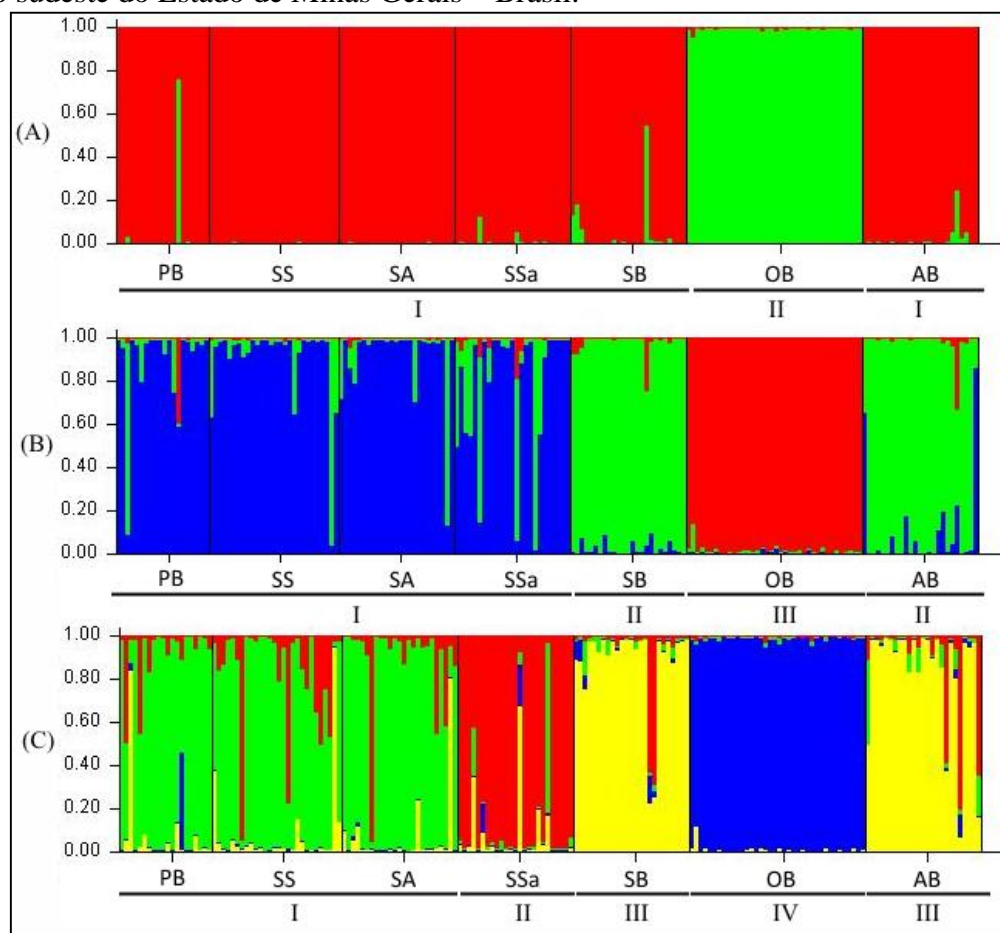
Pela análise Bayesiana, $K=2$ foi determinado como o número mais provável de *clusters* ou *pools* genéticos de acordo com a estatística *ad hoc* ΔK (EVANNO, 2005) (GRÁFICO 2).

Gráfico 2. Valores de ΔK foram plotados contra vários valores de K , sugerindo $K=2$ como o mais provável número de *clusters*.



No gráfico obtido do *software* STRUCTURE v.2.3.4 (GRÁFICO 3A, B e C), é possível verificar que cada população é separada por uma linha vertical e cada cor representa um *cluster*. Desta forma a cor vermelha, verde, azul e amarela são consideradas um grupo genético ou diferentes *pools* gênicos, formados por *pool* de alelos diferentes. Esta separação é feita baseada na estatística bayesiana. A altura vertical de cada coluna denota a probabilidade de ser compartilhar alelos com populações diferentes. Colunas inteiras da mesma cor indicam que o indivíduo tem 100% de probabilidade de pertencer aquela população ou grupo. Quando temos mistura, como podemos visualizar mistura de cores nas colunas, isto indica que os indivíduos possuem diferentes probabilidades de pertencerem aos diferentes grupos.

Gráfico 3. Atribuição Bayesiana de 186 indivíduos de *Lychnophora pinaster* em (A) K=2, (B) K=3 e (C) K=4 clusters genéticos utilizando o software STRUCTURE v.2.3.4. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.



*Números romanos representam cada grupo genético.

Em K2 as populações foram agrupadas em dois *pools* gênicos distintos, o grupo I, contendo as populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB, provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais e, o grupo II, contendo apenas OB, proveniente da região sudeste do estado (GRÁFICO 3A; FIGURA 4). O resultado da AMOVA mostrou que 26.99 % da variação genética ocorreram entre OB e as demais populações ($\Phi_{ST} = 0.3624$).

Como K3 e K4 (GRÁFICO 3B-C) expressam um padrão de discriminação mais detalhado e coerente com a real distribuição espacial das populações (FIGURA 4), os mesmos foram incluídos no atual estudo. Em K3 é possível notar que as populações PB, SS, SA e SSa estão dispostas em um único *cluster* genético (grupo I), assim como as populações SB e AB (grupo II) e OB (grupo III) (GRÁFICO 3B). Em K4, é possível notar que SSa apresenta características genéticas diferenciadas das demais, suficientes para ser separada em um único *cluster* genético (GRÁFICO 3C).

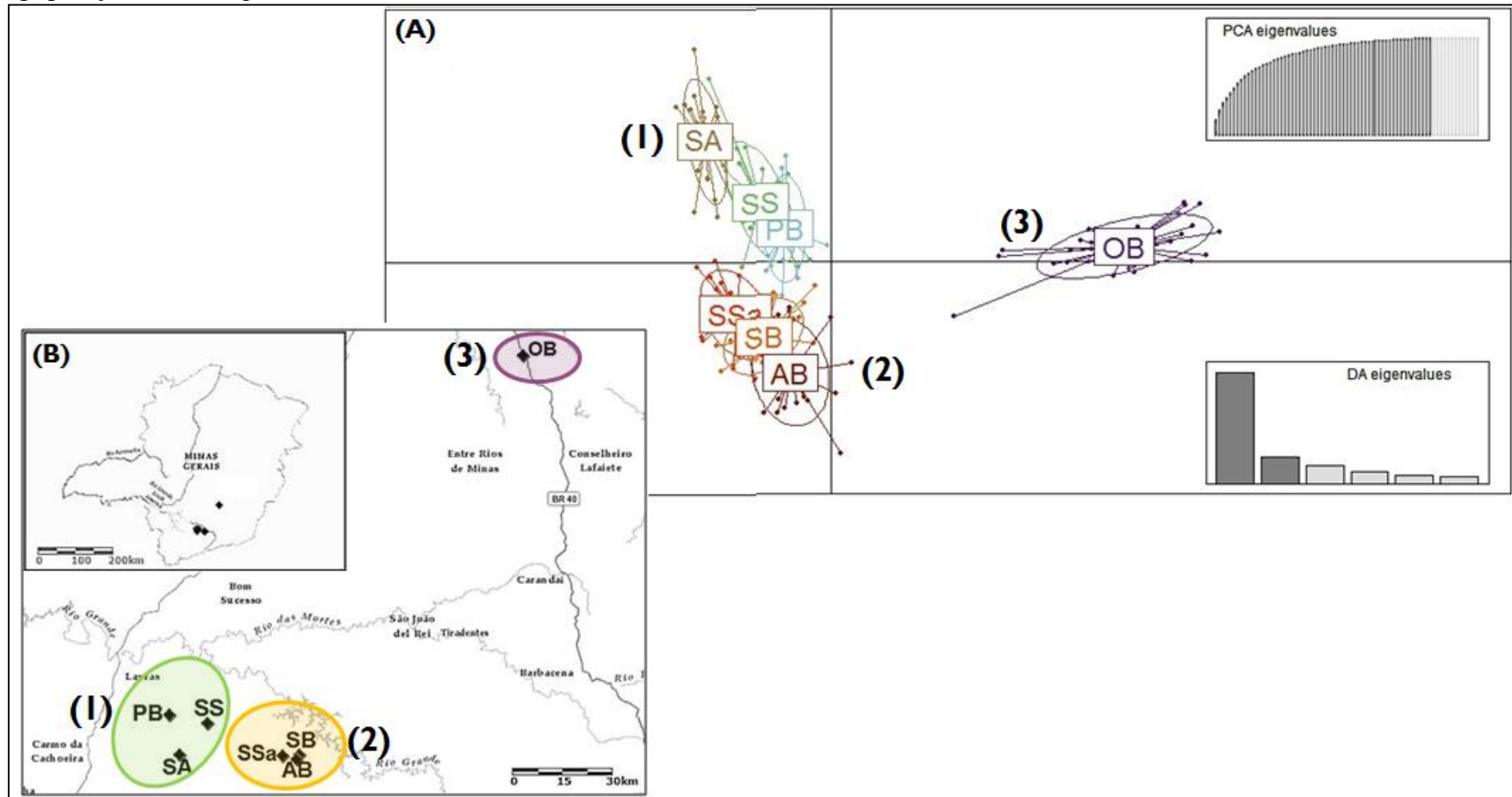
Alguns indivíduos da população SSa se destacam por apresentar porções do genoma provenientes do *pool* gênico pertencente às populações SB e AB em K3 e K4, caracterizando fluxo gênico (GRÁFICOS 3B e 4). SSa apresenta proximidade espacial de aprox. 5 Km de SB e AB (FIGURA 4).

Adicionalmente, o teste de Mantel revelou uma correlação significativa entre as matrizes das distâncias Euclidianas genética e geográfica ($r = 0.975$; $p = 0.001$). Já o valor de correlação entre as matrizes das distâncias Euclidianas das altitudes e genética mostrou-se irrelevante ($r = 0.068$; $p = 0.3633$) para explicar a estruturação genética populacional.

Estes dados corroboram com a afirmativa de que a extensão do fluxo gênico entre populações determina seu potencial para diferenciação genética (SLATKIN, 1985; FREELAND *et al.*, 2011). Também correspondem bem com o modelo de isolamento por distância de Wright (1943); o que é reforçado pela Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC), que revelou a formação de três grupos genéticos/geográficos (GRÁFICO 4), semelhantes ao agrupamento Bayesiano (GRÁFICO 3).

As análises do STRUCTURE v. 2.3.4 e da DAPC contribuem para explicar o padrão atual de diferenciação genética das populações estudadas e, sobretudo, evidenciam a clara diferenciação da população OB (sudeste) das demais (sul).

Gráfico 4. Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) a partir de 8 locos SSR e 186 indivíduos de *Lychnophora pinaster* (A). Em (B) os respectivos agrupamentos no mapa de distribuição espacial. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.



Por se tratar de uma espécie com sistema misto de reprodução, é possível que o sistema de cruzamento também possa afetar significativamente a diferenciação genética (HUANG *et al.*, 2009b).

Com relação ao fluxo gênico aparente, o valor observado ($Nm = 0.690$) pode ser considerado intermediário (GOVINDAJARU, 1989) e, como é menor que 1 ($Nm < 1$), é indicativo de efeito da deriva genética nas populações (WRIGHT, 1931; YAO *et al.*, 2014). Isto pode ter sido causado devido ao isolamento geográfico, limitado fluxo gênico, fragmentação ou flutuações demográficas das populações.

Efeitos da deriva genética são pronunciados em populações geograficamente isoladas e de tamanho reduzido (BARRETT e KOHN, 1991; ELLSTRAND e ELAM, 1993; LOHR *et al.*, 2014; HUSEMANN *et al.*, 2015), como é o caso das avaliadas no atual estudo, e podem levar várias gerações para exercer impactos significativos em parâmetros como a riqueza alélica e o F_{ST} (ZHOU *et al.*, 2014).

Muitos fatores podem estar ou ter contribuído para a redução do fluxo gênico e a diferenciação populacional em *L. pinaster*. As próprias características da espécie, a sua história evolutiva, seu *habitat* e os fatores antrópicos são exemplos que merecem ser considerados.

Os polinizadores do gênero *Lychnophora* podem ser beija-flores, abelhas, mariposas e borboletas (SEMIR *et al.*, 2011) e, portanto, em sua maioria, não se locomovem por longas distâncias. A perda do papus durante o desenvolvimento do fruto e a fusão de cípselas, faz da diplocoria, com barocoria seguida de hidrocoria pela enxurrada (ombro-hidrocoria) a forma mais provável de dispersão dos frutos de seus representantes; diferente dos restantes da família Asteraceae, que é por anemocoria (SEMIR *et al.*, 2011). Além disso, *L. pinaster* é encontrada em terrenos complexos, com populações distribuindo-se de forma disjunta devido à descontinuidade das cadeias montanhosas e dos afloramentos rochosos que compõem os seus locais de ocorrência. Estes fatores fazem com que grãos de pólen ou sementes sejam dificilmente levados de uma população a outra mais distante, contribuindo para diminuição do fluxo gênico efetivo e, eventualmente, para a diferenciação genética das populações.

Dados genéticos também suportam a hipótese de que a distribuição disjunta de populações de *Lychnophora ericoides* Mart. – espécie pertencente ao mesmo *pool* gênico de *L. pinaster* - foi devido às consequências climáticas da era glacial Kansan, que prevaleceu no período quaternário (COLLEVATTI *et al.*, 2009), onde processos

sucessivos de contrações e expansões promoveram diferenciação entre populações. Durante períodos mais quentes e úmidos a vegetação dos “campos rupestres” se expandiu, aumentando o fluxo gênico e hibridizações aleatórias entre populações, ao passo que durante períodos mais secos e frios as populações foram fragmentadas e populações uma vez conectadas tornaram-se isoladas (ALVEZ e KOLBEK, 1994; HARLEY, 1995; GIULIETTI *et al.*, 1997; BEHLIN 2002, ANTONELLI *et al.*, 2010).

No Estado de Minas Gerais, *L. pinaster* e *L. ericoides* apresentam o mesmo padrão de distribuição e são encontradas em localidades próximas, mas mutuamente exclusivas localmente (SEMIR *et al.*, 2011). Assim como *L. ericoides*, a diferenciação genética de populações de *L. pinaster* pode ter, parcialmente, sido resultado da fragmentação de *habitat* ao longo de sua história evolutiva; merecendo estudos complementares.

Em sinergismo com a erosão genética devido aos fatores biológicos, climáticos, geológicos ou geográficos, efeitos da deterioração ambiental também podem ter impacto significativo sobre a dinâmica de populações da espécie, contribuindo para restrição do fluxo gênico e divergência genética. As coletas frequentes das folhas da espécie para fabricação de receitas caseiras medicinais e outras atividades antrópicas indiscriminadas, como a agropecuária, queimadas e a mineração, estão contribuindo para a fragmentação, erradicação e a diminuição de populações remanescentes. Isto causa o efeito gargalo e, conseqüentemente, a perda de alelos importantes ou fixação de alelos deletérios pela deriva genética, bem como diminuição da heterozigose e aumento da endogamia, o que aumenta o risco de extinção das populações e da própria espécie, pois sua sobrevivência é criticamente influenciada pela manutenção da variação genética dentro das populações (BIJLSMA *et al.*, 2000; HONNAY e JACQUEMYN, 2007; RAPINI *et al.*, 2008; ANTIQUEIRA, 2013; CRUZ NETO *et al.*, 2014, KAHILAINEN *et al.*, 2014).

Uma redução recente do tamanho populacional foi detectada pelo teste de Wicolxon levando em conta o Modelo de Duas Fases (TPM) na população SSa (TABELA 9). É provável que o fogo seja o fator responsável pela supressão da variação genética nesta população, pois o seu local de origem é uma área particular onde a coleta de *L. pinaster* para fins medicinais vem sendo evitada há mais de uma década. Por ter um clima marcadamente sazonal, com períodos variando desde precipitações intensas até de longas secas que se estendem de maio até setembro-outubro, o Cerrado apresenta uma biomassa muito seca e propensa a eventuais queimadas devido às influências antrópicas e até mesmo

por causas naturais, como relâmpagos (RAMOS-NETO e PIVELLO, 2000; PIVELLO, 2011), sendo este último muito frequente nos locais de origem das populações estudadas.

Tabela 9. Valores de *p* registrados para as análises estatísticas (testes de Sinal e de Wilcoxon) de diferentes modelos mutacionais utilizados para avaliar a probabilidade de eventos gargalos recentes nas populações de *Lychnophora pinaster*. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.

População	Valor de <i>p</i> segundo			
	Modelo de Mutação Stepwise		Modelo Duas Fases	
	Teste de Sinal	Teste de Wilcoxon	Teste de Sinal	Teste de Wilcoxon
PB	0.18605	0.74219	0.30164	0.54688
SS	0.55688	0.64063	0.25836	0.25000
AS	0.44900	0.94531	0.25887	0.25000
SSa	0.48403	0.38281	0.05737	0.01172*
SB	0.06005	0.25000	0.52807	0.9453
AB	0.07184	0.05469	0.53270	0.94531
OB	0.07692	0.07422	0.21833	0.46094

(*)= Valor estatisticamente significativo.

5.1.3. Implicações para Conservação

Considerando que populações de *L. pinaster* se encontram em processo de diferenciação genética e com limitado fluxo gênico, ações de conservação da espécie devem objetivar conservar todas as populações existentes. A presença de alelos privados e raros em todas as populações estudadas, com exceção de SS (sem alelos privados), atesta a necessidade de ser conservar *in situ* a variabilidade genética que ainda existe. Isto é crucial para manter as populações viáveis e assegurar o processo evolutivo da espécie.

Como *L. pinaster* é uma espécie vulnerável a extinção de acordo com as categorias IUCN (*International Union for Conservation of Nature* ou União Internacional para Conservação da Natureza) (COPAM, 1997), ter o conhecimento da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de outras populações, ainda não estudadas, é de grande importância para estabelecer estratégias efetivas de conservação de germoplasma *in situ* e *ex situ* em curto e longo prazo.

Os esforços *in situ* devem focar na preservação dos *habitats* de *L. pinaster* da destruição e no aumento dos tamanhos populacionais, uma vez que o pequeno tamanho populacional e a fragmentação fazem de *L. pinaster* uma espécie que está

susceptível às perdas de diversidade genética causada pelos efeitos da endogamia e da deriva genética.

A recuperação da diversidade genética de SSa, população importante sob o ponto de vista genético, porém, fragilizada por um evento gargalo recente (Tabela 9), pode ser uma alternativa vantajosa, pois a mesma vem contribuindo para troca de genes entre populações de diferentes *pools* gênicos (Gráfico 3B-C). Em longo prazo, seu papel será crucial na mitigação da perda de variação genética causada pela deriva e endogamia em populações locais da espécie. Uma alternativa para acelerar o processo de recuperação desta população é através do chamado “resgate genético” (BROWN e KODRIC-BROWN, 1977), onde se aumenta a probabilidade de sobrevivência da população devido à imigração de genes de outra, contrabalanceando a endogamia (RICHARDS, 2000; HEBER *et al.*, 2013; WHITELEY *et al.*, 2015). Como alternativa, pode ser realizada a introdução de genótipos provenientes de diferentes *pools* gênicos em SSa. O mesmo pode ser atribuído à população OB.

Durante nossos levantamentos de campo ao longo das regiões sul e sudeste, percebemos a estreita preferência edáfica de *L. pinaster* com os campos rupestres e campos de canga (região do Quadrilátero Ferrífero). Determinados fatores, intrínsecos a estas regiões são, possivelmente, as causas do seu endemismo. Assim, perturbações antrópicas (*e.g.* desmatamento, mineração, pecuária e extrativismo predatório) nos locais de origem de suas populações deveriam ser evitadas ou controladas de forma rígida, para reduzir seu risco de extinção e promover o aumento populacional.

Como *L. pinaster* possui sementes de característica ortodoxa (MELO *et al.*, 2007), que são tolerantes a dessecação e cuja viabilidade pode ser mantida por longos períodos quando armazenadas nas condições ideais (BEWLEY e BACK, 1994; ZHANG *et al.*, 2015), é sugerido um planejamento de coleta de sementes provenientes dos quatro grupos genéticos obtidos pelo STRUCTURE v. 2.3.4 ou dos três grupos evidenciados pela DAPC no sentido de conservar *ex situ* matérias-primas para atividades futuras de pesquisa, restauração ecológica, reintroduções e melhoramento de plantas. Estes grupos podem ser um ponto de *start* para a conservação do germoplasma da espécie.

Além disso, orientação técnica aos coletores é imprescindível para impedir a extinção destas e de outras populações. De acordo com Who (1993), a coleta de espécies selvagens ameaçadas deveria ser proibida e o comércio das plantas medicinais e seus produtos deveriam ser controladas. Talvez uma solução menos extrema pode ajudar a

conservação desta espécie. Um exemplo é a mudar a extração predatória para uma coleta mais sustentável. Contudo, estas práticas precisam ser investigadas sobre a ótica de uma abordagem etnobotânica, de ecologia populacional ou de sistemas de manejo, como feito para outras espécies de plantas tropicais (BORGES-FILHO e FELFILI, 2003, SCHMIDT *et al.*, 2007, MONTEIRO *et al.*, 2011).

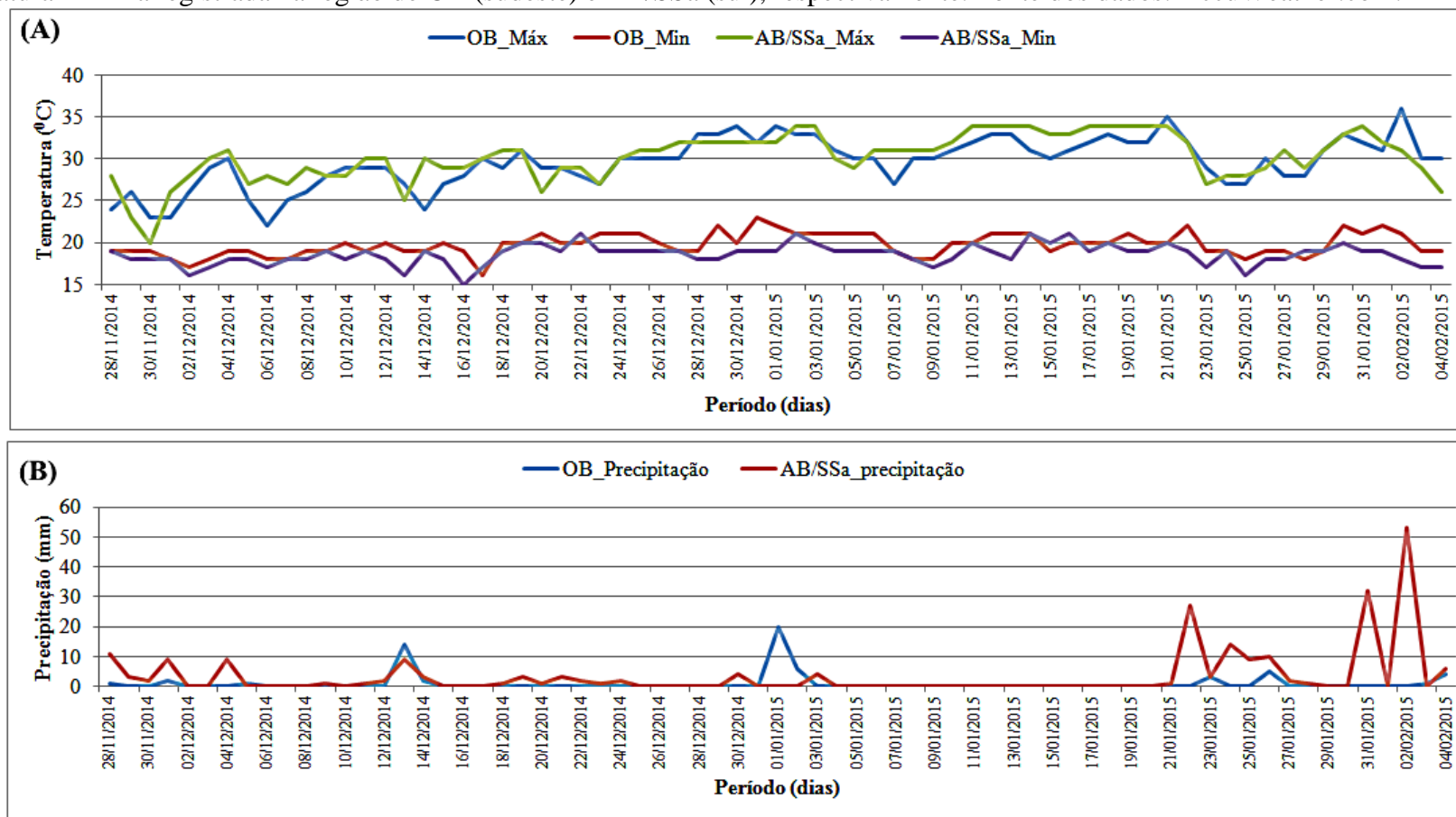
Além da relevância de se considerar as estratégias sugeridas para a conservação de *L. pinaster*, é estritamente necessário o monitoramento das populações remanescentes para que, de fato, seja evitada a extinção da espécie.

5.2. Condições Edafoclimáticas dos Locais de Origem das Populações Avaliadas no Estudo de Composição Química

As populações estudadas são pertencentes à duas fitofisionomias distintas, a população OB (região sudeste) cresce sobre o quadrilátero ferrífero e faz, portanto, parte do campo de canga ou campo rupestre ferruginoso. As populações AB e SSa (região sul) fazem parte do campo rupestre, sendo que AB cresce sobre solo arenoso, pedregoso e mais profundo quando comparado à população SSa, que cresce sobre afloramento rochoso, solo superficial e bem pedregoso. Os indivíduos provenientes da população OB chegam a ultrapassar 175cm, ao passo que os indivíduos das populações AB e SSa são de porte menor, não chegando a esta altura. Nas populações SSa e OB a vegetação predominante é de ervas, subarbustos e arbustos, com eventuais arvoretas. Em AB existem ervas, subarbustos e arbustos, mas as árvores (eucaliptos) se destacam entre a vegetação.

As condições estimadas de temperatura e precipitação para as regiões sudeste (local OB) e sul (local AB/SSa) referentes aos dois meses que antecederam à coleta do material vegetal para o estudo de composição química dos óleos essenciais e dos extratos, período 28/11/2014 a 04/02/2015, estão registradas no Gráfico 5.

Gráfico 5. Dados de (A) temperatura (°C) e (B) precipitação (mm) interpolados referentes ao período de 28/11/2014 a 04/02/2015 nas regiões de coleta das populações de *Lychnophora pinaster* OB (sudeste) e AB e SSa (sul) para o estudo de composição química. Siglas OB_Máx e AB/SSa_Máx = temperatura máxima registrada na região de OB (sudeste) e AB/SSa (sul), respectivamente. Siglas OB_Min e AB/SSa_Min = temperatura mínima registrada na região de OB (sudeste) e AB/SSa (sul), respectivamente. Fonte dos dados: AccuWeather.com.



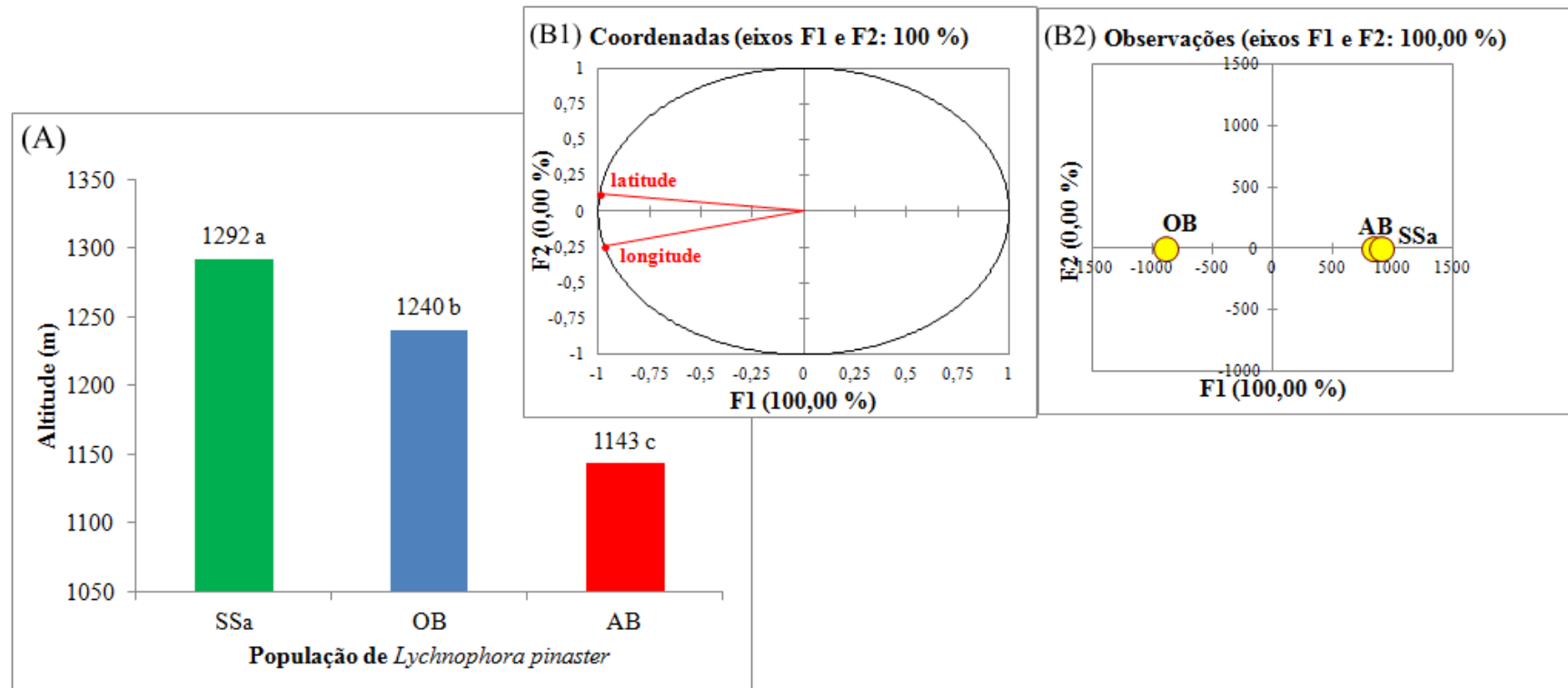
Por serem muito próximas, aproximadamente 1.6 km, foram consideradas da mesma região as populações AB e SSa (região sul), ao passo que OB (distante mais de 150 Km de AB e SSa) foi considerada uma região distinta (região sudeste).

Os registros de temperatura máxima (máx.) e mínima (mín) diárias foram similares para as duas regiões de origem (sul-sudeste) estudadas (GRÁFICO 5A). Entre as regiões sul e sudeste, uma diferença de menos de um grau para a temperatura máx. média foi constatada (máx. média região sudeste: 29.59 °C; máx. média região sul: 30.26 °C) e de 1.17 °C para a temperatura mín. média (mín. média região sudeste: 19.75 °C; mín. média região sul: 18.58 °C) (GRÁFICO 5A). Na região sul foi registrado precipitação total de 229 mm, com chuvas intensas a partir de 21 de janeiro até a data da coleta, ao passo que na região sudeste foi registrado o total de 59 mm (GRAFICO 5B).

Quanto à altitude, embora sejam populações próximas, SSa (1292 m) e AB (1143 m) encontram-se nos locais com maior e menor altitude, respectivamente (GRÁFICO 6A). A população OB (1240 m) está localizada em região de média altitude (GRÁFICOS 6A) e se diferencia de AB e SSa quanto as coordenadas geográficas, estando no local com menor latitude (S) e longitude (O): 20°20'19.6" e 43°55'32.5", respectivamente (GRÁFICO 6B; TABELA 2).

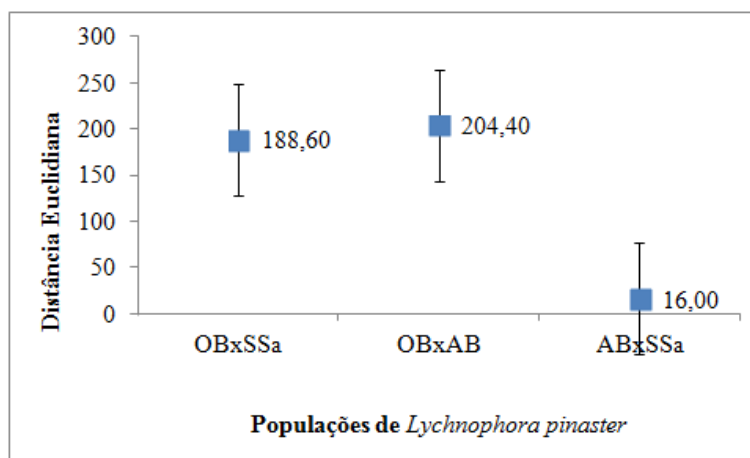
A análise exploratória dos solos de origem das três populações mostrou que, pelo fato de ser proveniente da população mais distante, o solo de origem de OB (região sudeste) é o que apresenta as características mais dissimilares comparadas as dos solos de origem de AB e SSa (região sul) (GRÁFICO 7). Por serem de localidades muito próximas e do mesmo município, os solos de origem de AB e SSa apresentam uma dissimilaridade muito baixa entre si (GRÁFICO 7).

Gráfico 6. Altitudes (m) médias (A) e coordenadas geográficas (B1 e B2) dos locais de origem das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul, e OB, da região sudeste de Minas Gerais - Brasil.



*Em (A): médias populacionais com letra distinta diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Teste de Fisher preliminar < 0.0001 . R^2 (coeficiente de determinação) = 0.97, ou seja, 97% da variabilidade está sendo explicada pela variável exploratória. Desvio padrão = 53.04; Em (B): Lambda 0.000, F (Valor observado) 23430.945, p -valor < 0.0001 , alfa 0.05.

Gráfico 7. Distância Euclidiana par a par levando em conta a composição química média dos solos de origem das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul, e OB, da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.



*Barras na vertical são equivalentes ao erro padrão.

Pela Análise Discriminante (DA) constatou-se que os solos de origem das populações pertencem a classes distintas (GRÁFICO 8A); o que é ressaltado pela matriz de confusão, que agrupou as amostras com 100% de precisão em três classes (APÊNDICE 3). O teste do Lambda de Wilks multivariado (MANOVA) indicou que ao menos um dos três vetores médios destas classes diferiu dos demais (p -valor < 0.0001; alfa 0.05); comprovando estatisticamente a diferença entre os solos de origem das populações estudadas.

Um total de 15 das 17 variáveis de solo estudadas (ver valores em cinza na TABELA 10) contribuiu significativamente para discriminar as classes de solos, explicando 100% da variação contida nos dados originais ($F_1 = 94.28\%$; $F_2 = 5.72\%$). Um total de 13 variáveis de solo se encontra em maior teor no solo de origem de OB (GRÁFICO 8B), sendo as que apresentaram maior poder discriminante S, CTC, matéria orgânica (MO) e H+Al (ver maior F na TABELA 11). Como já era esperado, o Fe foi um dos micronutrientes que discriminaram o solo de OB. Isto é pelo fato da população habitar o campo de canga, região do quadrilátero ferrífero; como mencionado anteriormente.

As variáveis que discriminaram os solos das classes SSa e AB foram o Cu e pH, respectivamente (GRÁFICO 8B).

Pelo Teste Unidimensional de Igualdade das Médias das Classes (UTEMC), com exceção de K, V% e SB, as médias de cada uma das variáveis que compõem o modelo DA de solos diferiram entre classes (p -valores < 0.05) (TABELA 11).

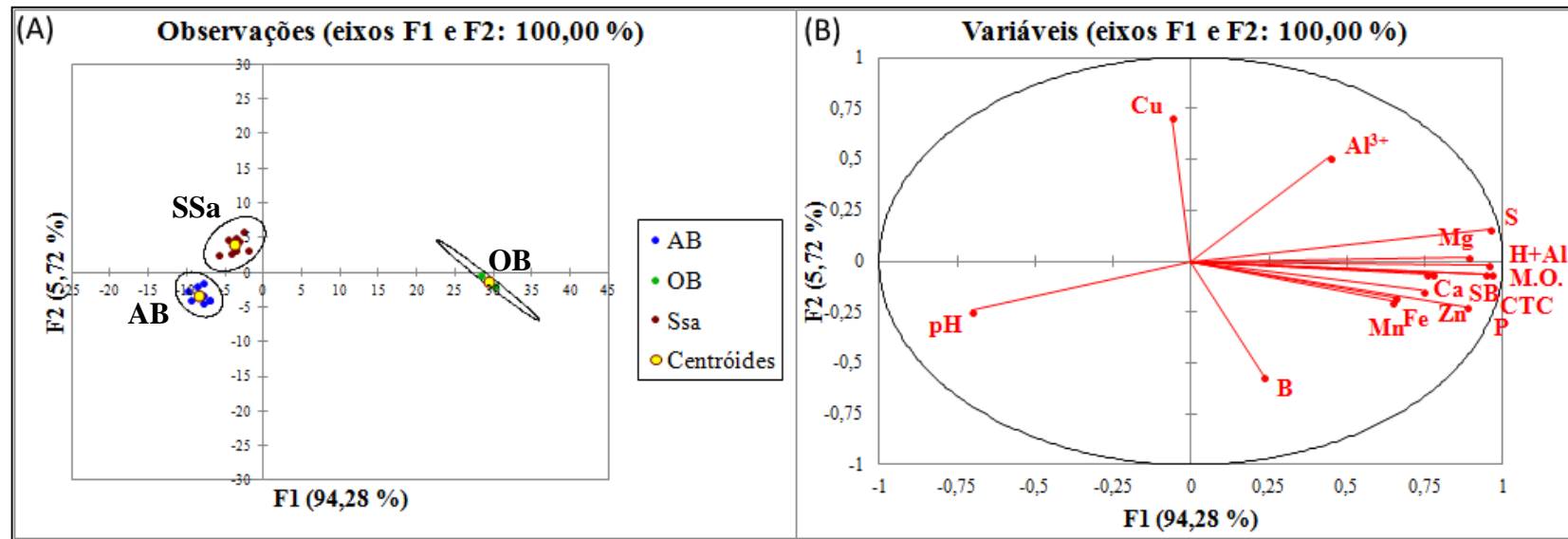
Tabela 10. Composição química média dos solos de origem das populações (Pop) de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, região sul, e OB, região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil. Destacadas em cinza as variáveis que mais contribuíram para discriminar os solos de origem das populações pela Análise Discriminante (Gráfico 8). $n_{AB}=10$; $n_{SSA}=9$; $n_{OB}=4$.

*pH= potencial hidrogeniônico, M.O.= matéria orgânica, P= fósforo, Al= alumínio, K= potássio, Ca= cálcio, Mg= magnésio, SB= soma de bases trocáveis, CTC= capacidade de troca de cátions, V%= saturação

Pop	pH	M.O.	P _{resina}	Al ³⁺	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	-----mmol/dm ³ -----						mg/dm ³			-----mg/dm ³ -----				
OB	3.6	78.1	9.6	10.6	161.5	1.4	13.4	2.3	17.1	178.6	10.5	10.3	0.5	0.3	114.8	14.2	4.3
SSa	3.9	23.0	2.6	9.7	40.1	0.9	3.6	1.0	5.5	45.6	12.7	4.9	0.3	0.4	57.9	1.7	0.2
AB	4.0	16.4	3.2	6.2	30.3	1.0	3.0	0.8	4.8	35.1	14.3	3.2	0.4	0.2	62.5	3.0	0.3

por bases, B= boro, Cu= cobre, Fe= ferro, Mn= manganês, Zn= zinco.

Gráfico 8. Análise Discriminante para validação da divergência química dos solos de origem das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul, e OB, da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil. Gráfico de escores (A) e Diagrama vetorial exibindo as correlações negativas e positivas das 15 variáveis do solo com o primeiro e segundo fatores (B).



*Lambda 0.000; F (Valor observado) 26.761; F (Valor crítico) 2.320; p -valor < 0.0001; alfa 0.05.

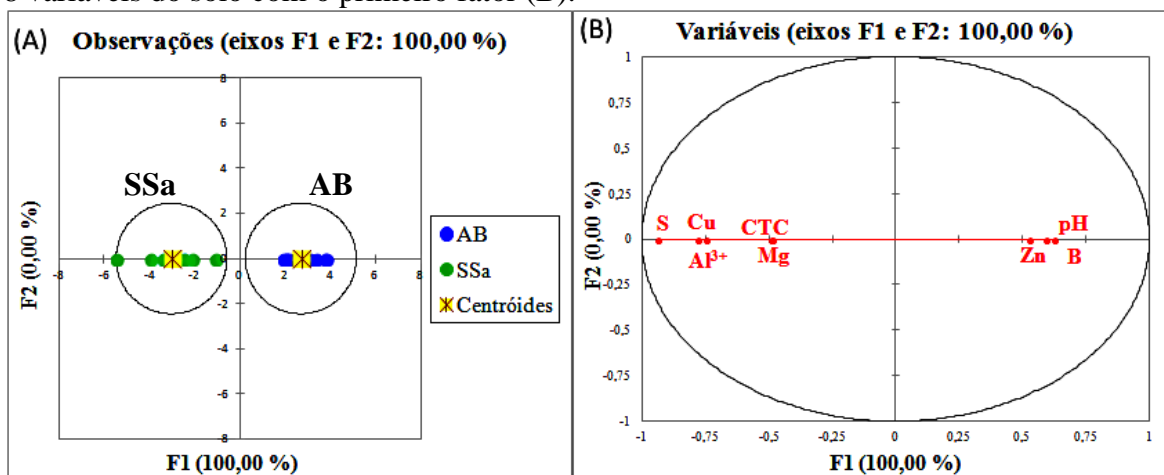
Tabela 11. Teste Unidimensional de Igualdade das Médias das Classes de solos das populações AB, SSa e OB formadas pela Análise Discriminante (Gráfico 8). As populações AB e SSa são provenientes da região sul, e OB, região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.

Variável	Lambda	F	<i>p</i> -valor
S	0.064	145.978*	< 0.0001
CTC	0.074	125.736*	< 0.0001
M.O.	0.092	98.184*	< 0.0001
H+Al	0.114	77.365*	< 0.0001
P	0.179	45.829*	< 0.0001
Mg	0.218	35.789*	< 0.0001
Ca	0.428	13.387	0.000
Zn	0.434	13.056	0.000
pH	0.452	12.131	0.000
Cu	0.530	8.872	0.002
Fe	0.548	8.260	0.002
Mn	0.552	8.118	0.003
Al ³⁺	0.559	7.894	0.003
B	0.654	5.297	0.014
K	0.851	1.747	0.200
V%	0.933	0.721	0.498
SB ^a	-	-	-

^aResultados não apresentados porque SB é altamente correlacionada com outras variáveis; Variáveis ordenadas conforme o seu poder discriminante; (*)= Variáveis com maior poder discriminante; *p*-valor < 0.05 indica que a variável difere entre classes.

Mesmo com baixa dissimilaridade entre os solos de origem das populações AB e SSa (região sul) (GRÁFICO 7), as diferenças entre suas amostras de solos foram suficientes para que as mesmas fossem classificadas com 100% de precisão em duas classes distintas (APÊNDICE 4; GRÁFICO 9A), se mostrando significativamente divergentes pela DA (*p*-valor MANOVA < 0.0001). As variáveis com maior poder discriminante sobre estas duas classes foram: S, Cu, Al, B, pH e Zn (TABELA 12), tendo o solo de SSa teores significativamente maiores de S, Cu, Al e Mg, bem como maior CTC e o solo de AB teores significativamente maiores de Zn, pH e B (GRÁFICO 9B). Por si só, estas substâncias representaram 100% da variação original dos dados, explicada apenas por F1.

Gráfico 9. Análise Discriminante para validação da divergência química dos solos de origem das populações AB e SSa, provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais - Brasil. Gráfico de escores (A) e diagrama vetorial exibindo as correlações negativas e positivas das 8 variáveis do solo com o primeiro fator (B).



*Lambda 0.099; F (Valor observado) 11.368; F (Valor crítico) 3.072; *p*-valor 0.000; alfa 0.05.

Tabela 12. Teste Unidimensional de Igualdade das Médias das Classes de solos de SSa e AB formadas pela Análise Discriminante. As populações SSa e AB são provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais - Brasil.

Variável	Lambda	F ^b	<i>p</i> -valor
S	0.204	66.465*	< 0.0001
Cu	0.451	20.703*	0.000
Al	0.492	17.576*	0.001
B	0.650	9.159*	0.008
pH	0.688	7.703*	0.013
Zn	0.754	5.541*	0.031
Mg	0.783	4.719	0.044
CTC	0.785	4.658	0.045
M.O.	0.825	3.615	0.074
P	0.874	2.461	0.135
Mn	0.876	2.405	0.139
Ca	0.917	1.530	0.233
V%	0.969	0.545	0.471
K	0.981	0.325	0.576
Fe	0.992	0.141	0.712
H+Al ^a	-	-	-
SB ^a	-	-	-

^a Valores não são apresentados pois H+Al e SB são altamente correlacionadas com outras variáveis; Metabólitos ordenados conforme o seu poder discriminante; (*)= Variáveis com maior poder discriminante; *p*-valor calculado inferior ao alfa (0.05) indica que a variável difere entre classes.

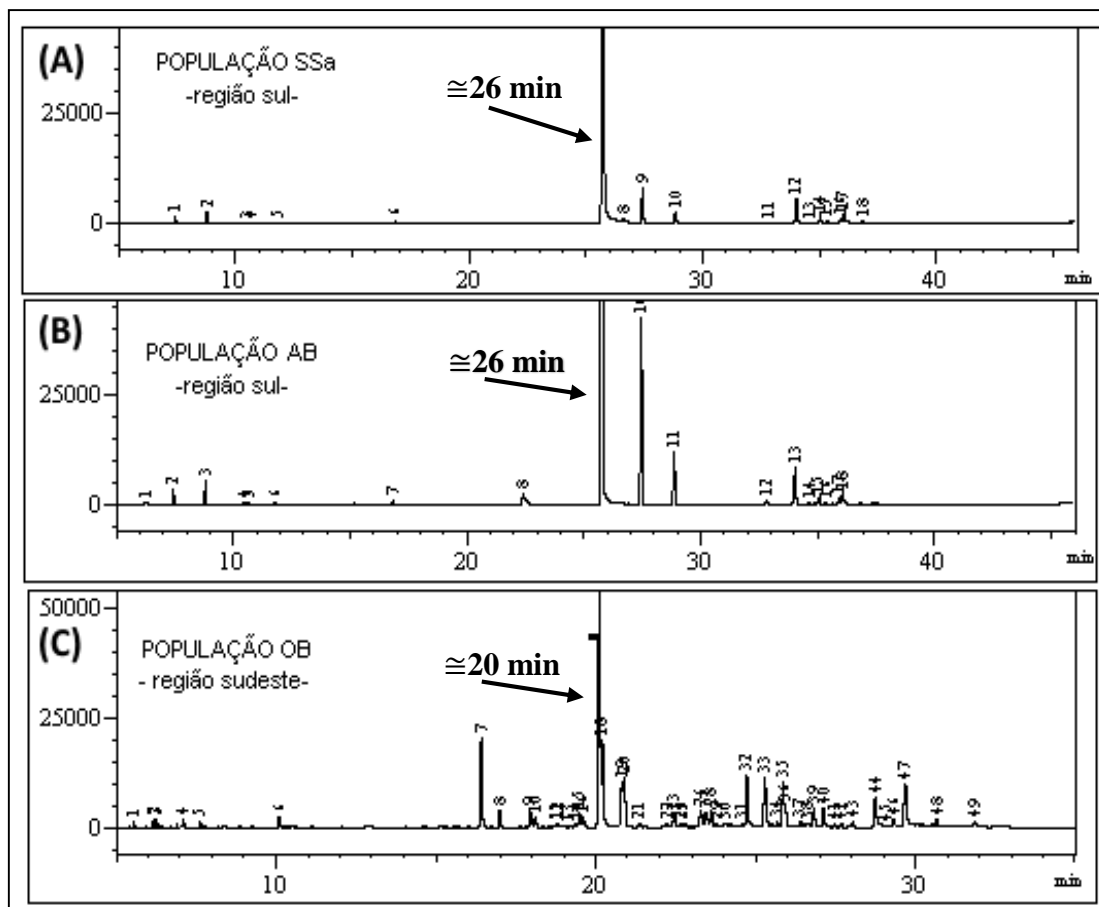
5.3. Composição Química dos Óleos Essenciais das Populações de *Lychnophora pinaster*

Como mencionado anteriormente, para o estudo da composição química dos óleos essenciais e extratos das populações de *L. pinaster* o critério de escolha das populações foram as características genéticas diferenciadas. Foram escolhidas, portanto, as populações AB, SSa e OB (FIGURA 4).

A população OB (região sudeste) está localizada entre os municípios de Moeda e Itabirito e é pertencente a um *pool* gênico bem distinto das demais populações estudadas (GRÁFICOS 3 e 4). A população AB (região sul) é proveniente do município de Carrancas, tendo características genéticas muito similares à população SB pelo K3 e K4 do STRUCTURE v. 2.3.4 (GRÁFICO 3A, B e C) e também com a população SSa pela DAPC (GRÁFICO 4). Por meio do *software* STRUCTURE v. 2.3.4 foi constatado que a população SSa (região sul), também proveniente de Carrancas, vem contribuindo para troca de genes entre populações provenientes de dois *pools* gênicos distintos [*pool* AB-SB (sul) x *pool* PB-SS-SA (sul)] (GRÁFICO 3B e C).

Através da análise visual comparativa dos cromatogramas obtidos por GC/MS é possível constatar a semelhança entre os perfis químicos dos óleos essenciais das populações de *L. pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul (FIGURA 7A-B). Em contrapartida, o perfil químico do óleo essencial da população OB (região sudeste) se mostrou dissimilar das populações do sul (FIGURA 7C).

Figura 7. Cromatogramas de íons totais dos óleos essenciais das folhas de *Lychnophora pinaster* provenientes das populações AB (A) e SSa (B), de Carrancas, região sul de Minas Gerais, e da população OB (C), situada entre os municípios de Moeda e Itabirito, região sudeste de Minas Gerais - Brasil.



De maneira geral, foram registrados 50 metabólitos, cujas porcentagens e índices de retenção estão listadas na Tabela 13 em ordem de eluição.

Tabela 13. Porcentagem (%) Mínima (Min) e Máxima (Máx) dos constituintes registrados nos óleos essenciais das populações de *Lychnophora pinaster*.

Substâncias	IRc	População					
		--Sudeste--		-----Sul-----			
		OB _{n=27}		SSa _{n=17}		AB _{n=11}	
Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx		
1) α -pineno ^{HM}	930	0.1	1.4	0.4	2.6	0.1	1.7
2) sabineno ^{HM}	969	0.1	1.4	nr	nr	nr	Nr
3) β -pineno ^{HM}	973	0.2	1.8	0.5	3.6	0.1	1.9
4) limoneno ^{HM}	1025	0.2	1.5	0.1	0.5	0.1	0.5
5) γ -terpineno ^{HM}	1055	0.2	1.4	0.1	0.5	0.1	0.4
6) linalol ^{MO}	1097	0.1	1.2	nr	nr	nr	nr
7) n-nonanal ^{AL}	1101	0.1	0.3	nr	nr	nr	nr
8) Z-p-mente-2-en-1-ol ^{MO}	1118	0.1	0.7	nr	nr	nr	nr
9) terpinen-4-ol ^{MO}	1174	0.2	3.6	0.2	0.9	0.2	0.8
10) α -terpineol ^{MO}	1188	nr	nr	0.1	0.2	-	0.2
11) Z-cinamato de metila ^{FE}	1301	nr	nr	0.1	0.6	0.4	6.1
12) E-cinamato de metila^{FE}	1382	nr	nr	74.3	87.2	58.2	85.1
13) cipereno ^{HS}	1398	0.4	10.0	nr	nr	nr	nr
14) E-cariofileno^{HS}	1418	0.2	2.9	3.3	12.0	6.2	18.2
15) nd1*	1448	1.5	2.9	nr	nr	nr	nr
16) α -humuleno ^{HS}	1452	0.6	1.6	1.1	4.1	1.8	5.3
17) dehidro-sesquicineol ^{SO}	1467	0.2	0.4	nr	nr	nr	nr
18) 7-epi-1,2-dehidro-esquicineol ^{SO}	1475	0.1	0.5	nr	nr	nr	nr
19) nd2*	1483	0.05	0.4	nr	nr	nr	nr
20) β -selineno ^{HS}	1492	1.0	3.0	nr	nr	nr	nr
21) viridifloreno ^{HS}	1496	0.1	1.3	nr	nr	nr	nr
22) nd3*	1511	17.9	43.3	nr	nr	nr	nr
23) nd4*	1514	0.2	9.7	nr	nr	nr	nr
24) nd5*	1519	0.1	0.6	nr	nr	nr	nr
25) δ -cadineno ^{HS}	1521	0.1	0.4	nr	nr	nr	nr
26) nd6*	1535	2.8	6.5	nr	nr	nr	nr
27) nd1**	1550	nr	nr	0.1	0.3	0.2	1.3
28) óxido de cariofileno ^{SO}	1580	0.5	1.9	1.4	4.7	1.5	9.4
29) nd7*	1587	0.1	0.4	nr	nr	nr	nr
30) nd8*	1603	0.5	4.1	nr	nr	nr	nr
31) Z-sesquilavandulol ^{SO}	1607	nr	nr	0.3	1.0	0.2	1.3
32) β -atlantol ^{SO}	1611	0.2	2.1	nr	nr	nr	nr
33) isolongifolan-7- α -ol ^{SO}	1614	0.05	1.4	0.1	0.4	0.1	0.4
34) nd9*	1628	0.2	0.5	nr	nr	nr	nr
35) epóxi-alo-aromadendreno ^{SO}	1630	nr	nr	0.1	1.2	0.2	1.7
36) nd10*	1633	0.1	1.3	nr	nr	nr	nr
37) selina-3,11-dien-6- α -ol ^{SO}	1634	nr	nr	0.2	2.1	0.5	3.5

nr= não registrado na população; IRc= Índice de retenção calculado; n= coletadas na população; nd= substância não identificada na população da ()= região sudeste ou (**)= região sul; FE= fenilpropanóide, SO= sesquiterpeno oxigenado, HS= hidrocarboneto sesquiterpênico; MO= monoterpeno oxigenado, HM= hidrocarboneto monoterpênico, AL= aldeído.

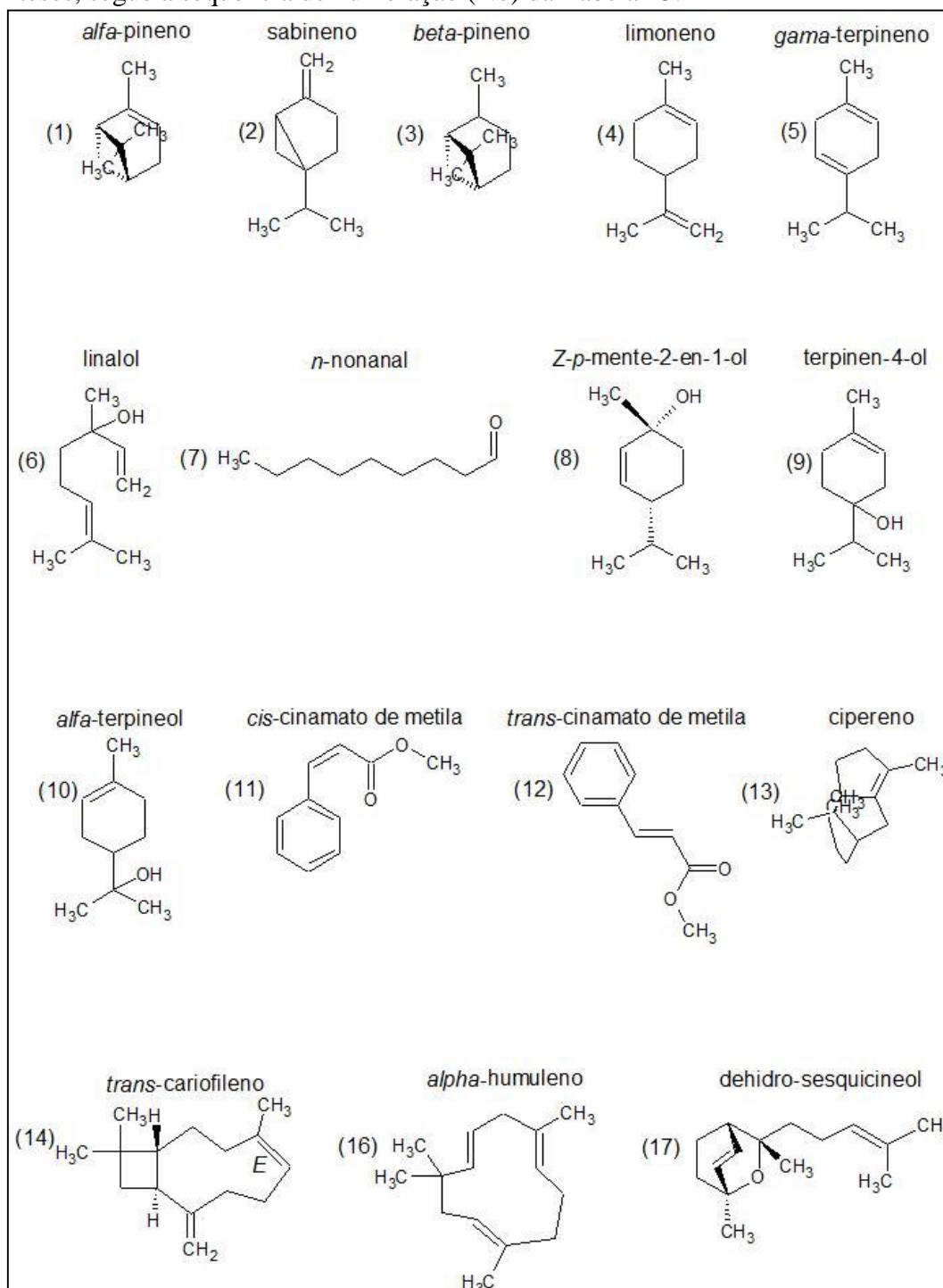
Tabela 13. Continuação...

Substâncias	IRc	População					
		-Sudeste-		-----Sul-----			
		OB _{n= 27}		SSa _{n= 17}		AB _{n= 11}	
		Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx
38) cedreanol^{SO}	1648	2.6	9.8	nr	nr	nr	nr
39) nd11*	1652	0.1	1.5	nr	nr	nr	nr
40) 14-hidroxi-Z-cariofileno ^{SO}	1663	0.8	5.9	nr	nr	nr	nr
41) nd12*	1668	0.1	0.2	nr	nr	nr	nr
42) nd13*	1675	0.2	3.0	nr	nr	nr	nr
43) nd14*	1682	0.1	6.1	nr	nr	nr	nr
44) nd15*	1696	0.1	0.7	nr	nr	nr	nr
45) 14-hidroxi- α -humuleno ^{SO}	1708	0.2	1.9	nr	nr	nr	nr
46) 2Z, 6E-farnesol ^{SO}	1720	0.1	2.1	nr	nr	nr	nr
47) nd16*	1737	0.3	0.3	nr	nr	nr	nr
48) nd17*	1768	2.0	9.5	nr	nr	nr	nr
49) nd18*	1786	0.1	6.0	nr	nr	nr	nr
50) nd19*	1797	2.2	19.6	nr	nr	nr	nr

nr= não registrado na população; IRc= Índice de retenção calculado; n= plantas coletadas na população; nd= substância não identificada na população da ()= região sudeste; SO= sesquiterpeno oxigenado.

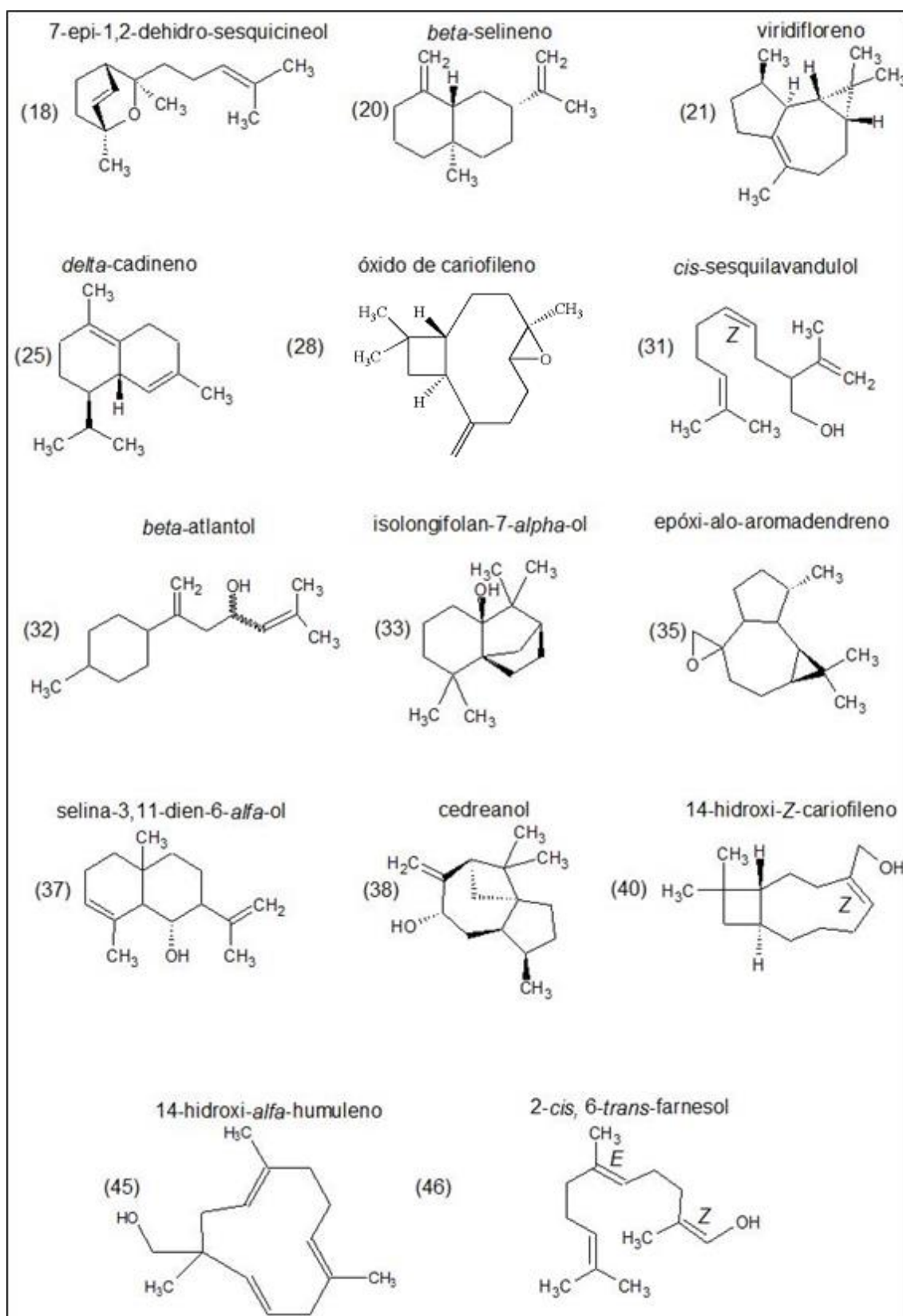
As estruturas químicas dos metabólitos identificados estão apresentadas na Figura 8, onde é possível visualizar que todos os monoterpênicos identificados - exceto o linalol - são formados por esqueletos cíclicos. Predominantemente, sesquiterpenos cíclicos foram identificados no óleo essencial da população OB (TABELA 13, FIGURA 8).

Figura 8. Estrutura química das substâncias identificadas nos óleos essenciais das três populações de *Lychnophora pinaster* estudadas. A numeração das substâncias, entre parênteses, segue a sequência de numeração (No) da Tabela 13.



*Estruturas químicas de Adams (2007).

Figura 8. Continuação...



*Estruturas químicas de Adams (2007).

Os óleos essenciais das populações SSa e AB (região sul) apresentaram o fenilpropanóide (*E*)-cinamato de metila como majoritário (SSa: 80.3%; AB: 72.1%) (TABELA 13), seguido dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos *E*-cariofileno (SSa: 8.1%; AB: 11.7%) e α -humuleno (SSa: 2.5%; AB: 3.4%) e do sesquiterpeno oxigenado óxido de cariofileno (SSa: 2.1%; AB: 3.3%) como os outros três constituintes mais abundantes (TABELA 13). Estas substâncias perfizeram 93.0% e 90.5% dos óleos essenciais de SSa e AB, respectivamente.

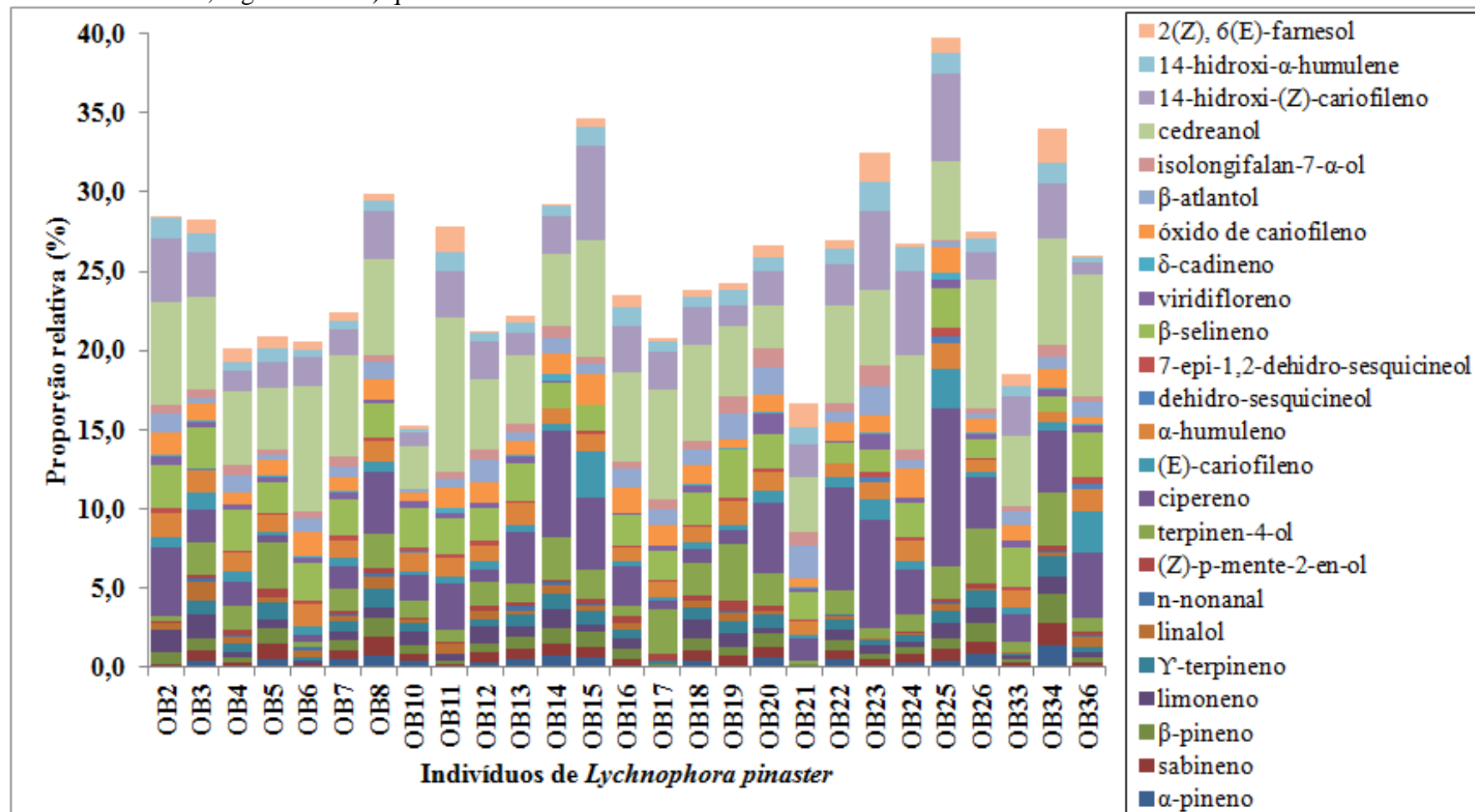
Estudos prévios de avaliação da composição química do óleo essencial das populações AB e SSa foram realizados (ISOBE, 2012; SILVA, 2013). Comparados aos dados obtidos neste estudo, verificou-se que, passados aproximadamente três anos, a composição química do óleo essencial destas duas populações não se alterou sob o ponto de vista qualitativo.

A população OB apresentou composição química complexa, composta principalmente por sesquiterpenos, e ausência de fenilpropanóides. A comparação dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema GC-MS e índices de retenção não permitiu a identificação das substâncias mais abundantes até o momento. Os óleos essenciais desta população foram submetidos a técnicas cromatográficas usuais para isolamento das substâncias e análise por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 e de Hidrogênio, cuja identificação está em andamento. Estas substâncias (32.8%, 7.5% e 5.4% = 45.7%), mais o sesquiterpeno oxigenado cedreanol (5.7%), perfizeram 51.4% do óleo essencial de OB (TABELA 13).

A população OB (sudeste) tem como característica química em comum com populações de *L. pinaster* provenientes da região norte do Estado de Minas Gerais a presença dos sesquiterpenos oxigenados 14-hidroxi-*Z*-cariofileno e 14-hidroxi- α -humuleno (TABELA 13; FIGURA 8), cujos metabólitos estão entre os mais abundantes nos óleos essenciais de populações provenientes dos municípios de Olho d'Água e Diamantina (VIEIRA, 2012). Populações de *L. pinaster* da região norte de Minas Gerais também não apresentam traço de substâncias pertencentes à classe dos fenilpropanóides nos óleos essenciais.

Foi verificado comportamento fenotípico diferencial entre os indivíduos de *L. pinaster* estudados quanto ao acúmulo dos metabólitos dentro das populações, como pode ser constatado nos Gráficos 10, 11 e 12 para os constituintes identificados.

Gráfico 12. Comportamento fenotípico diferencial dos indivíduos de *Lychnophora pinaster* provenientes da população OB (entre municípios de Moeda e Itabirito, região sudeste) quanto ao acúmulo dos constituintes identificados nos óleos essenciais. Estado de Minas Gerais – Brasil.

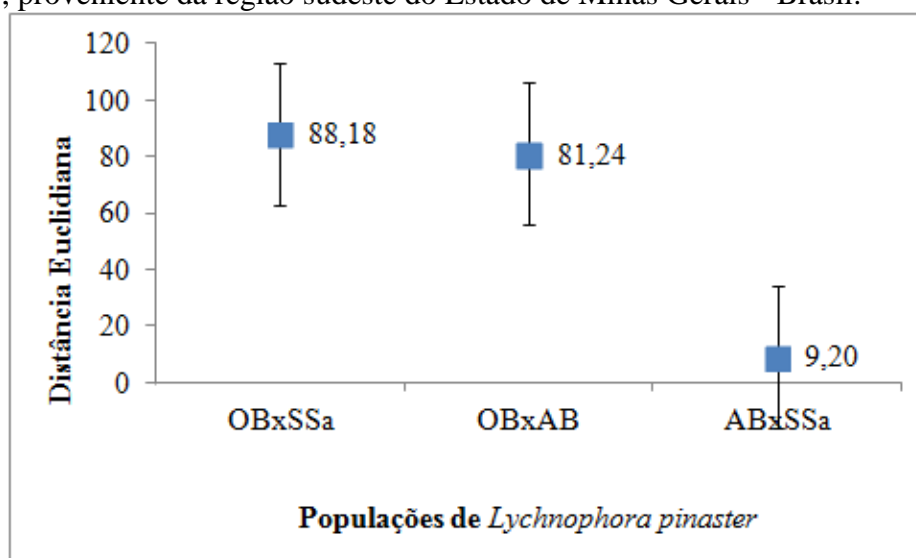


Os dados detalhados (%) de composição química de cada indivíduo para cada população de *L. pinaster* podem ser verificados nos Apêndices 5, 6 e 7.

5.3.1. Polimorfismo Químico das Populações

Como já era o esperado, quando os dados de composição química média dos óleos essenciais das três populações estudadas foram analisados em conjunto, constatou-se na análise exploratória que as maiores distâncias químicas foram entre OB, proveniente da região sudeste, e as populações AB e SSa, provenientes da região sul (GRÁFICO 13).

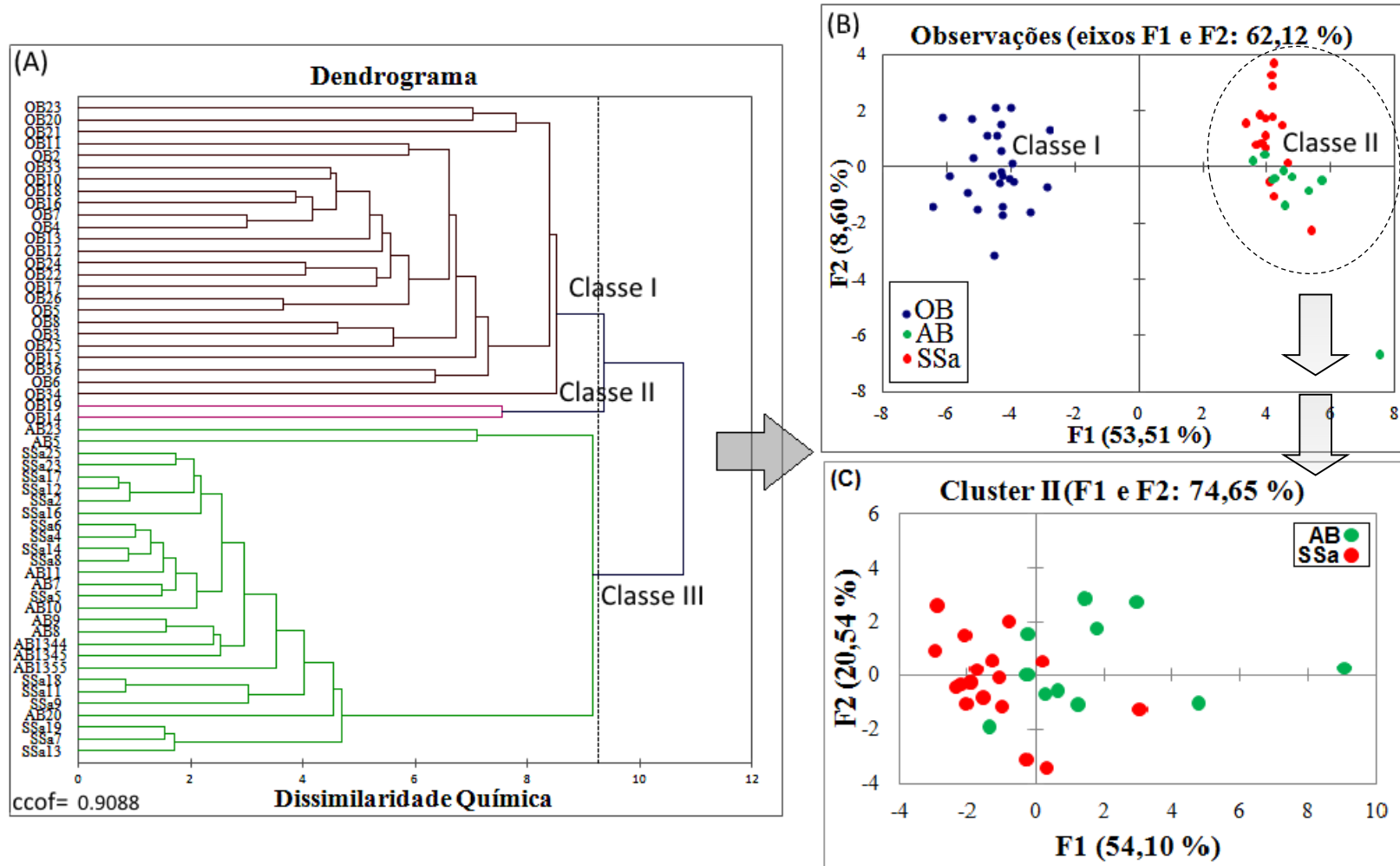
Gráfico 13. Distância Euclidiana par a par levando em conta a composição química dos óleos essenciais das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul, e OB, proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.



*Barras na vertical são equivalentes ao erro padrão.

Conseqüentemente, levando em conta todos os indivíduos, a divergência química entre OB (sudeste) e AB/SSa (sul) também foi constatada pelo *clustering* hierárquico e pela PCA (GRÁFICO 14A-B). Na PCA, tendência à subdivisão da Classe II, que corresponde aos acessos provenientes de AB (em verde) e SSa (em vermelho) também pode ser observada (Gráfico 14B-C). Isto indica que, embora com perfil químico similar de óleo essencial (FIGURA 7A-B), quantitativamente, seus óleos essenciais tendem a possuírem padrões distintos. Esta divergência química entre populações foi investigada pela MANOVA na DA.

Gráfico 14. Dendrograma de dissimilaridade química (A) e Análise de Componentes Principais (B-C) levando em conta as populações de *Lychnophora pinaster* OB (região sudeste) e SSa e AB (sul) do Estado de Minas Gerais - Brasil.



*ccof= coeficiente de correlação cofenético; dendrograma baseado no algoritmo UPGMA e no índice de dissimilaridade da distância euclidiana.

Inicialmente, pela DA, levando em conta as três populações, foi feita a validação do polimorfismo químico intraespecífico de *L. pinaster* com base nas 50 substâncias estudadas nos óleos essenciais (TABELA 13).

Constatou-se que os fenótipos químicos das três populações estudadas são pertencentes a três classes ou grupos, 100% distintos (APÊNDICE 8), e que existe ao menos um contraste significativo entre as médias das populações pela MANOVA (p -valor < 0.0001, alfa 0.05).

As proporções relativas médias de 43 metabólitos diferiram entre populações pelo UTEMC (p -valor < 0.05), sendo que 37 metabólitos discriminaram o óleo essencial de OB (TABELA 14, coluna “População Discriminada”).

Os três metabólitos com maior poder discriminante (maior F) foram: *E*-cinamato de metila, majoritário no óleo essencial de AB e SSa; e dois sesquiterpenos não identificados presentes em OB (nd1 e nd3), sendo um deles (nd3) o majoritário no óleo essencial (TABELA 14). As variáveis que melhor resumem este modelo DA são apresentadas no Gráfico 15.

Mesmo entre populações muito próximas - neste caso AB e SSa -, foi verificado que a proporção relativa média de princípios ativos (α -pineno, β -pineno, *E*-cinamato de metila, *E*-cariofileno, α -humuleno) também pode variar significativamente (GRÁFICO 16; TABELA 15). A divergência nos óleos essenciais de AB e SSa sob o ponto de vista quantitativo foi comprovada pela MANOVA (p -valor= 0.006; alfa= 0.05). A diferença entre os fenótipos químicos destas duas populações chegou em 100% pela matriz de confusão (APÊNDICE 9) em função de acúmulo significativamente maior de sesquiterpenos (*E*-cariofileno, isolongifolan-7- α -ol, selina-3,11-dien-6- α -ol, óxido de cariofileno, α -humuleno e de um sesquiterpeno não identificado (nd1)) e do fenilpropanóide *Z*-cinamato de metila no óleo essencial de AB e de acúmulo significativamente maior dos hidrocarbonetos monoterpênicos α -pineno e β -pineno e do fenilpropanóide *E*-cinamato de metila no óleo essencial de SSa (GRÁFICO 16; TABELA 15, ver p -valor). Estas substâncias exprimiram 100% da variação original dos dados, explicada por F1, e os metabólitos que mais contribuíram (maior F) para a diferenciação entre AB e SSa foram o sesquiterpeno não identificado ‘nd1’ (AB) e o *E*-cinamato de metila (SSa) (TABELA 15, vide F).

Tabela 14. Teste Unidimensional de Igualdade das Médias das Classes químicas formadas por AB, SSa e OB. As populações AB e SSa são provenientes da região sul e OB é proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.

Variável	Lambda	F ^a	p-valor	População
<i>E</i> -cinamato de metila ^{FE}	0.012	2.177.531*	< 0.0001	SSa
nd1*	0.043	576.261*	< 0.0001	OB
nd3*	0.060	405.311*	< 0.0001	OB
β -selineno ^{HS}	0.103	227.258*	< 0.0001	OB
cedreanol ^{SO}	0.146	151.684*	< 0.0001	OB
<i>E</i> -cariofileno ^{HS}	0.176	121.365*	< 0.0001	AB
nd19 *	0.243	81.058	< 0.0001	OB
14-hidroxi- α -humuleno ^{SO}	0.259	74.435	< 0.0001	OB
nd21 *	0.283	65.837	< 0.0001	OB
<i>Z</i> -sesquilavandulol ^{SO}	0.284	65.524	< 0.0001	AB
α -humuleno ^{HS}	0.323	54.549	< 0.0001	AB
β -atlantol ^{SO}	0.333	52.191	< 0.0001	OB
14-hidroxi- <i>Z</i> -cariofileno ^{SO}	0.335	51.608	< 0.0001	OB
nd9*	0.360	46.175	< 0.0001	OB
nd1 **	0.395	39.752	< 0.0001	AB
selina-3,11-dien-6- α -ol ^{SO}	0.431	34.389	< 0.0001	AB
nd15*	0.462	30.334	< 0.0001	OB
sabineno ^{HM}	0.478	28.389	< 0.0001	OB
viridifloreno ^{HS}	0.495	26.534	< 0.0001	OB
isolongifalano-7- α -ol ^{SO}	0.508	25.211	< 0.0001	OB
cipereno ^{HS}	0.523	23.675	< 0.0001	OB
linalol ^{MO}	0.526	23.476	< 0.0001	OB
7-epi-1,2-dehidro-sesquicineol ^{SO}	0.531	23.008	< 0.0001	OB
epóxi-alo-aromadendreno ^{SO}	0.546	21.627	< 0.0001	AB
nd17*	0.559	20.551	< 0.0001	OB
nd10*	0.562	20.236	< 0.0001	OB
2 <i>Z</i> , 6 <i>E</i> -farnesol ^{SO}	0.564	20.131	< 0.0001	OB
<i>Z</i> - <i>p</i> -mente-2-en-1-ol ^{MO}	0,572	19.433	< 0.0001	OB
terpinen-4-ol ^{MO}	0,574	19.331	< 0.0001	OB
nd4*	0.592	17.934	< 0.0001	OB
nd16*	0.595	17.710	< 0.0001	OB
<i>Z</i> -cinamato de metila ^{FE}	0.603	17.105	< 0.0001	AB
α -pineno ^{HM}	0.607	16.838	< 0.0001	SSa
óxido de cariofileno ^{SO}	0.632	15.138	< 0.0001	AB
nd12*	0.635	14.963	< 0.0001	OB
γ -terpineno ^{HM}	0.649	14.066	< 0.0001	OB
limoneno ^{HM}	0.662	13.257	< 0.0001	OB
β -pineno ^{HM}	0.723	9.971	0.0002	SSa

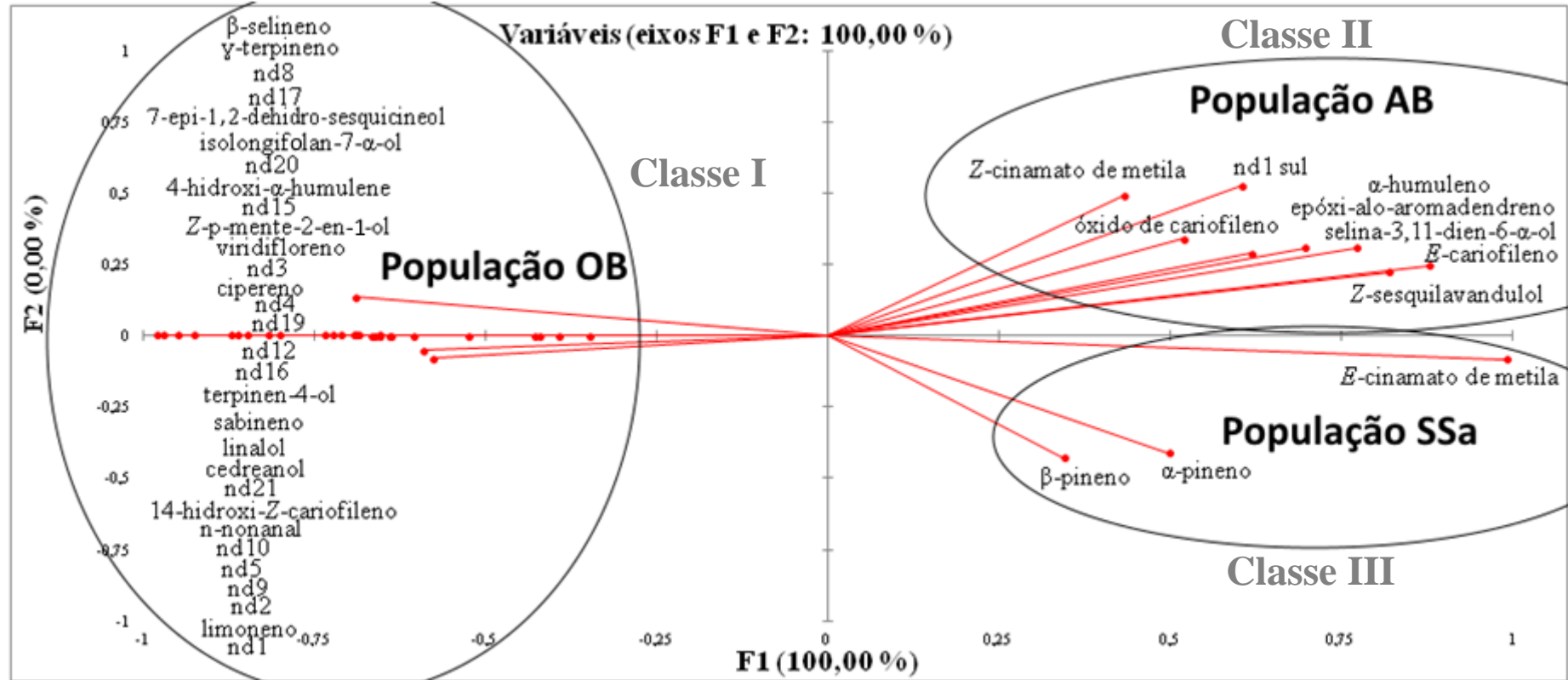
Metabólitos ordenados conforme poder discriminante; ()= Variáveis com maior poder discriminante; *p*-valor calculado inferior ao alfa (0.05) indica que a variável difere entre classes pela DA; (*)= região sudeste, (**)= região sul; FE= fenilpropanóide, SO= sesquiterpeno oxigenado, HS= hidrocarboneto sesquiterpênico; MO= monoterpeno oxigenado, HM= hidrocarboneto monoterpênico, AL= aldeído.

Tabela 14. Continuação...

Variável	Lambda	F ^a	<i>p</i> -valor	População Discriminada
nd20*	0.726	9.804	0.0002	OB
nd2*	0.816	5.85	0.0051	OB
nd5*	0.88	3.548	0.0359	OB
α -terpineol ^{MO}	0.918	2.338	0.1066	-
nd13	0.918	2.338	0.1066	OB
δ -cadineno ^{HS}	0.924	2.148	0.127	OB
dehidro-sesquicineol ^{SO}	0.924	2.129	0.1292	OB
nd14*	0.927	2.048	0.1392	OB
nd18*	0.981	0.509	0.604	OB
nd6 ^b	-	-	-	-

Metabólitos ordenados conforme poder discriminante; ()= Variáveis com maior poder discriminante; *p*-valor calculado inferior ao alfa (0.05) indica que a variável difere entre classes pela DA; (*)= região sudeste, (**)= região sul; FE= fenilpropanóide, SO= sesquiterpeno oxigenado, HS= hidrocarboneto sesquiterpênico; MO= monoterpene oxigenado, HM= hidrocarboneto monoterpênico, AL= aldeído.

Gráfico 15. Análise Discriminante para validação da divergência química nos óleos essenciais das populações de *Lychnophora pinaster* provenientes das regiões sul, AB e Ssa, e sudeste, OB, do Estado de Minas Gerais - Brasil. Diagrama vetorial exibindo as correlações negativas e positivas dos metabólitos com o primeiro fator.



*Lambda 0.000; F (Valor observado) 521.102, F (Valor crítico) 1.815, p -valor < 0.0001, alfa 0.05.

Gráfico 16. Análise Discriminante para validação da divergência química nos óleos essenciais de AB e Ssa, provenientes do município de Carrancas, localizado na região sul do Estado de Minas Gerais - Brasil. Gráfico de escores (A) e diagrama vetorial exibindo as correlações negativas e positivas dos 16 metabólitos com o primeiro fator (B).

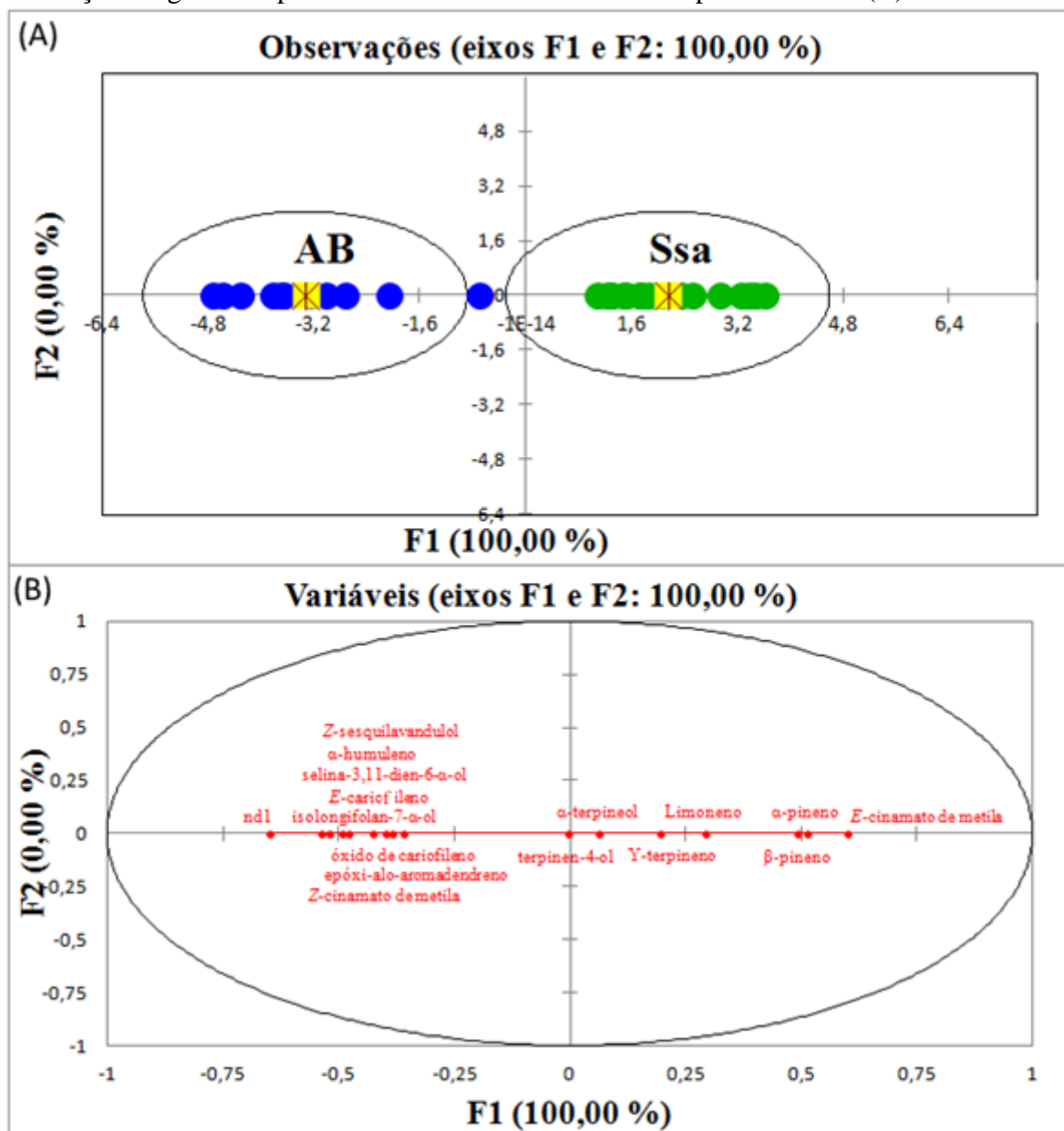


Tabela 15. Teste Unidimensional de Igualdade das Médias das Classes químicas formadas pelos óleos essenciais das populações SSa e AB via Análise Discriminante. As populações AB e SSa são provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais - Brasil.

Variável	Lambda	F ^a	p-valor	População Discriminada
nd1	0.624	15.671*	0.001	AB
<i>E</i> -cinamato de metila ^{FE}	0.686	11.910*	0.002	SSa
<i>Z</i> -cinamato de metila ^{FE}	0.742	9.020*	0.006	AB
<i>E</i> -cariofileno ^{HS}	0.759	8.269*	0.008	AB
α -pineno ^{HM}	0.771	7.741*	0.010	SSa
α -humuleno ^{HS}	0.784	7.144*	0.013	AB
β -pineno ^{HM}	0.790	6.922	0.014	SSa
isolongifolan-7- α -ol ^{SO}	0.796	6.674	0.016	AB
selina-3,11-dien-6- α -ol ^{SO}	0.838	5.018	0.034	AB
óxido de cariofileno ^{SO}	0.858	4.315	0.048	AB
<i>Z</i> -sesquilavandulol ^{SO}	0.867	3.974	0.057	AB
epóxi-alo-aromadendreno ^{SO}	0.883	3.439	0.075	AB
limoneno ^{HM}	0.926	2.070	0.162	SSa
γ -terpineno ^{HM}	0.967	0.885	0.356	SSa
α -terpineol ^{MO}	0.997	0.078	0.782	SSa
terpinen-4-ol ^{MO}	1.000	0.001	0.981	SSa

Metabólitos ordenados conforme poder discriminante; ()= Variáveis com maior poder discriminante; *p*-valor calculado inferior ao alfa (0.05) indica que a variável difere entre classes pela DA; ^{HM}= Hidrocarboneto monoterpênico, ^{MO}=Monoterpeno oxigenado, ^{FE}= Fenilpropanóide, ^{HS}= Hidrocarboneto sesquiterpênico, ^{SO}= Sesquiterpeno oxigenado.

5.4. Relação entre a Química e os Fatores Ambientais

5.4.1. Populações do Sul versus População do Sudeste

Através da Análise de Redundância (RDA) foi verificado que um total de 92.7% da variação química no óleo essencial entre populações foi explicada pelos solos e 7.3% não foi explicada por este preditor. O Gráfico 17 apresenta os resultados da relação linear (*p*-valor: < 0.0001; alfa 0.05) entre os metabólitos que caracterizam os óleos essenciais de AB, OB e SSa (GRÁFICO 15), denominados na análise como variáveis respostas ou Y, e as variáveis que caracterizam os seus solos de origem (GRÁFICO 8B), denominadas de variáveis explicativas ou X.

Quando as coordenadas geográficas e a altitude foram consideradas como variáveis explicativas (X) foi verificado que 53.5% da variação química no óleo essencial entre populações foi explicada por estes preditores e 46.5% não foi explicada, tendo o modelo RDA indicado relação linear (*p*-valor: < 0.0001; alfa 0.05) entre os metabólitos (Y) característicos do óleo essencial de OB (Cluster I) com a latitude e a

longitude (GRÁFICO 18A-B). Nenhuma relação linear entre os metabólitos de AB e SSa com estes fatores ficou evidente (GRÁFICO 18A-B). Uma certa tendência dos monoterpenos α -pineno e β -pineno se correlacionarem com a altitude foi verificada para amostras coletadas na população SSa (GRÁFICO 18A-B). Porém, para este caso, cautela deve ser tomada com relação ao resultado, uma vez que os pontos X e Y destas variáveis não estão muito próximos.

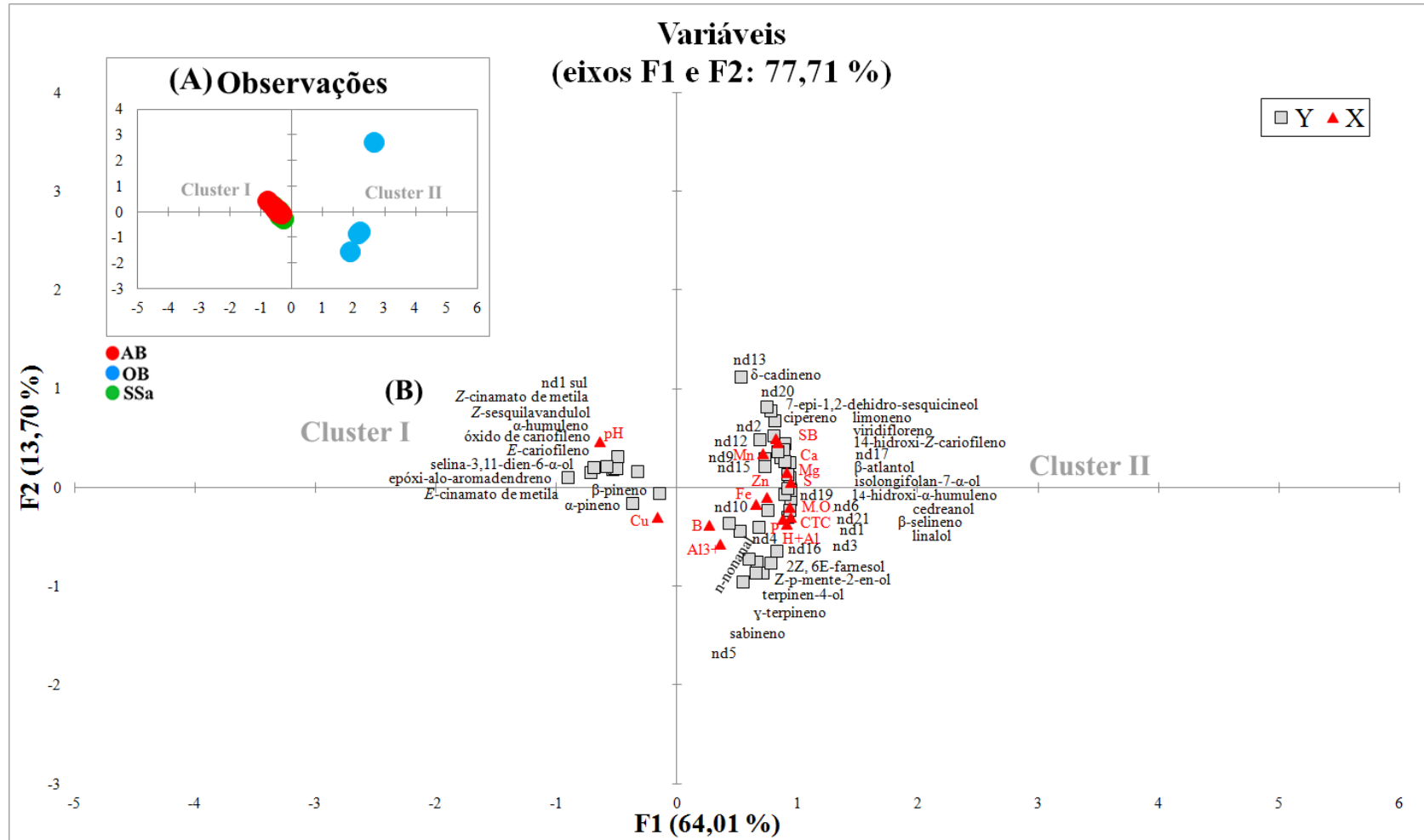
Comparado aos das populações da região sul (SSa e AB), o solo de origem da população OB apresentou teores significativamente maiores da maioria dos nutrientes estudados, como, por exemplo, de Fe, Mn, S, P (114.8, 14.2, 10.3 e 9.6 mg/dm³, respectivamente), Ca e Mg (13.4 e 2.3 mmolc/dm³, respectivamente) (TABELA 10, GRÁFICO 17). Uma proposição inicial foi a de que, como o Mg e algumas vezes Mn estão associados com o estreito requerimento das sesquiterpenos sintases a íons de metais divalentes como cofatores para exercer atividade enzimática e produzir sesquiterpenos (STARKS *et al.*, 1997; PICAUD *et al.*, 2005; DEGENHARDT *et al.*, 2009), os teores maiores de Mg ou Mn no solo da população OB estariam contribuindo para a predominância dos sesquiterpenos em seu óleo essencial, pois maior atividade das sesquiterpenos sintases poderia estar ocorrendo em função da maior disponibilidade destes cofatores, especialmente Mg.

No entanto, isto pode não acontecer, pois se observarmos os valores de pH dos solos de todas as populações estudadas (OB= 3.6, SSa= 3.9 e AB= 4.0) (TABELA 10), que é muito ácido, poderíamos supor que a influência do Mg pode ser, a princípio, destarcada, uma vez que em condições de pH muito ácido a sua disponibilidade para a planta no solo é reduzida, pois a sua solubilidade diminui; o que pode ser observado então para todas as populações. Para Mn pode ser o contrário, pois a elevação do pH é que o torna indisponível para planta, sendo que em pH baixo, ele encontra-se disponível. De acordo com Silva e Souza (1998), nutrientes como K, Ca, Mg, N, S, B e P estão menos disponíveis para a planta em solos com pH baixo e outros, como Fe, Cu, Mn e Zn mostram comportamento inverso. Porém, solos muito ácidos podem intoxicar a planta por Mn (ARQUIVOS DO AGRONÔMICO, 2010). Assim, esta questão deve ser melhor investigada em estudos adicionais com *L. pinaster*, em situações preferencialmente controladas.

O é mais provável de estar acontecendo neste caso é que esteja ocorrendo expressão diferencial de genes que codificam estas sesquiterpenos sintases em função das condições ambientais locais, o que acaba gerando perfil químico diferente entre

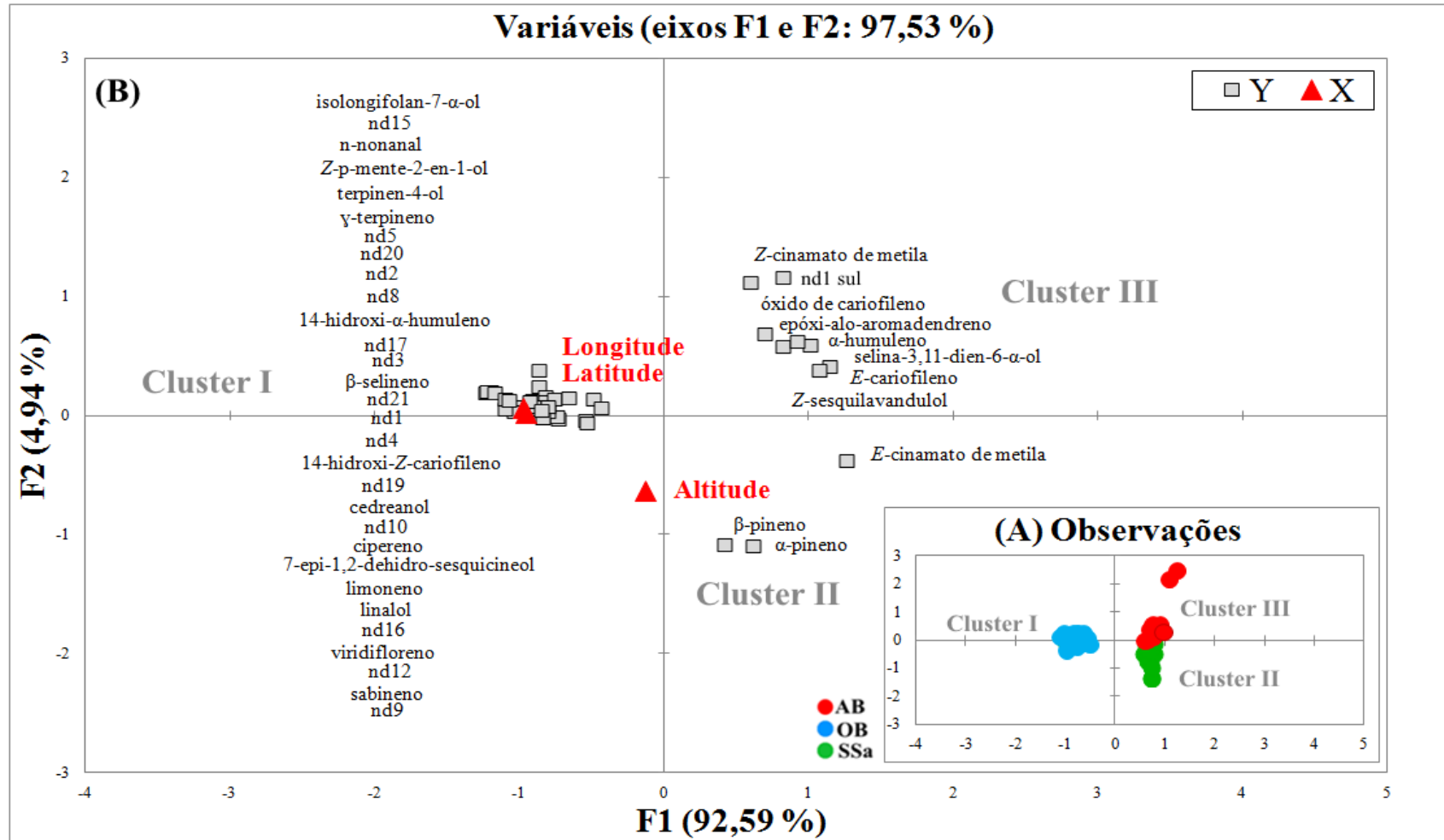
populações das regiões. Por outro lado, outros preditores ambientais podem estar modulando a atividade de reações catalizadas pela fenilalanina amônia liase (PAL) nas populações da região sul (AB/SSa), cuja rota biossintética do ácido chiquímico é a predominante.

Gráfico 17. Análise de Redundância entre as composições químicas dos solos de origem (X) e os metabólitos dos óleos essenciais (Y) característicos das populações de *Lychnophora pinaster*. Populações AB e SSa são provenientes da região sul e OB é proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.



*Permutações: 500; Pseudo F: 7.295; *p*-valor: < 0.0001; alfa: 0.05.

Gráfico 18. Análise de Redundância entre os fatores latitude, longitude e altitude (X) e os metabólitos dos óleos essenciais (Y) característicos das populações de *Lychnophora pinaster*. AB e SSa são provenientes da região sul e OB é proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.



*Permutações 500; Pseudo F 15.724; p -valor < 0.0001; alfa 0.05.

5.4.2 Populações do Sul

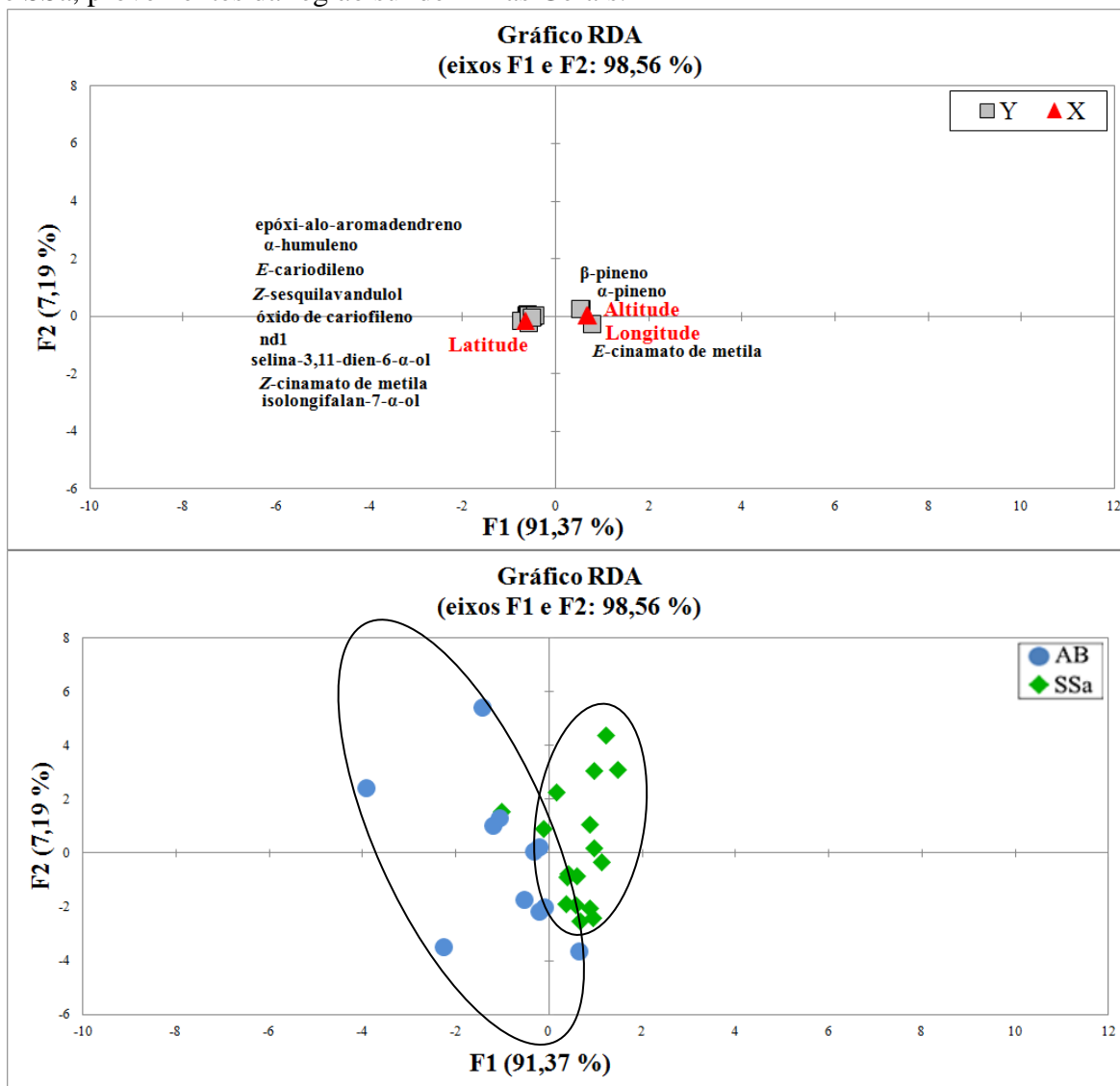
Quando apenas AB e SSa foram consideradas no modelo RDA (p -valor 0.018; α = 0.05), α -pineno, β -pineno e *E*-cinamato de metila, principais discriminantes do óleo essencial de SSa (GRÁFICO 16B), tenderam a associar-se com a longitude e a elevada altitude (1292 m) (GRÁFICO 19A-B), característica do local de origem da população SSa (TABELA 2). Isto pode sugerir a participação destes metabólitos no processo de proteção vegetal contra danos causados por estresse relacionados à altitude, como elevado índice de radiação UV, por exemplo; merecendo ser investigado. Os sesquiterpenos (*E*-cariofileno, α -humuleno, *Z*-sesquilavandulol, nd1, óxido de cariofileno, selina-3,11-dien-6- α -ol, epóxi-alo-aromadendreno e isolongifolan-7- α -ol) e o fenilpropanóide *Z*-cinamato de metila, discriminantes do óleo essencial de AB (GRÁFICO 16B) se relacionaram com a latitude (GRÁFICO 19A-B). Latitude, longitude e altitude explicaram somente 25.4% da variação química no óleo essencial entre AB e SSa, ao passo que 74.6% da variação não foi explicada por estes preditores.

Relação linear dos metabólitos característicos dos óleos essenciais de SSa e AB com as variáveis que discriminam os seus solos de origem (GRÁFICO 9B) também foi revelada (p -valor 0.048; α = 0.05), como entre S, Al e Cu com os metabólitos α -pineno, β -pineno e *E*-cinamato de metila para as amostras coletadas em SSa (GRÁFICO 20A-B) e entre as variáveis de solo Zn, B e pH com sesquiterpenos e o fenilpropanóide *Z*-cinamato de metila para amostras coletadas em AB (GRÁFICO 20A-B). Foi verificado que 49.7% da variação química dos óleos essenciais entre AB e SSa foi explicada pelos solos, ao passo que 50.3% não foi explicada.

A influência de fatores ambientais na composição química dos óleos essenciais de Asteraceae é documentada (SILVA *et al.*, 2007; BARON *et al.*, 2014; ZOUARI *et al.*, 2014; ANDREANI *et al.*, 2015). O mesmo para representantes de outras famílias, como *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae), cujo maior acúmulo de hidrocarbonetos monoterpênicos foi verificado nos óleos essenciais de indivíduos crescendo em locais de maiores altitudes e solo com maior teor de Cu (OLIVEIRA *et al.*, 2005), corroborando com o atual estudo. Maior acúmulo de hidrocarbonetos monoterpênicos, como o α -pineno e β -pineno em folhas de *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) também ocorreu em maiores altitudes (SAID *et al.*, 2011). O mesmo para α -pineno e alguns monoterpênicos oxigenados de *Pinus yunnanensis* Franch. (Pinaceae) (HENGXIAO *et al.*, 1999).

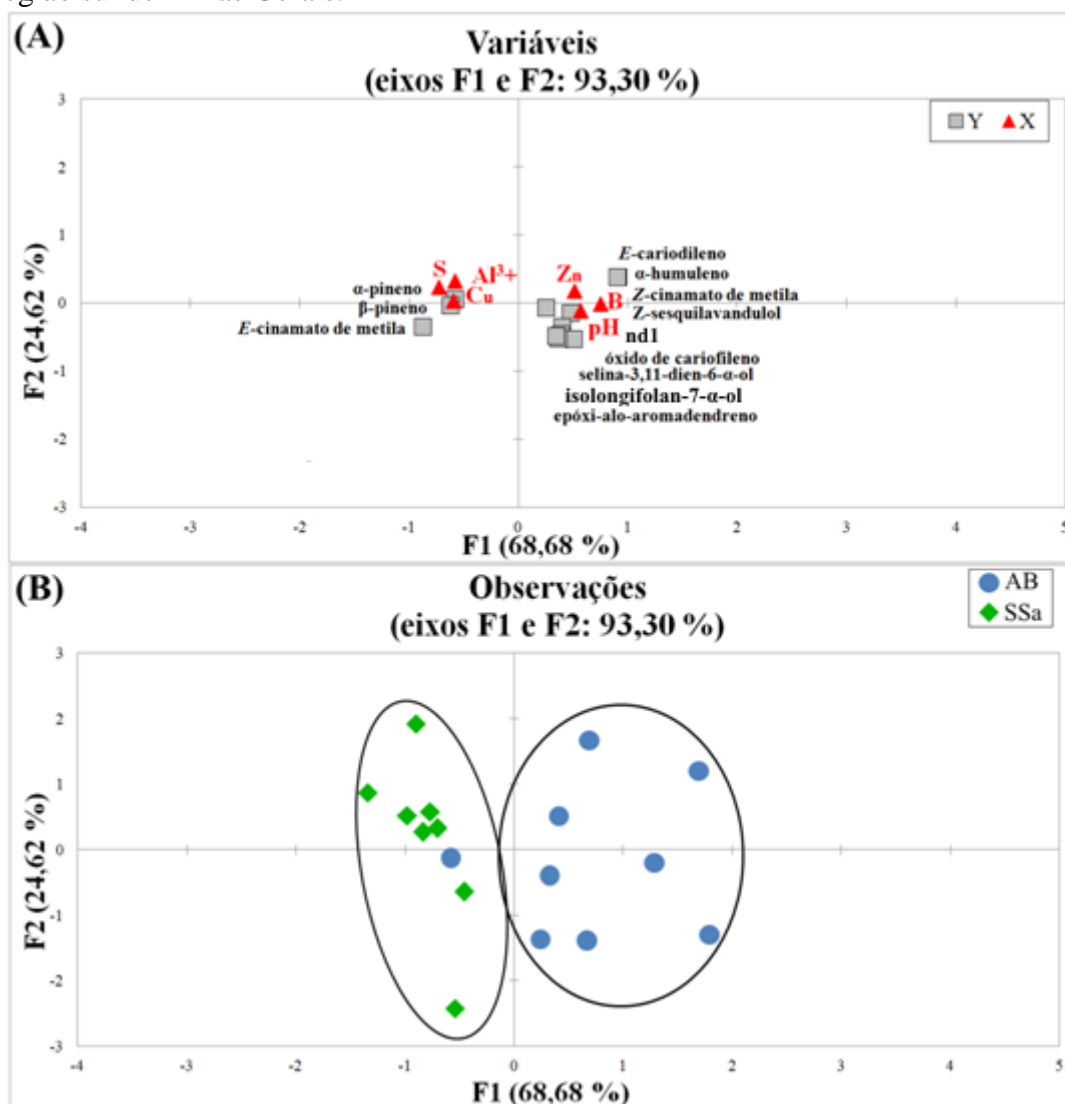
Maior atividade da PAL foi verificada ocorrer em meio com maior teor de Al e Cu para outras espécies vegetais (*Phyllanthus tenellus* Roxb (Phyllanthaceae), *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae), *Phaseolus vulgaris* L. var. Belna (Fabaceae), *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Poaceae) (SANTIAGO *et al.*, 2000; KOVÁČIK *et al.*, 2008, BOUAZIZI *et al.*, 2011; MALMIR, 2012), sugerindo o seu papel no combate de estresses oxidativos causado por metais. Atividade da PAL também é aumentada por fatores ambientais como a luz (pelo seu efeito no citocromo), infecção por fungos e os baixos níveis de nutrientes (TAIZ e ZEIGER, 2009). Como visto anteriormente, comparados ao solo de OB, os solos de origem de AB e SSa se mostraram pobres com relação aos teores de matéria orgânica (MO), P, Al, H+Al, Ca, Mg, S, B, Fe, Mn e Zn (TABELA 10, GRÁFICO 8); o que poderia contribuir para o maior acúmulo de *E*-cinamato de metila no óleo essencial das populações provenientes do sul, merecendo estudos complementares.

Gráfico 19. Análise de Redundância entre os fatores latitude, longitude e altitude “X” e a composição química dos óleos essenciais “Y” das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul de Minas Gerais.



*Permutações 500, Pseudo F 1.363, p -valor 0.018, alfa 0.050.

Gráfico 20. Análise de Redundância entre as composições químicas dos solos de origem “X” e óleos essenciais “Y” das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul de Minas Gerais.



*Permutações 500, Pseudo F 1.791; p -valor 0.048, alfa 0.05.

5.5. Correlação entre Química e Genética

Após verificação do papel dos preditores ambientais na variação da composição química dos óleos essenciais na seção anterior, nesta atual seção, foi analisada a importância do fator genético (dados SSR: marcador neutro) em explicar tal variação.

Para tanto, valores dos coeficientes de correlação matricial (r) simples e parciais obtidos das relações entre “química vs preditores ambientais” e “química vs preditor genético” foram comparados para constatar qual dos preditores (ambiental ou

genético) são os mais importantes para explicar a variação da composição química do óleo essencial em *L. pinaster*.

Inicialmente, foi realizado um teste de correlação matricial simples entre as distâncias Euclidianas química e genética das três populações pelo teste de Mantel, que gerou um $r = 0.553$ (p -valor < 0.0001). Este valor foi inferior ao r obtido da correlação simples entre as matrizes das distâncias Euclidianas obtidas para os dados químicos e das distâncias geográficas ($r = 0.970$; p -valor < 0.0001).

Um alto ou baixo valor do coeficiente de correlação matricial simples pode ser resultado do efeito que uma terceira matriz ou um grupo de matrizes exerce simultaneamente sobre as duas primeiras (TELLES *et al.*, 2001). Através de correlações matriciais parciais, pode-se remover o efeito de uma terceira matriz sobre a associação matricial estudada (SMOUSE *et al.*, 1986), obtendo-se resultados mais seguros. Assim, levando em conta o efeito de uma terceira matriz, foi realizado o desdobramento dos dados pelo teste de Mantel parcial, onde o efeito da terceira matriz é controlado.

Quando o efeito da distância geográfica foi controlado, o coeficiente de correlação parcial entre química e a genética ($r_p = 0.121$; p -valor $= < 0.0001$) tornou-se mais baixo que o coeficiente de correlação simples ($r = 0.553$), obtido anteriormente. Por outro lado, quando o efeito da genética foi controlado, o coeficiente de correlação parcial entre química e a distância geográfica foi positivo, forte e significativo ($r_p = 0.943$, p -valor $= < 0.0001$), bastante similar ao coeficiente de correlação matricial simples obtido anteriormente ($r = 0.970$). Um forte, positivo e significativo coeficiente de correlação matricial simples entre as distâncias Euclidianas obtidas para os dados de nutrientes do solo e composição química dos óleos essenciais também foi obtido ($r = 0.909$; p -valor $< 0,0001$).

Estes dados sugerem que os marcadores microssatélites (marcadores neutros) estão até certo ponto correlacionados ao perfil químico do óleo essencial. Esta correlação, no entanto, embora positiva, é fraca (Mantel parcial, $r = 0.121$), sugerindo que a deriva genética não é o principal fator influenciando no polimorfismo químico do óleo essencial das populações de *L. pinaster*. Contudo, $r = 0.121$ pode ser o reflexo da variação entre os fenótipos químicos dentro de cada população levando em conta o rendimento e a composição química de óleo essencial (GRÁFICOS 10, 11, 12 e 23A). Partindo do pressuposto de que cada fenótipo está potencialmente submetido às mesmas condições ambientais dentro da população (mesma estrutura de solo, clima, etc), é bem provável que,

neste caso, a base para a variação intrapopulacional esteja relacionada à composição genética de cada indivíduo.

O que estes resultados apontam, principalmente, é que o polimorfismo químico do óleo essencial de *L. pinaster* tende mais a ser o reflexo de uma seleção natural de acordo com os fatores ambientais locais. Isto poderia ajudar a explicar o porquê de um material proveniente de uma população nativa de Lavras - Minas Gerais, cujo constituinte majoritário era o sesquiterpeno oxigenado cedr-8(15)-en-9-alfa-ol, passou a produzir o fenilpropanóide *E*-cinamato de metila como majoritário quando cultivado em Botucatu - São Paulo (HABER, 2008).

Estes resultados mostram um avanço no conhecimento dos fatores que determinam a quantidade e a qualidade do óleo essencial de *L. pinaster*. A variação na proporção relativa média entre populações evidencia o valor ecológico adaptativo na produção destes metabólitos. Porém, tal variação pode comprometer a eficácia terapêutica dos óleos essenciais e dos extratos.

5.6. Composição Química dos Extratos Etanólicos das Populações de *Lychnophora pinaster*

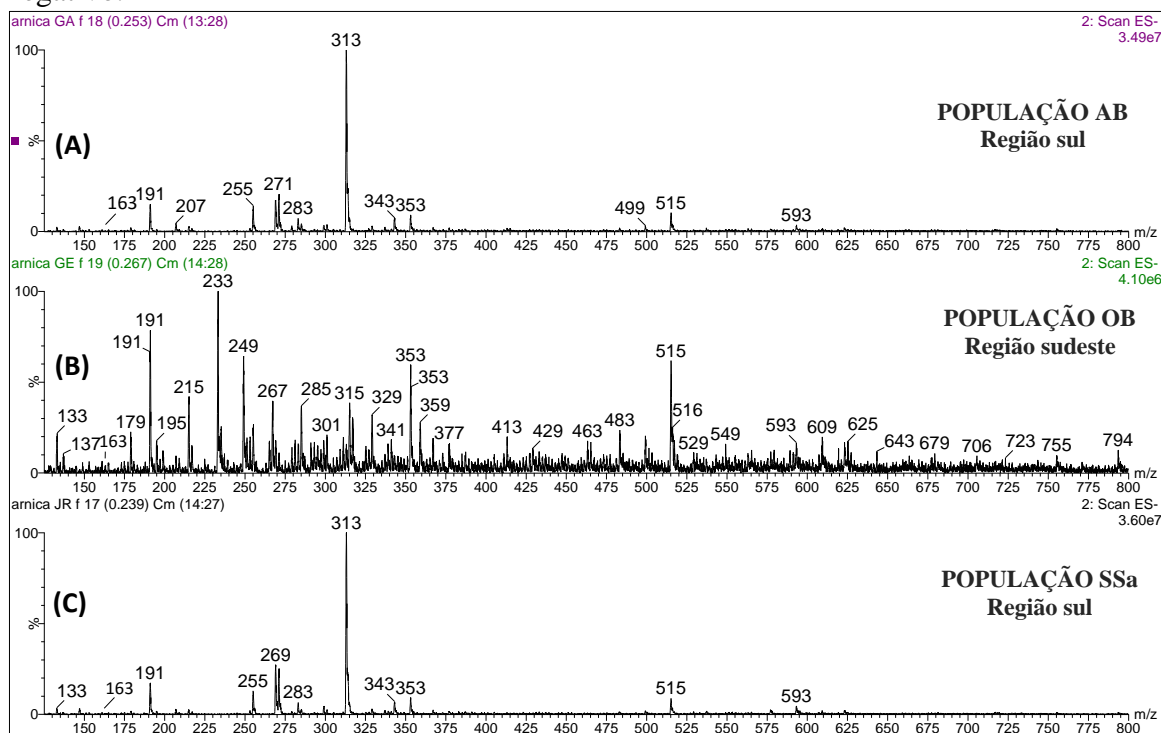
A escolha pela investigação de extratos polares de *L. pinaster* foi devido ao fato da planta na medicina tradicional ser utilizada em preparações alcoólicas ou hidroalcoólicas. De acordo com os dados de literatura, os princípios ativos dos extratos de *L. pinaster* são 15-deoxi-goiazenolido (massa molecular= 344), ácido cafeico (180), ácido isoclorogênico (354), vitexina (432), isovitexina (432), ácido *E*-lichnofórico (254), α -amirina (426), quercetina (302), lupeol (426), estigmasterol (412), sitosterol (414) e friedelina (426) (CHIARI *et al.*, 1991; DUARTE *et al.*, 1993; SILVEIRA *et al.*, 2005a; ALCÂNTARA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 1996; SILVEIRA *et al.*, 2005a; KELES *et al.*, 2011; ABREU *et al.*, 2011; ABREU *et al.*, 2013).

A análise dos extratos etanólicos por UHPLC-ESI-MS no modo negativo foi considerada apropriada para o monitoramento destes princípios ativos, uma vez que no modo positivo nenhum íon dos princípios ativos foi observado. Assim, somente os resultados em modo negativo são apresentados.

5.6.1. Caracterização Qualitativa dos Extratos

A Figura 9 apresenta os espectros ESI-MS no modo negativo dos *fingerprints* das amostras dos extratos etanólicos de cada população de *L. pinaster*. Embora nenhuma abordagem quimiométrica tenha sido realizada, comparação visual direta dos *fingerprints* ESI-MS seguiu o mesmo padrão espacial apresentado pelos óleos essenciais, onde populações do sul (AB/SSa) apresentaram perfil químico similar, enquanto a população OB (sudeste) apresentou perfil químico divergente das demais (FIGURA 9).

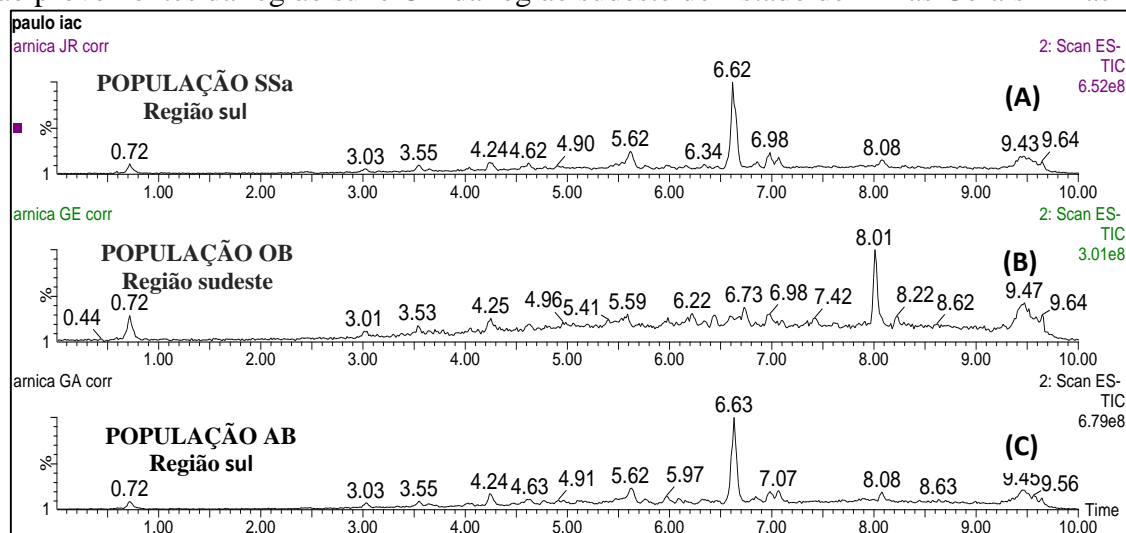
Figura 9. Espectros ESI(-)-MS dos extratos etanólicos das populações de *Lychnophora pinaster* AB (A), OB (B) e SSa (C). AB e SSa são provenientes da região sul e OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil. Scans na extensão de 100-800 m/z , modo negativo.



As amostras dos extratos de AB e SSa compartilharam os mesmos íons, sendo o de m/z 313 o mais intenso (FIGURA 9A e C). Na amostra do extrato da população OB, o íon de m/z 233 foi o mais intenso, seguido dos íons de m/z 191, 249, 515 e 353 (FIGURA 9B). Os íons de m/z 191, 353 e 515 também foram encontrados nas amostras de SSa e AB, porém, em menores intensidades (FIGURA 9A e C). As amostras das três populações também compartilharam em intensidades baixas o íon de m/z 593, (FIGURA 9A, B e C).

Utilizando uma eluição cromatográfica com detecção por ESI-MS em modo negativo também foi possível notar as semelhanças entre os perfis cromatográficos dos extratos das populações SSa e AB em contraste ao perfil cromatográfico da amostra de OB (FIGURA 10A, B e C).

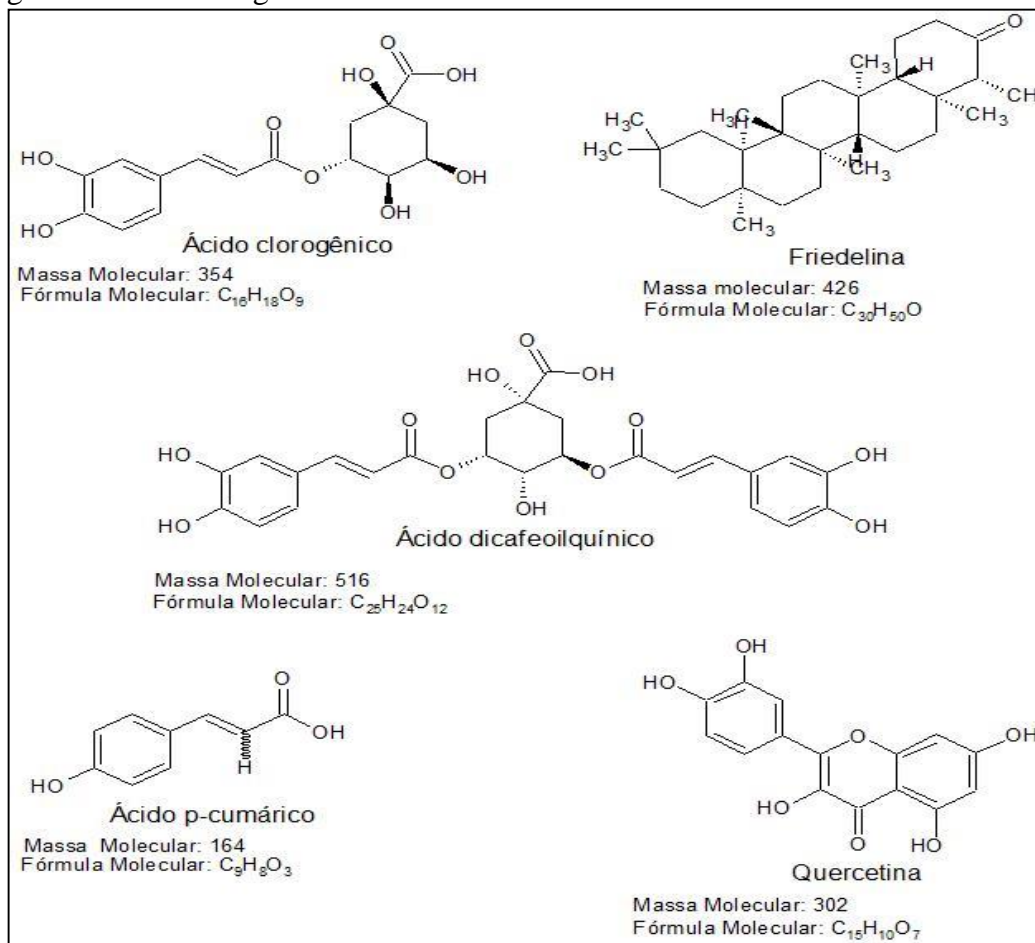
Figura 10. Cromatogramas UHPLC-MS em modo negativo dos extratos etanólicos das partes aéreas das populações de *Lychnophora pinaster* SSa (A), OB (B) e AB (C). AB e SSa são provenientes da região sul e OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.



5.6.2. Busca pelos Princípios Ativos

Dos 12 metabólitos já registrados em *L. pinaster* cujas atividades biológicas foram comprovadas na literatura (TABELA 1) três - ácido clorogênico, quercetina e friedelina - foram identificados nas amostras dos extratos das populações estudadas. Adicionalmente, foram identificados os ácidos *p*-cumárico e dicafeoilquinico. As suas estruturas estão apresentadas na Figura 11.

Figura 11. Estruturas químicas dos compostos identificados nos extratos etanólicos da parte aérea das populações de *Lychnophora pinaster* AB, SSa e OB. AB e SSa são provenientes da região sul e OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.



*Estruturas químicas obtidas do banco de dados de estruturas químicas ChemSpider.

Na Tabela 16 é possível verificar com detalhes os resultados do monitoramento dos princípios ativos utilizando UHPLC-ESI-MS/MS e GC-MS, onde são apresentadas a quantidade de íons detectados por população, o tempo de retenção (t_R) e o método de identificação utilizado.

Nas populações AB e SSa foram encontrados oito íons com m/z compatível às massas moleculares dos princípios ativos descritos na Tabela 1 e sete íons na população OB (TABELA 16).

Com o uso de padrões comerciais do ácido clorogênico e da quercetina (FIGURA 12A e E), por UHPLC, os íons de m/z 353 ($t_R = \cong 3.04$ min) e 301 ($t_R = \cong 5.41$ min) foram identificados em todas as populações (FIGURAS 13B e E; 14B e E; 15B e E).

Os íons de m/z 343 e 253 apresentaram relação m/z compatível com os princípios ativos 15-deoxi-goiazensolido e ácido *E*-lichnofórico, respectivamente (TABELA 1), sugerindo a presença destas substâncias nos extratos. Porém, necessitam de análises complementares para a inequívoca elucidação estrutural das substâncias. Os espectros de fragmentação ESI(-)-MS/MS destes dois íons são apresentados nos Apêndices 10 e 11.

Adicionalmente, em todas as populações, o íon de m/z 163 ($t_R \cong 4.06$ min) foi identificado como o ácido *p*-cumárico por meio da comparação com padrão comercial (FIGURAS 12D, 13D, 14D e 15D) e os de m/z 515 ($t_R \cong 4.24/4.63$ min) como derivados do ácido dicafeoilquinico (FIGURAS 13C, 14C e 15C) através da comparação dos espectros de fragmentação ESI(-)-MS/MS (FIGURA 16) com a literatura (MORAES *et al.*, 2009).

Nas análises também foram utilizados os padrões comerciais da rutina (m/z de 609; $t_R = 4.47$ min) e da vitexina (m/z de 431; $t_R = 4.18$ min) (FIGURA 12B e C), porém, estas substâncias não foram detectadas nos extratos das populações estudadas.

Um isômero da vitexina foi detectado nos extratos de AB e SSa ($t_R = 5.45$ min) (FIGURAS 13A e 14A) e dois isômeros do ácido clorogênico ($t_R \cong 2.48/3.17$ min) foram detectados nos extratos das três populações (FIGURAS 13E, 14E e 15E).

O íon de m/z 426 ($t_R \cong 48.0$ min), detectado por GC-MS, foi identificado como a friedelina mediante a comparação do espectro de massas com a literatura (CHEN *et al.*, 2005) e o banco de dados do sistema GC-MS.

Tabela 16. Dados adquiridos na análise dos extratos das populações de *Lychnophora pinaster* AB, SSa e OB por UHPLC-ESI-MS/MS em modo negativo e GC-MS.

População	Quantidade de íons registrados	t_R (min)	ESI ⁻ [M - H] ⁻ m/z	Identificação	Método Identificação
AB					
Região Sul	1	2.49	353*	isômero ácido clorogênico	
	2	3.04	353*	ácido clorogênico	1
	3	3.19	353*	isômero ácido clorogênico	
	4	4.05	163	ácido <i>p</i> -cumárico	1
	5	4.24	515	ácido dicafeoilquínico	2
	6	4.63	515	ácido dicafeoilquínico	2
	7	5.41	301*	quercetina	1
	8	5.45	431*	isômero vitexina	
	9	6.59	343*		
	10	6.61	253*		
	11	48.13	426*	friedelina	3
SSa					
Região Sul	1	2.48	353*	isômero ácido clorogênico	
	2	3.04	353*	ácido clorogênico	1
	3	3.17	353*	isômero ácido clorogênico	
	4	4.06	163	ácido <i>p</i> -cumárico	1
	5	4.24	515	ácido dicafeoilquínico	2
	6	4.62	515	ácido dicafeoilquínico	2
	7	5.43	301*	quercetina	1
	8	5.45	431*	isômero vitexina	
	9	6.59	343*		
	10	6.80	253*		
	11	47.82	426*	friedelina	3
OB					
Região Sudeste	1	2.48	353*	isômero ácido clorogênico	
	2	3.05	353*	ácido clorogênico	1
	3	3.16	353*	isômero ácido clorogênico	
	4	4.06	163	ácido <i>p</i> -cumárico	1
	5	4.25	515	ácido dicafeoilquínico	2
	6	4.60	515	ácido dicafeoilquínico	2
	7	5.42	301*	quercetina	1
	8	6.77	253*		
	9	6.86	343*		
	10	48.07	426*	friedelina	3

¹=Via UHPLC, espectro de massa comparado com o padrão comercial da substância;

²=Comparação do espectro de massa obtido por UHPLC com espectro de massa da literatura;

³=Comparação do espectro de massa obtido por GC-MS com espectro de massa da literatura.

*= Íons monitorados nos extratos.

Figura 12. Cromatogramas UHPLC-MS em modo negativo dos padrões comerciais da (A) quercetina – m/z de 301, tR 5.41 min; (B) rutina – m/z de 609, tR 4.47 min; (C) vitexina – m/z de 431, tR 4.18 min; (D) ácido p-cumárico – m/z de 163, tR 4.05 min; (E) ácido clorogênico – m/z de 353, tR 3.05 min.

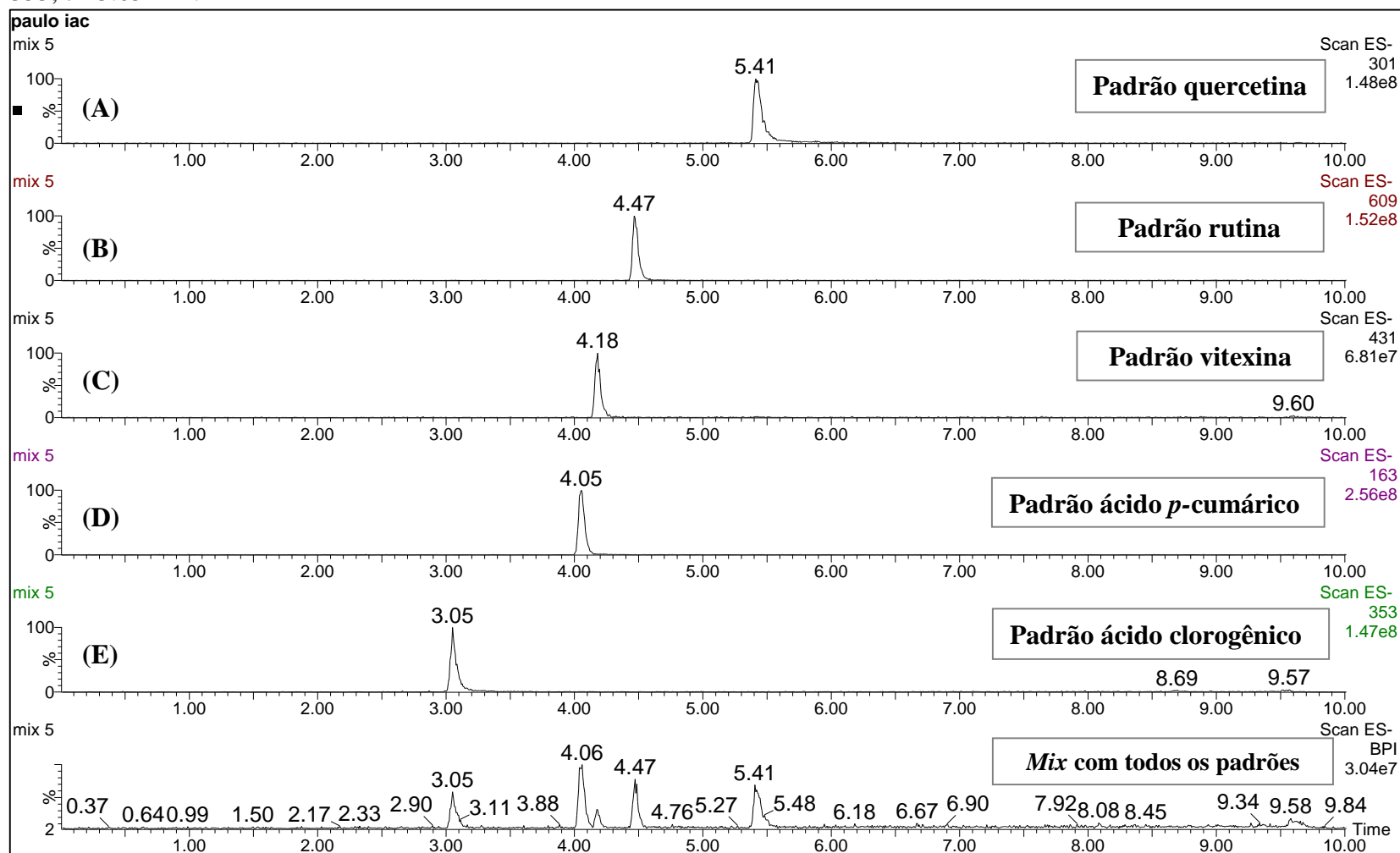


Figura 13. Cromatogramas UHPLC-MS em modo negativo do extrato etanólico da população AB, selecionando os íons (A) de m/z 431 – vitexina, (B) de m/z 301 – quercetina, (C) de m/z 515 – derivados do ácido dicafeoilquínico, (D) de m/z 163 – ácido *p*-cumárico, (E) de m/z 353 – ácido clorogênico. População proveniente de Carrancas, região sul do Estado de Minas Gerais – Brasil.

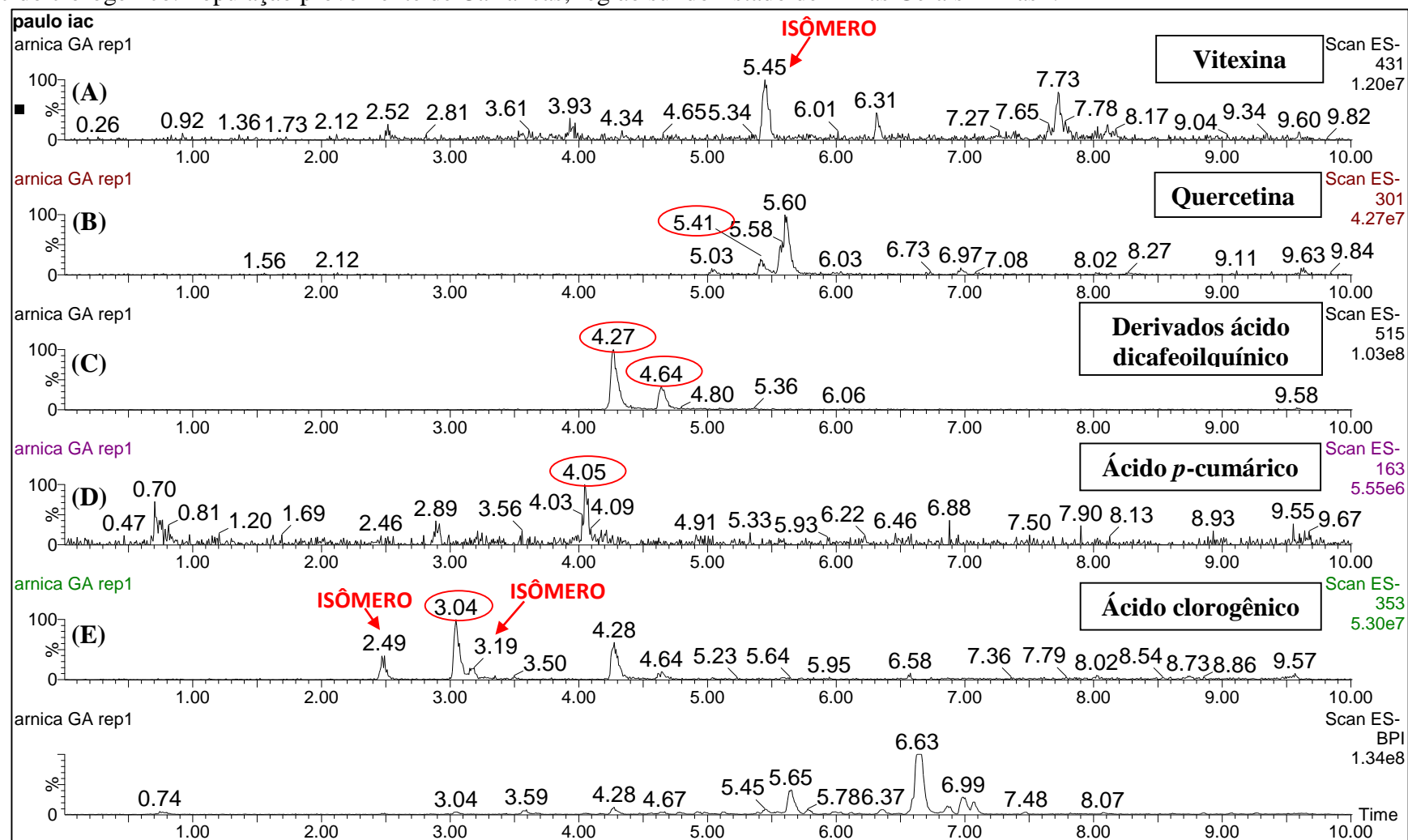


Figura 14. Cromatogramas UHPLC-MS em modo negativo do extrato etanólico da população SSa, selecionando os íons (A) de m/z 431 – vitexina, (B) de m/z 301- quercetina, (C) de m/z 515 – derivados do ácido dicafeoilquínico, (D) de m/z 163 – ácido *p*-cumárico, (E) de m/z 353 – ácido clorogênico. População proveniente de Carrancas, região sul do Estado de Minas Gerais – Brasil.

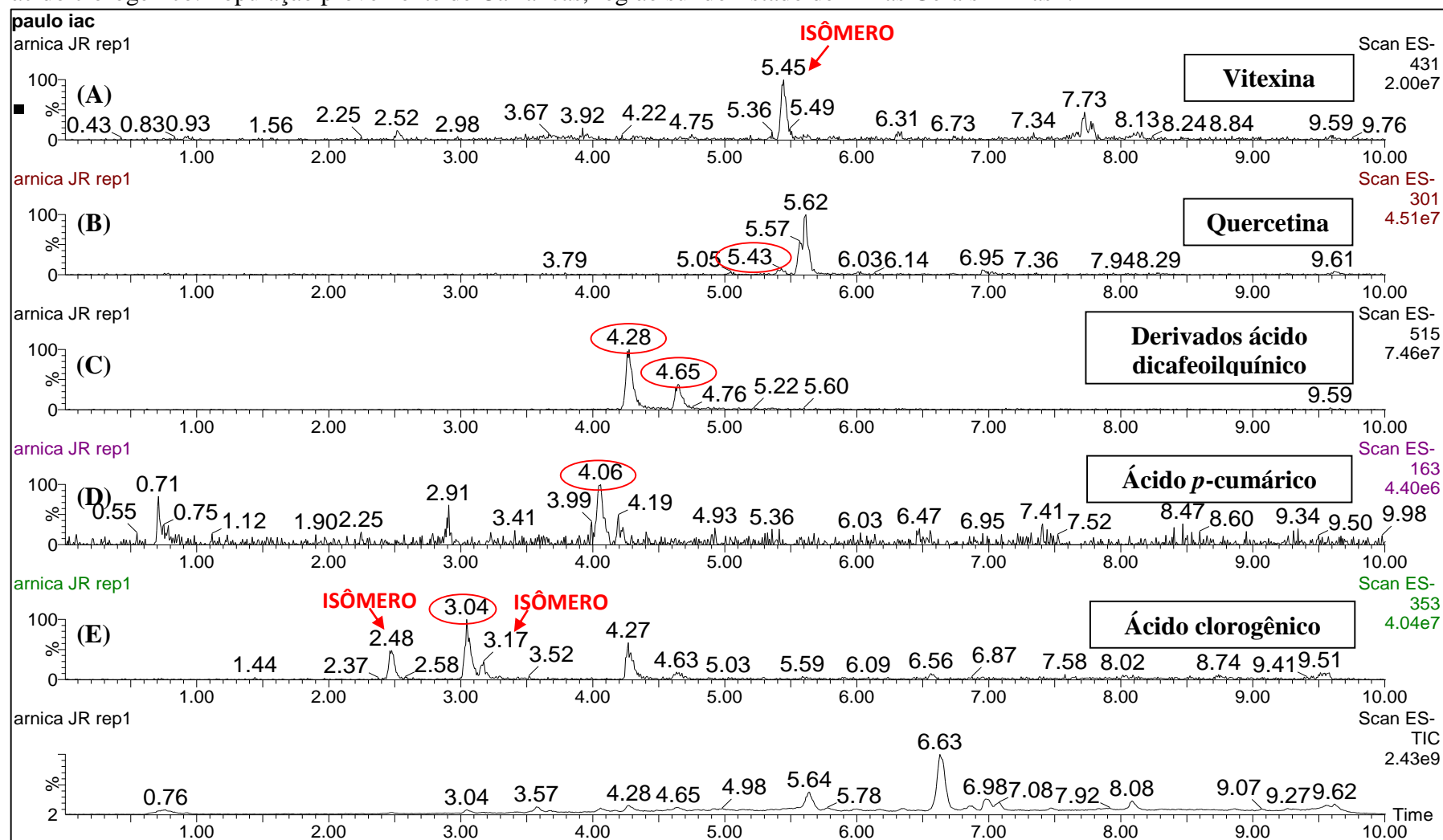


Figura 15. Cromatogramas UHPLC-MS em modo negativo do extrato etanólico da população OB, selecionando os íons (A) de m/z 431 – vitexina, (B) de m/z 301 – quercetina, (C) de m/z 515 – derivados do ácido dicafeoilquínico, (D) de m/z 163 – ácido *p*-cumárico, (E) de m/z 353 – ácido clorogênico. População entre Moeda e Itabirito, no sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.

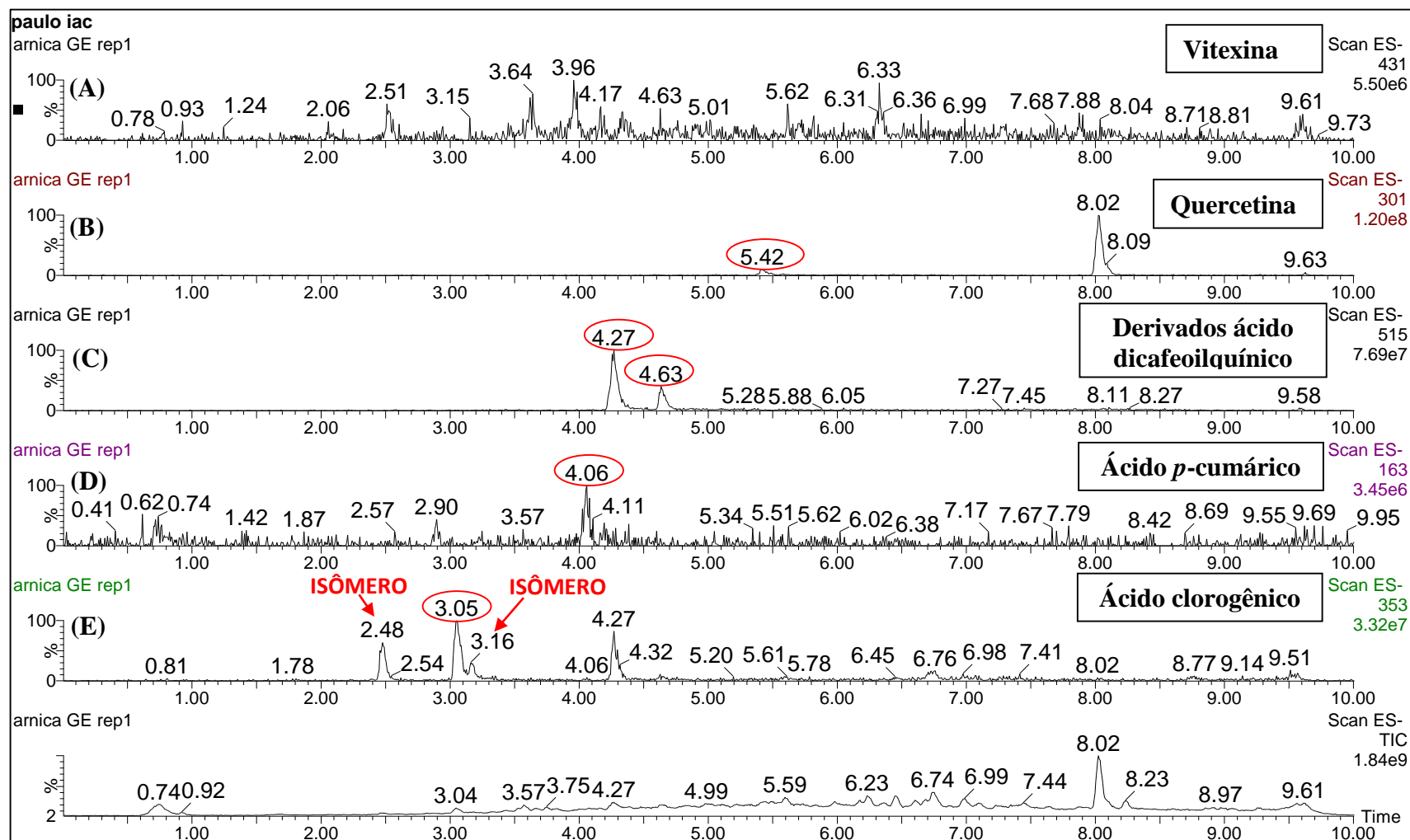
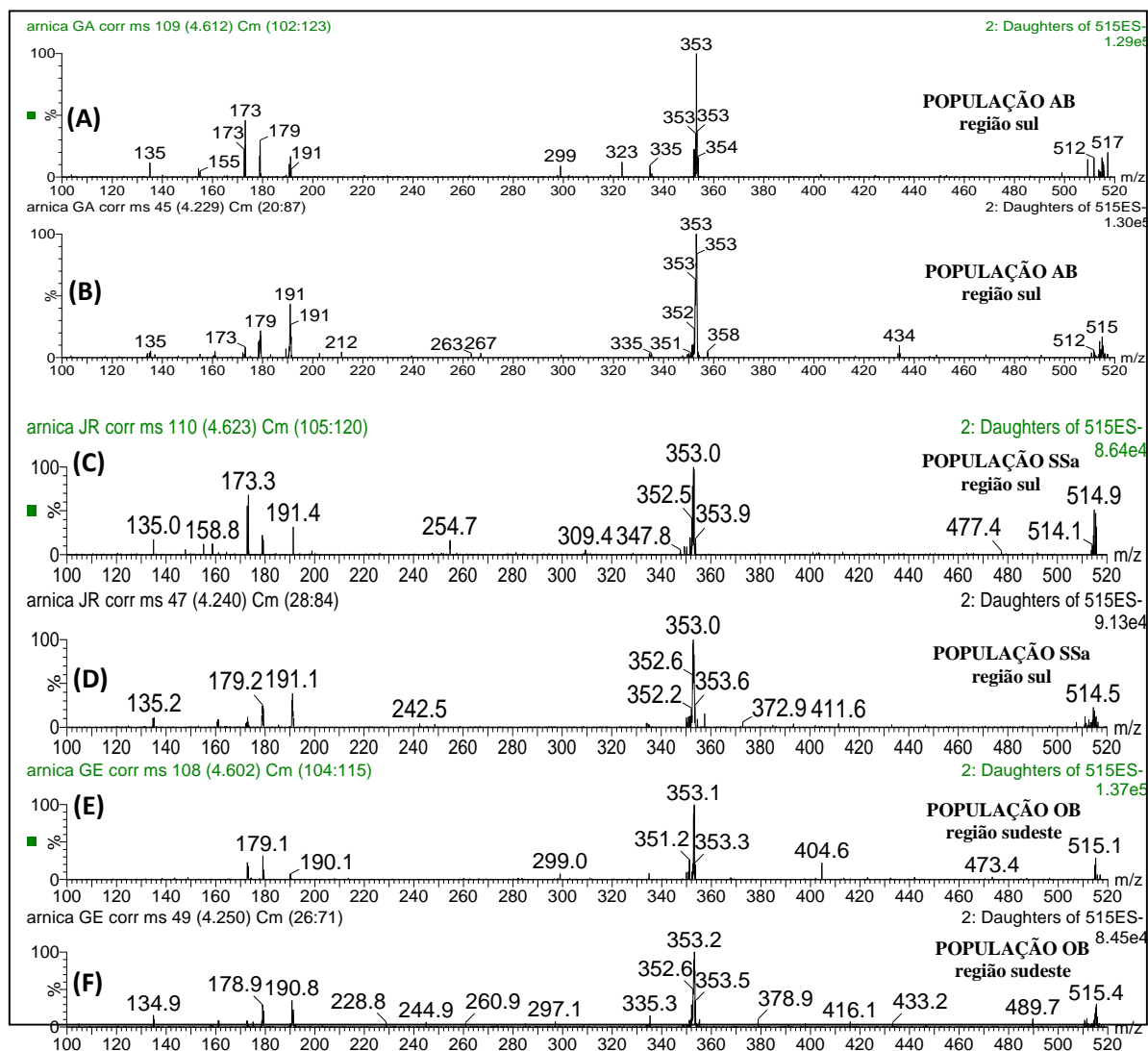


Figura 16. Espectros de massas ESI-MS/MS em modo negativo dos íons de m/z 515 – derivados do ácido dicafeoilquinico - encontrados nos extratos etanólicos das partes aéreas das populações de *Lychnophora pinaster* AB (A-B), SSa (C-D) e OB (E-F). AB e SSa são provenientes da região sul e OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.

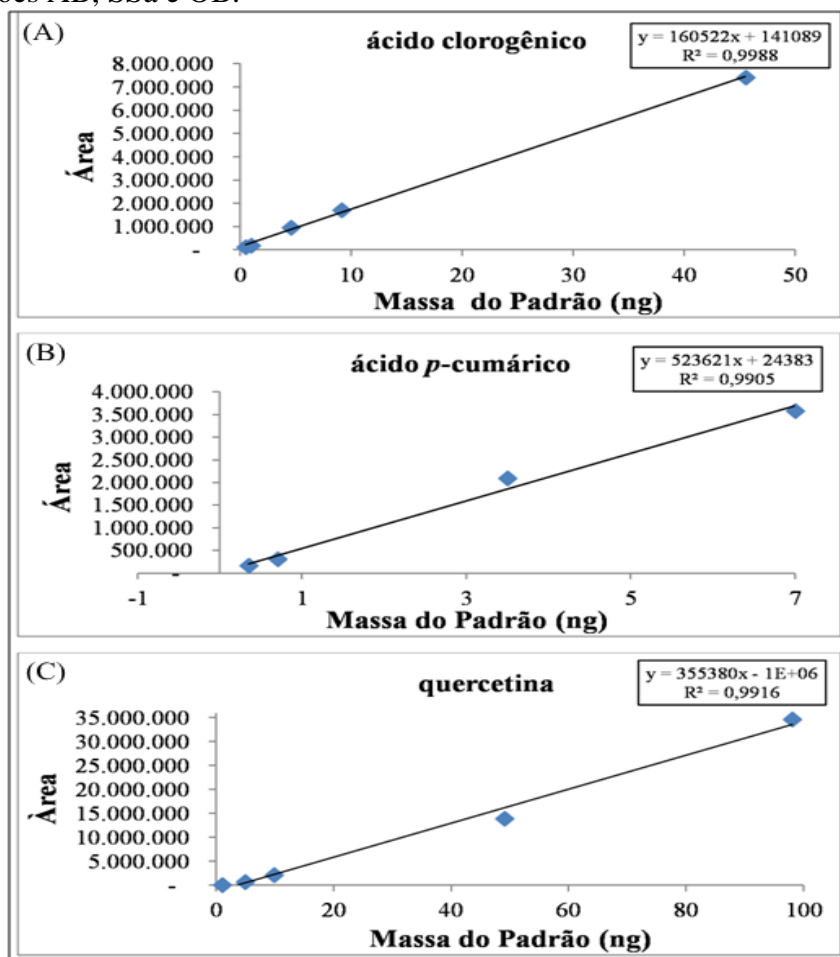


Noves dos íons detectados em modo negativo nas amostras de extratos etanólicos das populações de *L. pinaster* foram observados em *fingerprints* ESI(-) de extratos hidroalcoólicos de *Lychnophora* sp. (MORAES *et al.*, 2009), tendo as seguintes estruturas atribuídas: m/z 255 - pinocembrina (*L. pohlii*), m/z 207 - não identificado (*L. candelabrum*), m/z 315 - 3-metil-quercetina (*L. candelabrum*, *L. pohlii*, *L. peusovilosissima* e *L. visolissima*), m/z 353 – derivados do ácido cafeoilquinico (*L. candelabrum*, *L. pohlii*, *L. peusovilosissima* e *L. visolissima*), m/z 463 - quercetina 3-glucosídeo (*L. candelabrum*, *L. pohlii* e *L. visolissima*), m/z 515 – derivados do ácido dicafeoilquinico (*L. candelabrum*, *L. pohlii*; *L. peusovilosissima* e *L. visolissima*), m/z 529 - ácido cafeoilferuloilquinico (*L.*

candelabrum, *L.pohlii*, *L.peusovilosissima* e *L. visolissima*), m/z 593 - vicenina-2 (*L. candelabrum*, *L. pohlii*, *L. peusovilosissima* e *L.visolissim*), m/z 609 - não identificado (*L. pseudovilosissima*).

Adicionalmente, as massas da quercetina, do ácido *p*-cumárico e do ácido clorogênico nos extratos foram determinadas utilizando os valores de *b* e *a* das equações das retas geradas pelas curvas de calibração (GRÁFICO 21A, B e C). As curvas de linearidade de todos os analitos apresentaram coeficiente de correlação (r) > 0.9900.

Gráfico 21. Curva de calibração obtida pelo método do padrão externo com diferentes concentrações (ng) dos padrões comerciais de ácido clorogênico (A), ácido *p*-cumárico (B) e quercetina (C) para a determinação das concentrações dos analitos por grama de extrato das populações AB, SSa e OB.



A quantidade de quercetina, ácido *p*-cumárico e do ácido clorogênico foi expressa por grama de extrato etanólico para cada população, enquanto a quantidade de friedelina foi expressa em proporção relativa nos extratos, conforme apresentado na Tabela 17.

Tabela 17. Massa de ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico e de quercetina por grama de extrato etanólico e proporção relativa (%) de friedelina nos extratos etanólicos das populações (Pop) de *Lychnophora pinaster* (SSa, AB e OB).

Pop	-----Massa-----			----(%)----
	ácido clorogênico ^a	ácido <i>p</i> -cumárico ^a	quercetina ^a	friedelina ^b
SSa	2.06 mg	60.0 µg	0.45 mg	19.6
AB	2.42 mg	51.4 µg	0.59 mg	24.0
OB	1.95 mg	34.4 ng	0.75 mg	16.4

^aAnálise e identificação por UHPLC-ESI-MS/MS; ^bAnálise e identificação por GC-MS.
AB e SSa: região sul e OB: região sudeste, Minas Gerais - Brasil

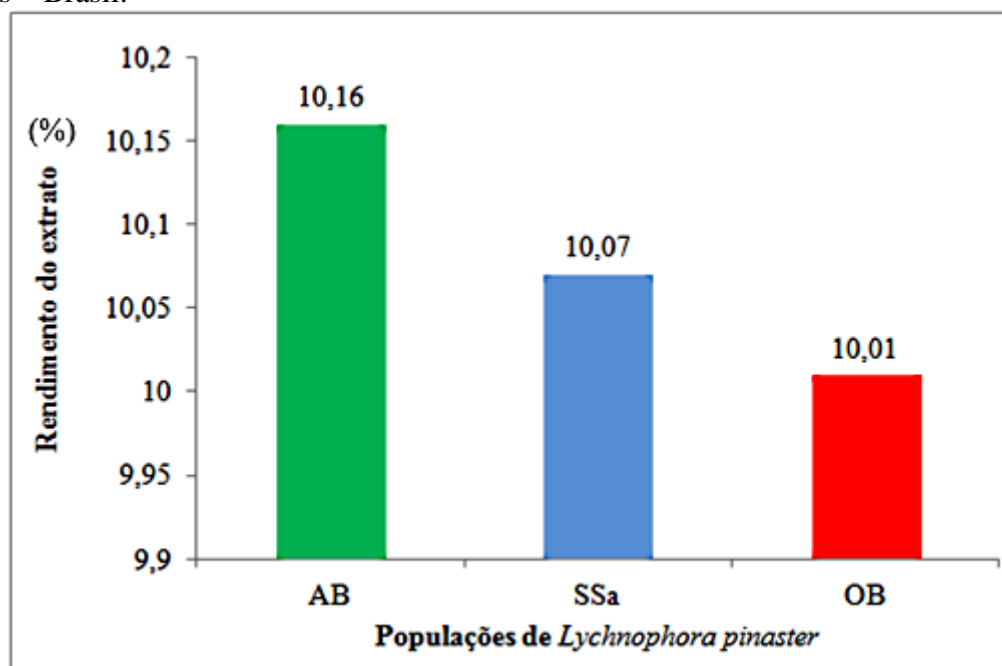
Os extratos das três populações apresentaram quantidade similar de ácido clorogênico, com destaque para AB (2.42 mg). O extrato de SSa apresentou maior quantidade de ácido *p*-cumárico por grama de extrato (60 µg) e o extrato de AB maior proporção relativa de friedelina nos extratos (24.0%). Comparada às populações do sul a população OB (sudeste) apresentou maior quantidade de quercetina por grama de extrato (0.75 mg) (TABELA 17).

Embora a prioridade inicial fosse a de monitorar os íons dos princípios ativos descritos na literatura para a espécie (TABELA 1), outras substâncias polares e que contém funções ácidas, como fenóis e ácidos carboxílicos, mais facilmente desprotonadas e, conseqüentemente, analisadas no modo negativo (COLE, 1997; VESTAL, 2001) podem estar presentes nos extratos.

5.7. Rendimento dos Óleos Essenciais e Extratos

Foram obtidas grande quantidade de extratos de todas as populações estudadas. O rendimento entre populações foi muito similar (GRÁFICO 22).

Gráfico 22. Rendimento (%) dos extratos etanólicos das populações de *Lychnophora pinaster* AB e SSa, provenientes da região sul, e OB, da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil.



Quanto ao rendimento de óleo essencial, dentro das populações, foram registradas variações do rendimento entre acessos, evidenciando comportamento fenotípico diferencial (GRÁFICO 23A).

Embora baixa, maior variabilidade fenotípica de rendimento intrapopulacional foi constatada em SSa ($\sigma^2= 0.09$), seguido de AB ($\sigma^2=0.05$) e OB ($\sigma^2= 0.0004$).

Diferenças significativas quanto ao rendimento médio de óleo essencial foram constatadas entre populações (GRÁFICO 23B), tendo SSa e AB maior rendimento médio de óleo essencial (0.57% e 0.41%, respectivamente) e OB o menor (0.03%).

Comparando os padrões do Gráfico 6A, de altitude, com o de rendimento médio de óleo essencial, Gráfico 23B, é possível constatar que não existe uma relação de quanto maior a altitude maior o rendimento ou vice-versa.

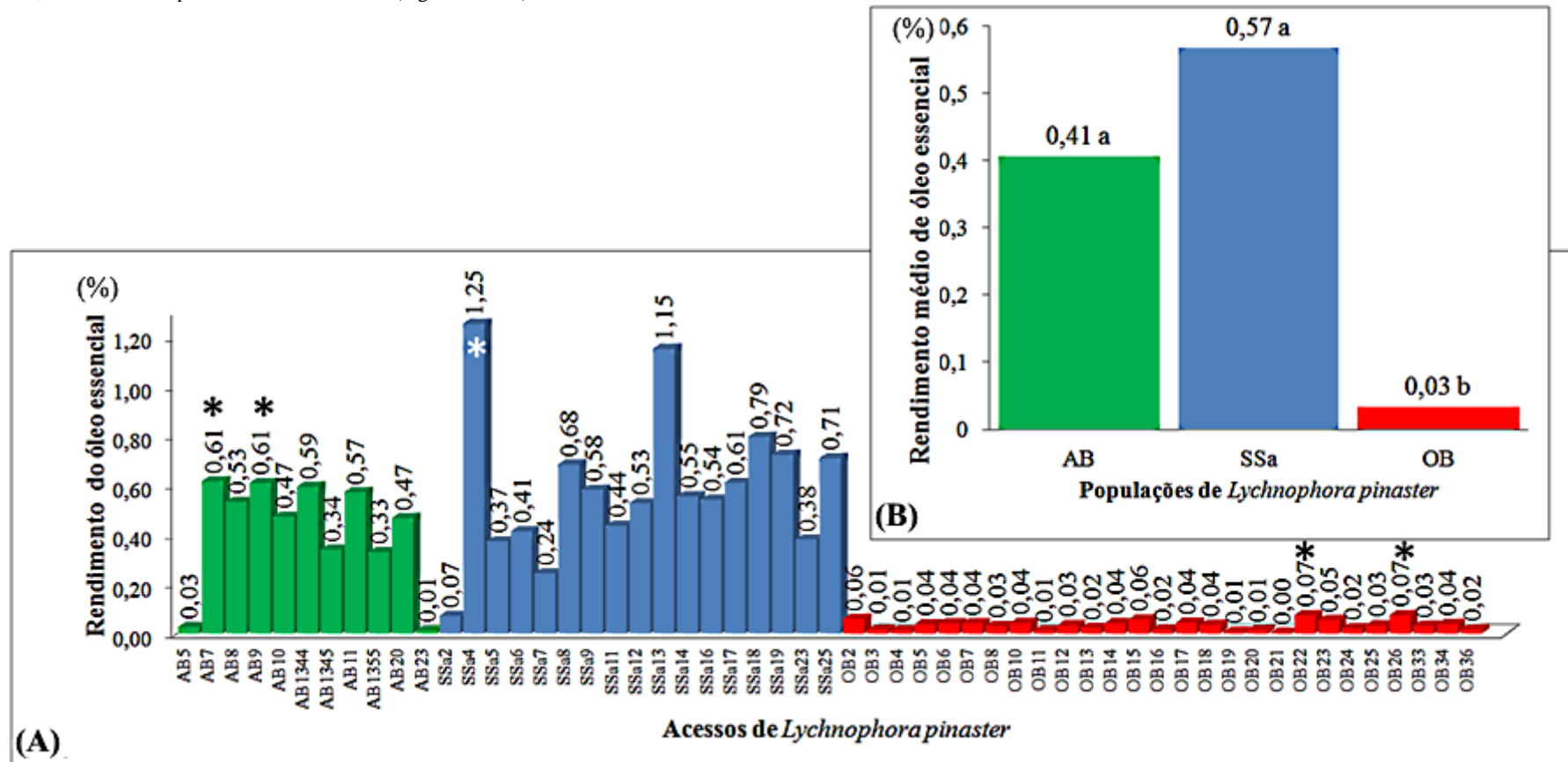
Como o teste de Mantel revelou fraca correlação entre as matrizes de altitude e de rendimento de óleo essencial ($r= 0.28$; $p= 0.0005$; 999 permutações) e nenhuma correlação entre as matrizes de distância dos dados obtidos para os nutrientes dos solos com o rendimento ($r= 0.1049$; $p= 0.2349$; 999 permutações), um indicativo é o de que

outros fatores possam ter contribuído para a maior produção de óleo essencial pelos indivíduos provenientes das populações AB e SSa (sul).

Uma proposição é a de que a precipitação seja um dos fatores que influenciaram no rendimento de óleo essencial, uma vez que na região de AB/SSa o volume de chuvas foi maior (229 mm) do que na região de OB (sudeste) (59 mm) (GRÁFICO 5B). Associados à precipitação, as condições de temperatura e radiação dos seus locais de origem (dados não mensurados) podem ter favorecido o acúmulo de óleo essencial, merecendo estudos complementares.

Incremento no rendimento de óleo essencial de *Aloysia triphylla* Royle (Verbenaceae) e de *Mentha* L. (Lamiaceae) em função de maior precipitação e de condições ideais de radiação e de temperatura foi observado (DESCHAMPS *et al.*, 2008; PAULUS *et al.*, 2013).

Gráfico 23. Rendimento (%) dos óleos essenciais dos 55 indivíduos de *Lychnophora pinaster* estudados (A) e rendimento médio dos óleos essenciais das populações (B) AB e SSa, proveniente da região sul, e OB, proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil (B). Acessos AB_5 até AB_23: provenientes pop AB, de Carrancas (região sul); SSa_2 até SSa_25 provenientes pop SSa, de Carrancas (região sul); OB_2 até OB_36 provenientes da pop OB, entre os municípios de Moeda e Itabirito (região sudeste).



Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade; Teste de Fisher < 0.0001. R² (coeficiente de determinação)= 0.64, ou seja, 62% da variabilidade está sendo explicada pela variável exploratória. Desvio padrão= 0.31. Acessos com maior rendimento de óleo essencial estão marcados com asterisco ().

5.8. Estudo *in vitro* da Atividade Tripanocida e de Citotoxicidade dos Extratos Etanólicos e dos Óleos Essenciais

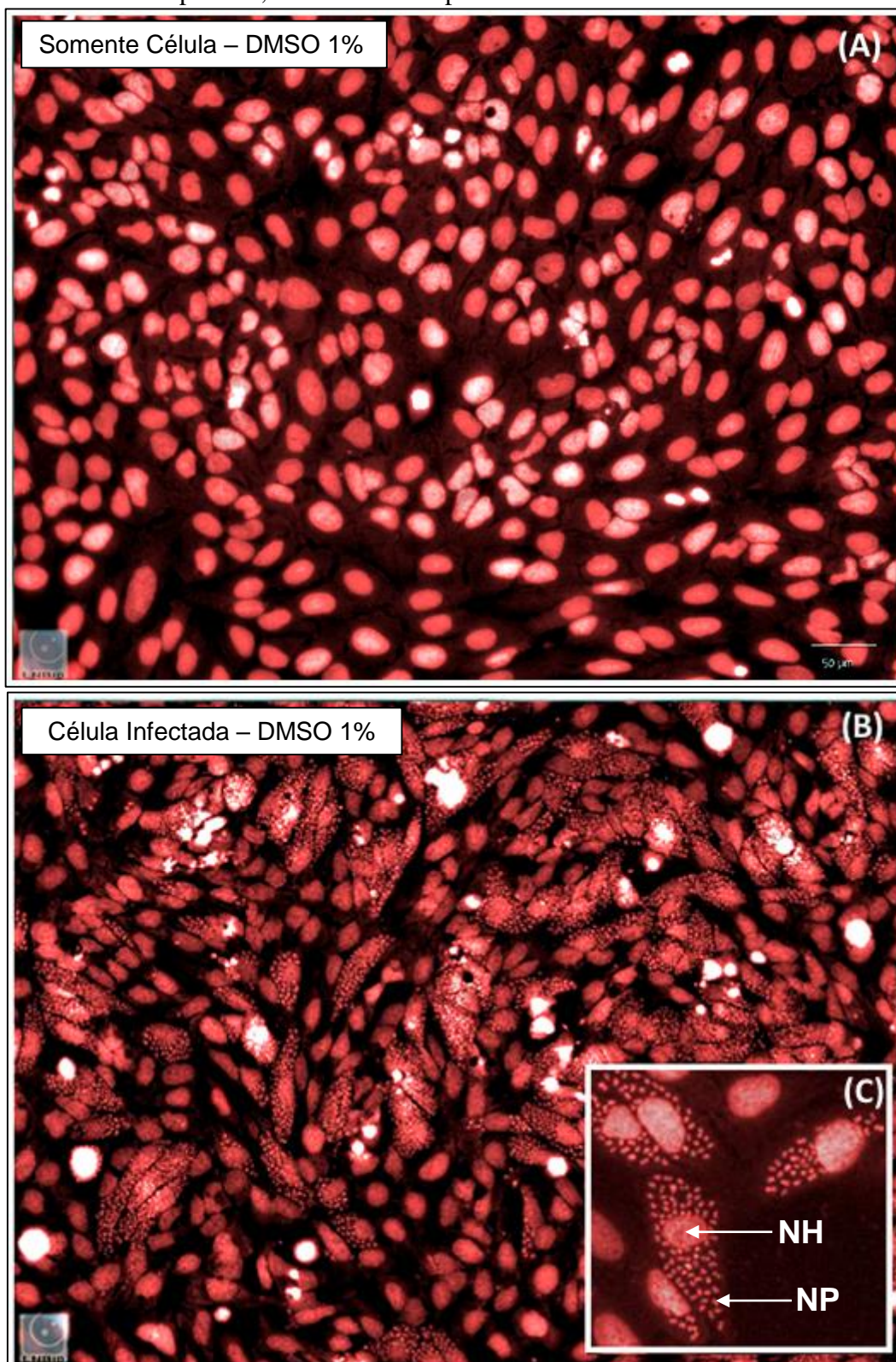
Os dados apresentados são referentes a ensaios realizados utilizando a forma amastigota de *T. cruzi* (cepa Y - TcII), que são estágios evolutivos arredondados, com inconspícuos flagelos e que se multiplicam dentro das células hospedeiras, sendo responsáveis, portanto, pela amplificação parasitológica da doença de Chagas (CARVALHO E SOUZA, 1986; BRENER, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Células hospedeiras U2OS foram infectadas por tripomastigotas 24h antes da adição do composto de referência benznidazol -droga comercial utilizada para tratar infecções devidas ao *T. cruzi*-, dos óleos essenciais e dos extratos. A linhagem de células U2OS, derivada de osteosarcoma humano, cresce em monocamada e apresenta citoplasma grande; o que permite boa quantificação dos amastigotas em experimentos de Análises de Alto Conteúdo (GENOVESIO *et al.*, 2011).

Na Análise de Alto Conteúdo, cada parasita intracelular foi detectado e quantificado (número de *spots*). As células hospedeiras que continham pelo menos um *spot* dentro do citoplasma foram consideradas infectadas. Na Figura 17 é possível comparar visualmente resultados obtidos através do Operetta para detecção das formas amastigotas em células hospedeiras infectadas (controle negativo= células hospedeiras + *T. cruzi* + DMSO 1%) com relação a células não infectadas (controle positivo= células hospedeiras + DMSO 1%).

Após 24 h de infecção, células hospedeiras U2OS foram expostas às amostras (benznidazol, óleos essenciais e extratos etanólicos) por 4 dias, sendo submetidas a 14 pontos de diluições seriados. Após este período, as imagens das placas foram analisadas e a atividade normalizada dos compostos foi plotada como curvas-dose resposta (GRÁFICOS 24 e 25). O valor médio do fator Z' , medida estatística utilizada para mensurar a qualidade e performance de ensaios de Análise de Alto Conteúdo, foi de 0.63, indicando um ensaio de qualidade satisfatória (ZHANG *et al.*, 1999).

Figura 17. (A) Células U2OS não infectadas: controle positivo para atividade; (B) células U2OS infectadas: controle negativo para atividade tripanocida; (C) seção expandida para mostrar a eficiência na detecção dos núcleos do parasita dentro da célula hospedeira. NH= núcleo da célula hospedeira; NP= núcleo do parasita.



No Apêndice 12 é possível constatar a eficiência *in vitro* do composto referência benznidazol em 400 e 100 μM , onde, praticamente, não foram encontradas células U2OS infectadas por amastigotas. Isto reflete na sua curva dose-resposta (GRÁFICOS 24A e 25A), que apresentou aumento da atividade antiparasitária normalizada (*Normalized Activity*) conforme aumento das concentrações, sem diminuição da taxa de células hospedeiras (*Cell Ratio*). O Índice de Seletividade (IS) obtido para o benznidazol foi > 11.8 , indicando uma ação suficientemente seletiva (TABELA 18). Em contrapartida, baixos valores de IS foram obtidos tanto para os óleos essenciais (SSa: 1.43; OB: 1.77) quanto para extratos etanólicos (AB: 0.40; SSa: 0.28; OB: 0.39) (TABELA 18).

Em 100 $\mu\text{g/mL}$, por exemplo, todos os óleos essenciais e extratos foram extremamente citotóxicos para as células hospedeiras U2OS infectadas, eliminando-as em praticamente 100% (APÊNDICES 13 a 18). Diminuição acentuada da taxa de células hospedeiras foi verificada a partir da concentração de 12.5 $\mu\text{g/mL}$, com destaque para a maior citotoxicidade dos extratos, como pode ser constatado nas curvas de dose-resposta (GRÁFICOS 24 e 25) e comparando os testes com os óleos essenciais (APÊNDICES 13, 14 e 15) com os testes com extratos (APÊNDICES 16, 17 e 18). Isto é reforçado pelos baixos valores de CC_{50} obtidos para os extratos (min.: 4.62 $\mu\text{g/mL}$, população OB; máx.: 13.03 $\mu\text{g/mL}$; população SSa) em relação aos obtidos para os óleos essenciais (min.: 41.05 $\mu\text{g/mL}$, população OB; máx.: 85.27 $\mu\text{g/mL}$; população SSa) (TABELA 18).

Como houve mortalidade das células U2OS causada pela alta concentração dos óleos essenciais e extratos, houve redução no número de células infectadas e, conseqüentemente, da atividade normalizada antiparasitária (GRÁFICOS 24 e 25). Portanto, isto não indica atividade tripanocida das amostras. Através do ensaio com células hospedeiras LLC-MK2 (células de *Macaca mulatta*, rhesus) não infectadas, onde foi excluído o efeito citolítico do parasita, também foi verificada maior citotoxicidade conforme aumento das concentrações de óleos essenciais e, principalmente, de extratos (GRÁFICO 26A-G); reforçando os resultados obtidos anteriormente.

Foi possível constatar que as amostras de óleos essenciais e extratos de *L. pinaster* não apresentaram seletividade e atividade antiparasitária, *in vitro*, com relação às formas amastigotas de *T. cruzi* equivalente ou superior ao composto de referência benznidazol, utilizado comercialmente para tratar a doença de Chagas.

Gráfico 24. Curvas de dose-resposta para o composto de referência, benznidazol (A), e os óleos essenciais das populações de *Lychnophora pinaster* AB (B), OB (C) e SSa (D) testados em células U2OS infectadas. Populações AB e SSa, provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais, e a população OB, proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais- Brasil. Da esquerda para a direita, o eixo X contém o Log da concentração crescente de óleo essencial ou do composto referência e os 15 pontos de cada gráfico representam as diluições utilizadas para as amostras (100, 50, 25, 12.5, 6.6, 3.5, 1.7, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 e 0.005 $\mu\text{g/mL}$) e para o composto referência (400, 100, 50, 25, 12.5, 6.6, 3.5, 1.7, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 μM). Normalized Activity: Atividade antiparasitária normalizada; Cell Ratio: Taxa de células hospedeiras.

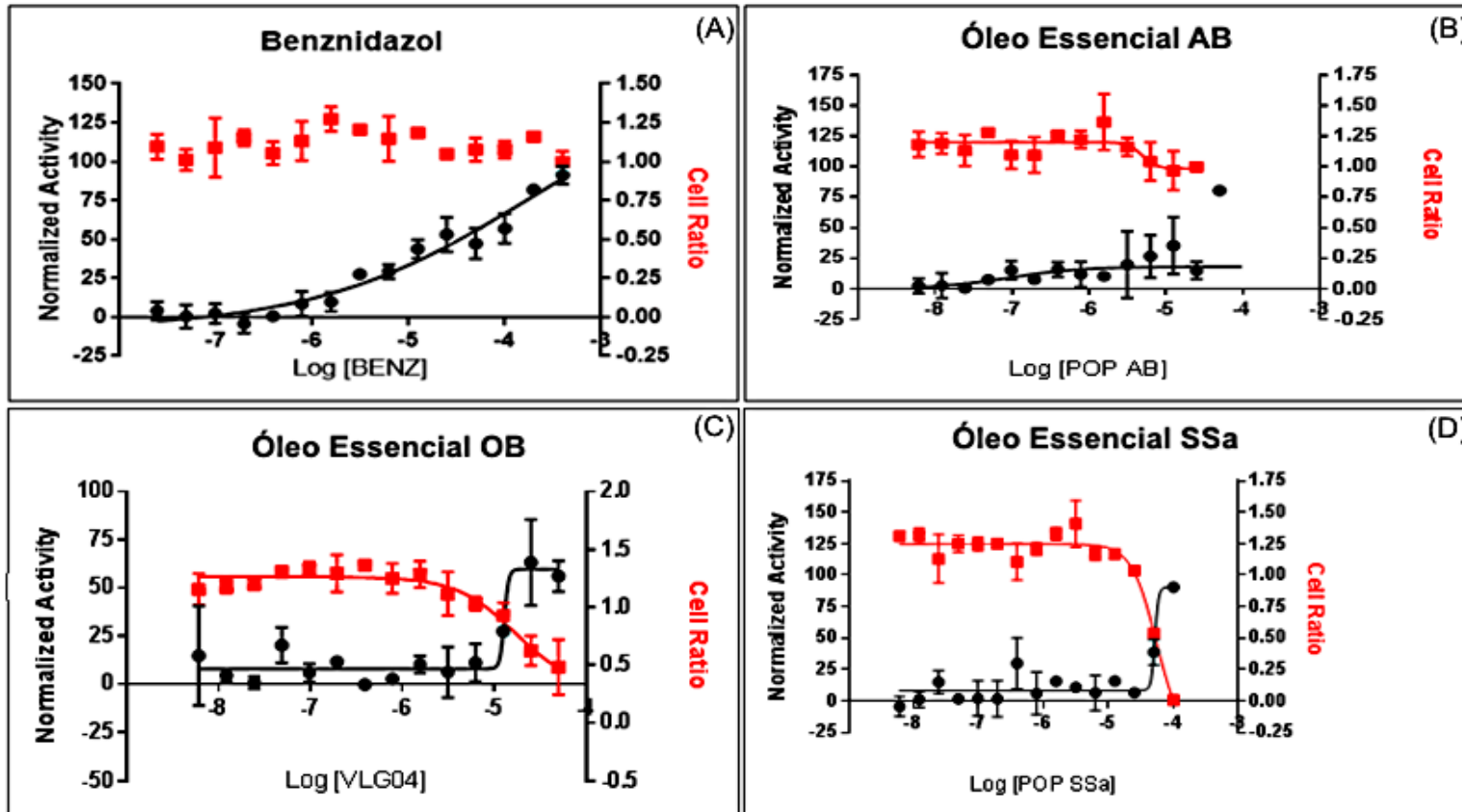


Gráfico 25. Curvas de dose-resposta para o composto de referência, benznidazol, e os extratos das populações de *Lychnophora pinaster* SSa (B), OB (C) e AB (D) testados em células U2OS infectadas. Populações AB e SSa, provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais, e a população OB, proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais- Brasil. Da esquerda para a direita, o eixo X contém o Log da concentração crescente de óleo essencial ou do composto referência e os 15 pontos de cada gráfico representam as diluições utilizadas para as amostras (100, 50, 25, 12.5, 6.6, 3.5, 1.7, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 e 0.005 $\mu\text{g/mL}$) e para o composto referência (400, 100, 50, 25, 12.5, 6.6, 3.5, 1.7, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 μM). Normalized Activity: Atividade antiparasitária normalizada; Cell Ratio: Taxa de células hospedeiras.

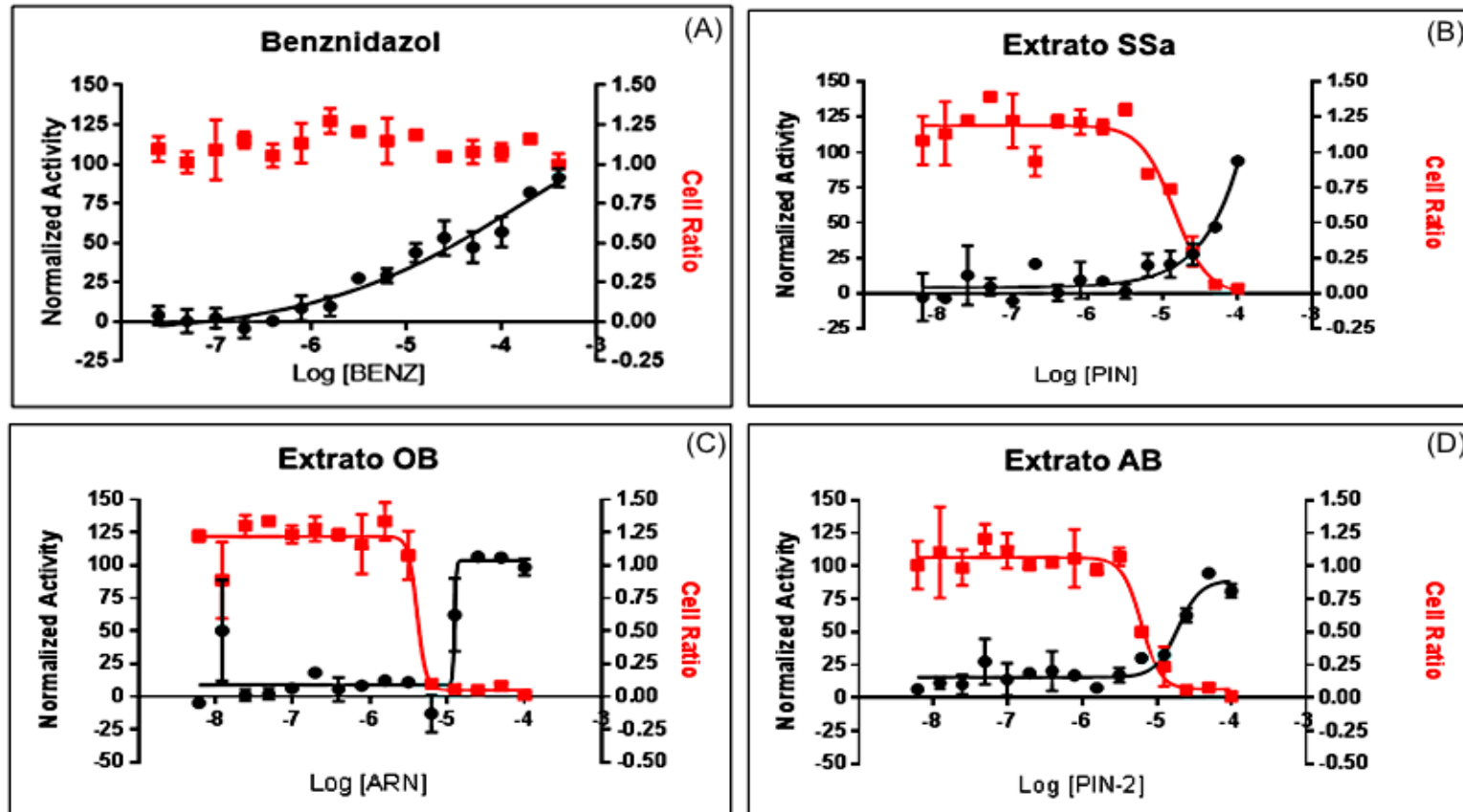


Tabela 18. Valores de EC₅₀, CC₅₀ e Índice de Seletividade (IS) para o composto referência (benznidazol), os óleos essenciais e os extratos das populações de *Lychnophora pinaster* contra amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y. Populações AB e SSa, provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais, e a população OB, proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.

Composto	Valores de EC ₅₀ / <i>Trypanosoma cruzi</i> (μM ou $\mu\text{g/mL}$)		CC ₅₀ values/células hospedeiras (μM ou $\mu\text{g/mL}$)		IS
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
Benznidazol	36.10	15.46	-	-	> 11.8
Óleo Essencial AB	ND	-	ND	-	ND
Óleo Essencial SSa	59.50	13.30	85.27	46.76	1.43
Óleo Essencial OB	23.16	13.57	41.05	11.19	1.77
Extrato AB	19.33	2.48	7.68	0.68	0.40
Extrato SSa	46.98	1.54	13.03	2.64	0.28
Extrato OB	11.84	0.54	4.62	1.25	0.39

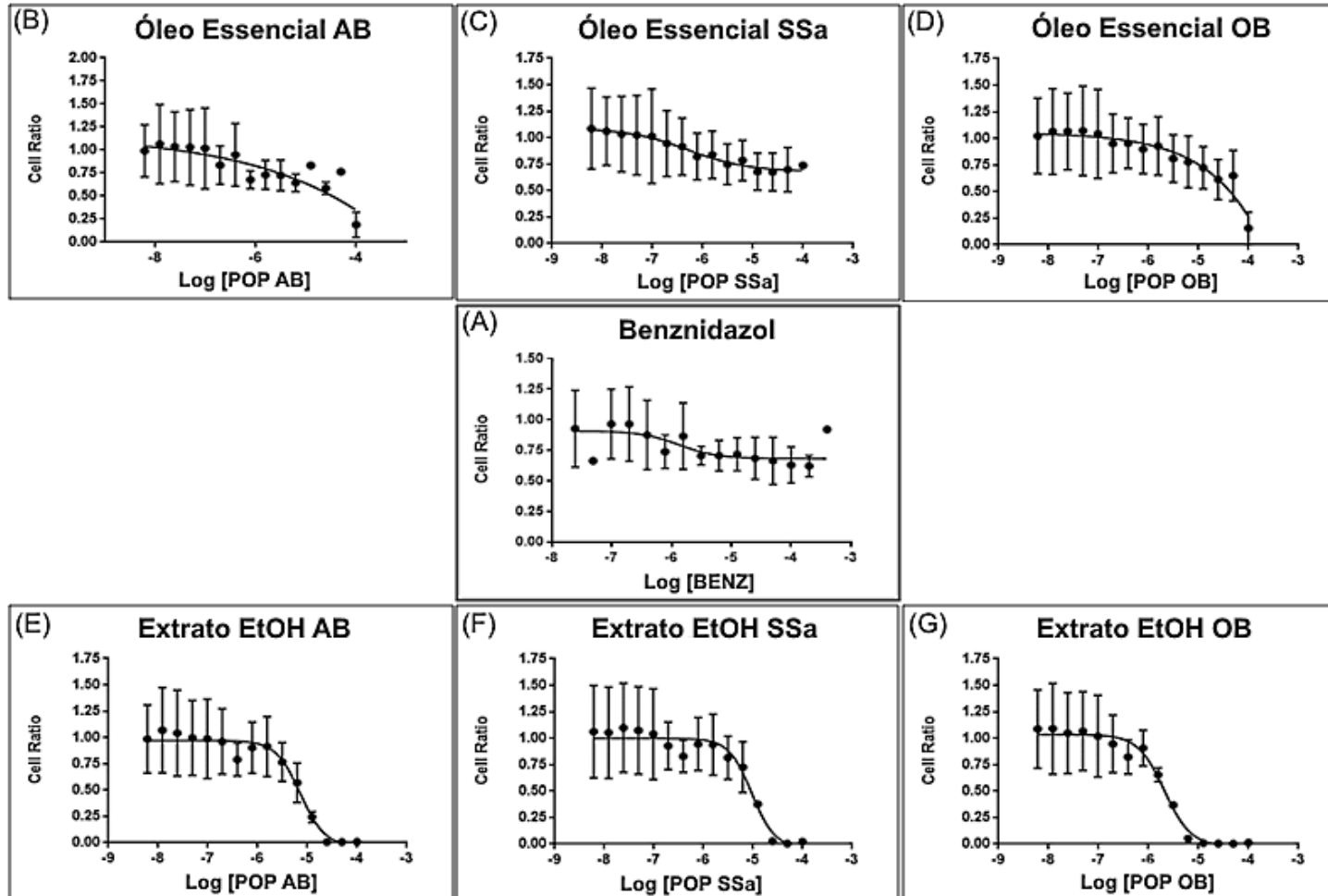
EC₅₀: concentração de composto correspondente à 50% da atividade normalizada após 96 h de incubação;

CC₅₀: concentração de composto correspondente à redução de 50% das células hospedeiras em comparação com o controle negativo;

IS ou Índice de Seletividade: razão CC₅₀/EC₅₀;

ND indica que o valor não pode ser calculado.

Gráfico 26. Curvas de dose-resposta do teste de citotoxicidade para o composto de referência benznidazol (A), os óleos essenciais (B, C, D) e extratos etanólicos (E, F, G) das populações de *Lychnophora pinaster* AB, SSa e OB em células LLC-MK2 não infectadas. Populações AB e SSa, provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais, e a população OB, proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais. *Da esquerda para a direita, o eixo X contém o Log da concentração crescente de extrato e os 15 pontos de cada gráfico representam as diluições utilizadas (100, 50, 25, 12.5, 6.6, 3.5, 1.7, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 e 0.005 $\mu\text{g/mL}$); Cell Ratio: Taxa de células hospedeiras.



5.9. Considerações Finais

Baseado nos estudos prévios realizados por Haber (2008), com populações cultivadas em Botucatu e os obtidos no presente estudo, recomenda-se cautela no estabelecimento de bancos *ex situ* de germoplasma para a obtenção de óleos essenciais de *L. pinaster* com base em marcadores neutros (microsatélites), pois os preditores ambientais tendem a ser os principais fatores que determinam o seu polimorfismo químico e não a deriva genética.

Outros fatores que podem eventualmente ter afetado a produção *in situ* dos metabólitos é a intensidade, qualidade e duração do fator luz nos diferentes ambientes. O aporte de carbono bem como a eficiência de assimilação pode alterar o uso e a demanda do carbono do metabolismo especializado; merecendo também ser investigado.

Estudos com marcadores encontrados em regiões codificadoras ou com função regulatória são sugeridos, como a utilização de marcadores genômicos (SNPs) para ensaios de polimorfismos associados a características de produção dos princípios ativos.

Polimorfismos químicos do óleo essencial e extrato de *L. pinaster* devem existir em outras localidades do Cerrado do Estado de Minas Gerais, merecendo ser investigados. Os fenótipos provenientes da região sul devem ser considerados quanto à elaboração de qualquer estratégia futura visando identificação de fontes naturais de princípios ativos, como os agentes anti-inflamatórios *E*-cariofileno e α -humuleno (ACHÉ, 2013; HAN *et al.*; 2014); α -pineno e β -pineno, potencialmente utilizáveis em terapia antimicrobiana e gastroprotetiva (LEITE *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2015); ou do aromatizante natural cinamato de metila, como alternativa ao obtido sinteticamente e utilizado na indústria de cosméticos, perfumes, produtos de limpeza e higiene (SHARMA e KANWARE, 2012).

6. CONCLUSÕES

Por meio dos estudos realizados, conclui-se que:

- (i) Existem diferentes níveis de diversidade genética dentro das populações e alto nível de diferenciação genética entre populações em *Lychnophora pinaster*. Os esforços de conservação *in situ* devem focar na preservação dos *habitats* de *L. pinaster* da destruição e no aumento dos tamanhos populacionais, uma vez que o pequeno tamanho populacional e a fragmentação fazem de *L. pinaster* uma espécie que está susceptível às perdas de diversidade genética causada pelos efeitos da endogamia e da deriva genética. É sugerido um planejamento de coleta de sementes provenientes dos grupos genéticos evidenciados pelo STRUCTURE ou DAPC, podendo este ser um ponto de partida para a conservação *ex situ* do germoplasma da espécie. Além da relevância de se considerar as estratégias sugeridas para a conservação de *L. pinaster*, é estritamente necessário o monitoramento das populações remanescentes para que, de fato, seja evitada a extinção da espécie.
- (ii) O *E*-cinamato de metila, *E*-cariofileno e α -humuleno foram os constituintes mais abundantes nos óleos essenciais dos fenótipos das populações provenientes da região sul, enquanto os da região sudeste foram caracterizados exclusivamente

por sesquiterpenos, com ausência de fenilpropanóides. As populações apresentam-se como fonte natural em potencial de compostos para a fabricação de produtos alimentícios, farmacêuticos, perfumes, cosméticos, de higiene e limpeza;

- (iii) Mesmo padrão espacial de composição química foi observado para os extratos, onde as populações do sul apresentaram mesmo perfil químico sob o ponto de vista qualitativo, diferindo da população proveniente do sudeste. Dos princípios ativos registrados na literatura para a espécie, somente dois, quercetina e friedelina, foram identificados nos extratos etanólicos das populações estudadas;
- (iv) Mesmo após 96 horas de exposição do parasita *T. cruzi* aos óleos essenciais e extratos etanólicos das três populações naturais de *L. pinaster*, os mesmos não apresentam seletividade e atividade antiparasitária *in vitro* equivalente ou superior ao composto de referência benznidazol, para as formas amastigotas intracelulares. Portanto, nas condições de estudo, as amostras testadas não foram capazes de eliminar eficientemente a infecção;
- (v) Com o aumento das concentrações dos óleos essenciais e extratos etanólicos, houve aumento da citotoxicidade e, conseqüentemente, diminuição da taxa de células hospedeiras (infectadas ou não infectadas). Os extratos etanólicos se mostraram mais citotóxicos que aos óleos essenciais;
- (vi) Comparados à genética, os preditores ambientais se mostraram os elementos mais relevantes para a variação química do óleo essencial entre populações da espécie. Isto indica que possivelmente o polimorfismo químico do óleo essencial esteja ocorrendo mais como um reflexo de uma seleção natural de acordo com os fatores ambientais locais em cada população e não devido à deriva genética. Isto é um alerta quanto a utilização de diferentes populações de *L. pinaster* como fitoterápico de modo indiscriminado, uma vez que as diferenças na composição química podem comprometer a sua eficácia terapêutica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVEZ, R.J.V.; KOLBEK, J. Plant species endemism in savanna vegetation on table mountains (campo-rupestre) in Brazil. **Vegetatio**, v. 113, p. 125-139, 1994.

ABREU, V. G. C.; CORREA, G. M.; SILVA, T. M.; FONTOURA, H. S.; CARA, D. C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALCÂNTARA, A. F. C. Anti-inflammatory effects in muscle injury by transdermal application of gel with *Lychnophora pinaster* aerial parts using phonophoresis in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 270, p. 2-8, 2013.

ABREU, V. G. C.; TAKAHASHI, J. A.; DUARTE, L. P.; PILÓ-VELOSO, D.; JÚNIOR, P. A. S.; ALVES, R. O.; ROMANHA, A. J.; ALCÂNTARA, A. F. C. Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 615-621, 2011.

ACHÉ Laboratórios Farmacêuticos S.A. Acheflan: *Cordia Verbanacea* D.C. Disponível em: <<http://www.onofre.com.br/backoffice/uploads/Bula/228362.pdf>> Acesso em: 06 março 2013.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 2007. 468 p.

ADDINSOFT. **XLSTAT 2015: Data Analysis and Statistical Solution for Microsoft Excel**. Paris, France, 2015.

ALBERTO, F.; GOUVEIA, L.; ARNAUD-HAOND, S.; PÉREZ-LLORÉNS, J. L.; DUARTE, C. M.; SERRÃO, E. A. Within-population spatial genetic structure, neighbourhood size and clonal subrange in the seagrass *Cymodocea nodosa*. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2669–2681, 2005.

ALCÂNTARA, A. F. C.; SILVEIRA, D.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B.; GUIMARÃES, J. E.; RASLAN, D. S. Comparative analysis of the trypanocidal activity and chemical properties of *E*-lychnophoric acid and its derivatives using theoretical calculations. **Eclética Química**, v. 30, n. 3, p. 37-45, 2005.

ALEMANY, J-U.; PALÁ-PAÚL, J.; PENALVER, D. H. Comprehensive phenological description of essential-oil chemotypes of *Salvia lavandulifolia* Vahl grown under the same environmental conditions. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, n 12, p. 1963–1977, 2014.

ALI, N. A. M.; RAHMANI, M.; SHAARI, K.; ALI, A. M.; CHENG LIAN, G. E. Antimicrobial activity of *Cinnamomum impressicostatum* and *C. pubescens* and bioassay-guided isolation of bioactive (*E*)-methyl cinnamate. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 2, p. 101-106, 2010.

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. H. **Conservation and the genetics of populations**. Blackwell Publishing. 2007.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPAC/PAC, 1998. 464 p.

ALVES, R. J. V.; KOLBEK, J. Plant species endemism in savanna vegetation on table mountains (Campo Rupestre) in Brazil. **Vegetation**, v. 113, p. 125–139, 1994.

AMARAL, L. P.; TONDOLO, J. S. M.; SCHINDLER, B.; SILVA, D. T.; PINHEIRO, C. G.; LONGHI, S. J.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Seasonal influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 1, p.12-21, 2015.

AMOS, W.; HARWOOD, J. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, n. 353, p. 177-186, 1998.

ANDRADE, E. A. **Composição florística e estrutura da vegetação de campo rupestre sobre quartzito no Complexo Serra da Bocaina-MG**. 2013. 91 p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ANDREANI, S.; PAOLINI, J.; COSTA, J.; MUSELLI, A. Essential-Oil Composition and Chemical Variability of *Senecio vulgaris* L. from Corsica. **Chemistry & Biodiversity**, v. 12, n. 5, p. 752-766, 2015.

ANTIQUERA, L. M. O. R. Application of microsatellite molecular markers in studies of genetic diversity and conservation of plant species of Cerrado, **Journal of Plant Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2013.

ANTONELLI, A.; VEROLA, C. F.; PARISOD, C.; GUSTAFSSON, A. L. S. Climate cooling promoted the expansion and radiation of threatened group of South American Orchids (Epidendroideae: Laeliinae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 100, p. 597-607, 2010.

ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 63, n. 8, p.1070-1077, 2011.

BARON, D.; GRACIANO, D. S.; PORTELLA, R. O.; MANTOAN, L. P. B.; ALMEIDA, L. F. R.; BOARO, C. S. F. The ecophysiological performance of *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae) in conserved and degraded forests in the Brazilian Cerrado. **Acta Physiologiae Plantarum**, n. 37, v. 1702, p. 1-8, 2015.

BARRETT, S. C.; KOHN, J. R. **Genetic and Evolutionary Consequences of Small Population Size in Plants: Implications for Conservation**. New York: Oxford University Press, 1991.

BATALHA, M. A. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 21-24, 2011.

BEHLING, H. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 177, p. 19–27, 2002.

BEVAN, M. *et al.* Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 391, p. 485–488, 1998.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology and germination**. New York: Plenum, 1994. 444 p.

BIJLSMA, R.; BUNDGAARD, J.; BOEREM, A. C. Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: predictions from *Drosophila*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 13, p. 502-514, 2000.

BIODIVERSITAS. **Lista da flora brasileira ameaçada de extinção segundo avaliação no workshop da fundação biodiversitas em 2005**. 2005. Disponível em <http://www.biodiversitas.org.br/florabr/lista_florabr.pdf>. Acesso em: 5 ago. 2012.

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

BOHLMANN, F.; MULLER, L.; KING, R. M.; ROBINSON, H. A guaianolide and other constituents from *Lychnophora* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1149-1151, 1981.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; KING, R. M. Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2381-2385, 1980.

BONVICINO, C. R.; LINDBERGH, S. M.; FARIA, M. B.; BEZERRA, A. M. R. The Eastern Boundary of the Brazilian Cerrado: A Hotspot Region. **Zoological Studies**, v. 51, n. 7, p. 1207-1218, 2012.

BORELLA, J. C.; LOPES, J. L. C.; LEITÃO-FILHO, H. D.; SEMIR, J.; DIAZ, J. G.; HERZ, W. Eudesmanolides and 15-deoxygoyazensolide from *Lychnophora pseudovilasossima*. **Phytochemistry**, v.31, n.2, p.692-695, 1992.

BORGES-FILHO, H. C.; FELFILI, J. M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal, Brasil. **Revista Árvore**, v. 27, p. 735–745, 2003.

BORSATO, M. L. C.; GRAEL, C. F. F.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 809-813, 2000.

BOUAZIZI, H.; JOUILI, H.; GEITMANN, A.; FERJANI, E. E. Cell wall accumulation of Cu ions and modulation of lignifying enzymes in primary leaves of bean seedlings exposed to excess copper. **Biological Trace Element Research**, v. 139, p. 97–107, 2011.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, v. 1, 5ª Edição. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010. 545 p.

BRENER, Z. *Trypanossoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (Org.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486 p.

BRENES-ARGUEDAS, T.; COLEY, P. D. Phenotypic variation and spatial structure of secondary chemistry in a natural population of a tropical tree species. **Oikos**, v. 108, p. 410-420, 2005.

BROWN, J. H.; KODRIC-BROWN, A. Turnover rates in insular biogeography: effect of immigration and extinction. **Ecology**, v. 58, p. 445–449, 1977.

BURT, S. Essential oil: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-53, 2004.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N. J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **Bioessays**, v.28, n. 10, p. 1040-1050, 2006.

CANCELI, R. R.; EVALDT, A. C. P.; BAUERMAN; S. G. **Contribuição da morfologia polínica da família Asteraceae Martinov. no Rio Grande do Sul – Parte I**. Pesquisas Botânica, , n. 58, 347-374 p. 2007.

CARVALHO, D. A. Flora fanerogâmica de campos rupestres da Serra da Bocaina, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. **Ciência e Prática**, v. 16, n. 1, p. 97-122, 1992.

CASTELLUCCIO, C.; PAGANGA, G.; MELIKIAN, N.; BOLWELL, G. P.; PRIDHAM, J.; SAMPSON, J.; RICE, E. C. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. **FEBS Letters**, v. 368, p. 188-1892, 1995.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471-479, 2006.

CERQUEIRA, M. B. S.; SOUZA, J. T.; AMADO, J. R. R.; PEIXOTO, A. B. F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica). **Ciência e Cultura**, v. 39: 551-555, 1987.

CHAKRABORTY, R. Analysis de genetic structure of populations: meaning, methods and implications. In: MAJUNDER, P. P. (Org). **Human population genetics**. San Francisco: Plenum Pres. 1993.

CHAPUIS, M.-P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 3, p. 621-631, 2007.

CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, v. 83, n. 1, p. 51-57, 1996.

CHEN, L; LUO, S.; WU, Z. H.; YU, YING; ZHANG, Y. Z. **An composition containing triterpenoid saponins extracted from bamboo, and the preparation method and use thereof**. EP 1576958 A1, 21 set. 2005.

CHIARI, E.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; SAÚDE, D. A.; PERRY, K. S. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; GRANDI, T. S. M.; STEHMANN, J. R.; ANJOS, A. M. G.; OLIVEIRA, A. B. *In vitro* screening of asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 7, p. 636–638, 1996.

CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MESQUITA, A. A. L.; TAVARES, K. G. Screening in vitro of natural-products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 3, p. 372-74, 1991.

CHICARO, P.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Flavonoids from *Lychnophora passerina* (Asteraceae): Potential antioxidants and UV-protectants. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 32, n. 1, p. 239-243, 2004.

COLE, C. T. Genetic variation in rare and common plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 34, p. 213–237, 2003.

COLE, R. B. **Electrospray Mass Spectrometry: fundamentals, instrumentation & applications**. New York: John Wiley & Sons, 1997.

COLLEVATTI, R. G.; RABELO, S. G.; VIEIRA, R. F. Phylogeography and disjoint distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. **Annals of Botany**. v. 104, p. 655–664, 2009.

COLLINS, M.; KNUTTI, R.; ARBLASTER, J.; DUFRESNE, J.-L.; FICHEFET, T.; FRIEDLINGSTEIN, P.; GAO, X.; GUTOWSKI, W. J.; JOHNS, T.; KRINNER, G.; SHONGWE, M.; TEBALDI, C.; WEAVER, A. J.; WEHNER, M. 2013: **Long-term climate change: Projections, commitments and irreversibility**. In Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. STOCKER, T. F. ; QIN, D.; PLATTNER, G.-K.; TIGNOR, M.; ALLEN, S. K.; DOSCHUNG, J.; NAUELS, A.; XIA, Y.; BEX, V.; MIDGLEY, P.M. (Eds) Cambridge University Press, 2013, p. 1029-1136.

CONFORTI, F.; MODESTOA, S.; MENICHINIA, F.; STATTI, G. A.; UZUNOV, D.; SOLIMENEC, U.; DUEZD, P.; MENICHIN, F. Correlation between environmental factors,

chemical composition, and antioxidative properties of caper species growing in Calabria (South Italy). **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 518-531, 2011.

COPAM – CONSELHO DE POLÍTICA AMBIENTAL. **Lista das espécies ameaçadas de extinção da flora do Estado de Minas Gerais**. Deliberação COPAM 85/97 . Disponível em: <<http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/MG-espécies-Flora-ameaçadas.pdf>>. Acesso em: 15 Junho 2011.

CORNUET, J.-M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, n.4, p. 2001–2014, 1996.

COSTA, F. B.; DIAS, D. A.; LOPES, J. L. C.; VICHNEWSKI, W. Flavonoids and heliangolides from *Lychnophora diamantinana*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 261-263, 1993.

COUTINHO, H. D. M.; NETO, V. M.; VERDE, L. C. L. Técnicas com Marcadores Moleculares Usadas nas Ciências da Saúde. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 10, n. 2, p. 177-188, 2006.

CRUZ NETO, C. O.; AGUIAR, A. V.; TWYFORD, A. D.; NEAVES, L. E.; PENNINGTON, R. T.; LOPES, A. V. Genetic and ecological outcomes of *Inga vera* subsp. *Affinis* (leguminosae) tree plantations in a fragmented tropical landscape. **Plos One**, v. 9, n.6, p.1-8, 2014.

CUPOLILO, S. M. N.; GOLLNER, A. M.; SOUZA, R. L. P.; TIAGO, D. A. G.; LIMA, V. B. R.; LIMA, T. S. Investigation of damage effects by antiinflammatory and immunosuppressive doses of dexamethasone on mice's gastric mucosal. **HU Revista**, v. 33, p. 17–22, 2007.

CURADO, M. A.; OLIVEIRA, C. B. A.; JESUS, J. G.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 21, p. 2363-2369, 2006.

de VICENTE, M.C.; FULTON T. **Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity**. New York: IPGRI, 2003.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1621–1637, 2009.

DESCHAMPS, C.; ZANATTAI, Z. L.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, M. C.; ROSWALKA, L. C. Avaliação sazonal do rendimento de óleo essencial em espécies de menta. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 725-730, 2008.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quimica Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DI RIENZO, A.; PETERSON, A. C.; GARZA, J. C.; VALDES, A. M.; SLATKIN, M. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1994.

DONAT, M. G.; ALEXANDER, L. V.; YANG, H. *et al.* Updated analyses of temperature and precipitation extreme indices since the beginning of the twentieth century: The adEX2 dataset. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 118, p. 2098–2118, 2013.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B. Trypanocidal activity of *Lychnophora pinaster* Mart. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**. p. 88-240, 1993.

EARL, D. A.; VON HOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER : A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, p. 359 – 361, 2012.

EFSA. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 68 (FGE.68): Consideration of cinnamyl alcohol and related flavouring agents evaluated by JECFA (55th meeting) structurally related to aryl-substituted saturated and unsaturated primary alcohol/aldehyde/acid/ester derivatives evaluated by EFSA in FGE.15Rev1. **EFSA Journal**, v. 7, n. 11, 51 p., 2009.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-445, 2004.

ELLSTRAND, N. C. Is gene flow the most important evolutionary force in plants? **American Journal of Botany**, v. 101, n. 5, p. 737–753, 2014.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 24, p. 217-242, 1993.

EUROPEIA UNION. Commission Implementing Regulation (EU) No 872/2012 of 1 October 2012 adopting the list of flavouring substances provided for by Regulation (EC) No 2232/96 of the European Parliament and of the Council, introducing it in Annex I to Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Regulation (EC) No 1565/2000 and Commission Decision 1999/217/EC. **Official Journal of the European Union**, p. 1-161, 2012.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611–2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Brasília: Embrapa Cerrados, 2007.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, A. G. F.; RODRIGO MEDEIROS, R.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKID, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*, **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228-36, 2007.

FERRAZ-FILHA, Z. S.; LOMBARDI, J. A.; GUZZO, L. S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) bioassay of extracts from *Lychnophoriopsis candelabrum* and different *Lychnophora* species. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 358-361, 2012.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Cenargen. 1998.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice**. London: Chapman and Hall, 1994.

FRANÇA, V. C.; VIEIRA, K. V. M.; LIMA, E. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S. Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 4, n. 5, p. 326-330, 2005.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 2004.

FREELAND, J. R.; PETERSEN, S. D.; KIRK, H. **Molecular Ecology**. 2. Ed. Chichester, UK: Wiley-Blackwell; 2011.

FUNK, V. A., BAYER, R. J., KEELEY, S., CHAN, R., WATSON, L., GEMEINHOLZER, B., SCHILLING, E., PANERO, J. L., BALDWIN, B. G., GARCIA-JACAS, N., SUSANNA, A.; JANSEN, R. K. Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. **Biologiske Skrifter Kongelige Danske Videnskabernes Selskab**, v. 55, n. 1, p. 343-374, 2005.

GARCIA, L. C. **Fenologia de espécies da canga em barão de cocais, quadrilátero ferrífero de minas gerais**. 2007, 99 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

GENOVESIO, A.; GIARDINI, A. M.; KWON, Y.-J.; DOSSIN, F. M.; CHOI, S. Y.; KIM, N. Y.; KIM, H. C.; JUNG, S. Y.; SCHENKMAN, S.; ALMEIDA, I. C.; EMANS, N.; FREITAS-JUNIOR, L. H. Visual genome-wide RNAi screening to identify human host factors required for *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. 1-13, 2011.

GIORGIA, A.; MADEO, M.; SPERANZA, G.; COCUCCI, M. Influence of environmental factors on composition of phenolic antioxidants of *Achillea collina* Becker ex Rchb. **Natural Product Research**, v. 24, n. 16, p. 1546–1559, 2010.

GIULIETTI, A. M.; MENEZES, N. L.; PIRANI, J.R.; MEGURO, M.; WANDERLEY M. G. L. Flora da Serra do cipó, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**. v. 9, p.1-151, 1997.

GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R.; HARLEY, R. M. Espinhaço range region. Eastern Brazil. In: DAVIS, S. D.; HEYWOOD, V. H.; HERRERA-MACBRYDE, O.; VILLA-LOBOS, J. HAMILTON, A. C. (Org.). **Centers of plant diversity. A guide and strategies for the conservation**, 1997, p. 397-404.

GOBBO-NETO L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. **The Journal of Heredity**, v. 86, n.6, p. 485-486, 1995.

GOUDET, J. HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 184–186, 2005.

GOUVEA, A. D. R.; MELONIB, F.; RIBEIRO, A. B. B.; LOPES, J. L. C.; LOPESA, N. P. A new HPLC-DAD-MS/MS method for the simultaneous determination of major compounds in the crude extract of *Lychnophora salicifolia* Mart. (Brazilian arnicão) leaves: Application to chemical variability evaluation. **Analytica Chimica Acta**, v. 748, p. 28–36, 2012.

GOVINDAJARU, D. R. Variation in gene flow levels among pre-dominantly self-pollinated plants. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 2, p.173-181, 1989.

GRAEL, C. F. F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J. L. C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. **Fitoterapia**, v. 76, n. 1, p. 73-82, 2005.

GRAEL, C. F. F.; VICHNEWSKI, W.; SOUZA, G. E.; LOPES, J. L.; ALBUQUERQUE S.; CUNHA, W. R. A study of the trypanocidal and analgesic properties from *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 3, p. 203-206, 2000.

GUZZO, C. A.; LAZARUS, G. S.; WERTH, V. Dermatological Pharmacology. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. (Org.). **Goodman & Gilman's the pharmacological basis phytotherapeutics**. 9. ed. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 1604-6,.

GUZZO, L. S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; SILVA, A. C. A.; LOMBARDI, J. A.; GUIMARÃES, H. N.; GRABE-GUIMARÃES; A. Antinociceptive and antiinflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 120–124, 2008.

HABEL, J. C.; ZACHOS, F. E.; DAPPORTO, L.; RÖDDER, D.; RADESPIEL, U.; TELLIER, A.; SCHMITT, T. Population genetics revisited – towards a multidisciplinary research field. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 115, n. 1, p. 1–12, 2015.

HABER, L. **Caracterização da diversidade genética, via marcador microssatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.** 2008. 151 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.

HABER, L.; CAVALLARI, M. M.; SANTOS, F. R.; MARQUES, M. O. M.; GIMENES, M. A.; ZUCCHI, M. I. Development and characterization of microsatellite markers for *Lychnophora pinaster*: a study for the conservation of a native medicinal plant. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 3, p. 811-814, 2009.

HAMILTON, M. **Population Genetics**. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2009.

HAMMER, Ø. HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 9 leip, 2001.

HAN, L.; YANG, L.; LIU, B.; CHENG, X. *Trans*-caryophyllene suppresses tumor necrosis factor (TNF α)-induced inflammation in human chondrocytes. **European Food Research and Technology**. v. 239, p. 1061–1066, 2014.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4^a ed. Editora Artmed: Porto Alegre. 2010.

HARLEY, R. M. **Introduction**. In: STANNARD, B. L. (Org.). Flora of Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia. Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. p. 1-40.

HASSIOTIS, C. N.; NTANA, F.; LAZARI, D. M.; POULIOS, S.; VLACHONASIOS, K. E. Environmental and developmental factors affect essential oil production and quality of *Lavandula angustifolia* during flowering period. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 359–366, 2014.

HAYWARD, A. C.; TOLLENAERE, R.; DALTON-MORGAN, J.; BATLEY, J. Molecular marker applications in plants. **Methods in Molecular Biology**, v. 1245, p. 13-27, 2015.

HEBER, S.; VARSANI, A.; KUHN, S.; GIRG, A.; KEMPENAERS, B; BRISKIE, J. The genetic rescue of two bottlenecked South Island robin populations using translocations of inbred donors. **Proceedings of the Royal Society B**. v. 280, n. 1752, p.1-8, 2013.

HEIDEN, G.; BARBIERI, R. L.; WASUM, R. A.; SCUR, L.; SARTORI, M. A família Asteraceae em São Mateus do Sul, Paraná. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 249-251, 2007.

HENGXIAO, G.; MCMILLIN, J. D.; WAGNER, M. R.; ZHOU, J.; ZHOU, Z.; XU, X. Altitudinal variation in foliar chemistry and anatomy of yunnan pine, *Pinus unnanensis*, and pine sawfly (Hym., Diprionidae) performance. **Journal of Applied Entomology**, v. 123, n. 8, p. 465–471, 1999.

HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 6, p. 65-67, 1979.

HONNAY, O.; JACQUEMYN, H. susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. **Conservation Biology**, v. 21, n. 3, p. 823–831, 2007.

HOSBINO, A. A.; PALMIERI, D. A.; BRAVO, J. P.; PEREIRA, T. E. B.; LOPES, C. R.; GIMEMES, M. A. Marcador microsatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, 2002.

HOSHINO, A. A.; BRAVO, J. P.; NOBILE, P. M.; MORELLI, K. A. Chapter 6. Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis. In: CALISKAN, M. (Org). **Genetic Diversity in Microorganisms**. Intech: Croacia. 2012. s

HUANG ,Q. S.; ZHU, Y. J.; LI, H. L.; ZHUANG, J. X.; ZHANG, C. L.; ZHOU, J. J.; LI, W. G.; CHEN, Q. X. Inhibitory effects of methyl *trans*-cinnamate on mushroom tyrosinase and its antimicrobial activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2565-9, 2009a.

HUANG, Y.; ZHANG, C.-Q.; LI, D.-Z. Low genetic diversity and high genetic differentiation in the critically endangered *Omphalogramma souliei* (Primulaceae): implications for its conservation. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 47, n. 2, p. 103–109, 2009b.

HURLBERT, S. H. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. **Molecular Ecology**, v. 52, n. 4, p. 577-586, 1971.

HUSEMANN, M.; COUSSEA, L.; BORGHESIO, L.; LENS, L.; HABEL, J. C. Effects of population size and isolation on the genetic structure of the East African mountain white-eye *Zosterops poliogaster* (Aves). **Biological Journal of the Linnean Society**, p. 1-9, 2015.

IPCC: Summary for Policymakers. 2007. In: SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M. *et al.* (Eds). **Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 1-18.

ISOBE, M. T. C. **Anatomia foliar e influência da sazonalidade no óleo essencial de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.** 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F. Diversidade dos campos rupestres ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, MG. **Megadiversidade**. v. 4(1-2), p. 26-33, 2008.

JADWISZCZAK, K. A.; DRZYMULSKA, D.; BANASZEK, A.; JADWISZCZAK, P. Population History, Genetic Variation and Conservation Status of the Endangered Birch Species *Betula nana* L. in Poland. **Silva Fennica**, v. 46, p. 465-477, 2014.

JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus Vulgaris* L.).** 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JINGURA, R. M.; KAMUSOKO, R. Utility of Markers for Determination of Genetic Diversity in *Jatropha*: A Review. **The Open Renewable Energy Journal**, v. 8, p. 1-6, 2015.

JOHNSTON, M. O. Mutations and New Variation: Overview. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-10, 2001.

JOMBART, T. Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, v. 24, p. 1403-1405, 2008.

JORDÃO, C. O.; VICHNEWSKI, W.; DE SOUZA, G. E.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J. L. Trypanocidal activity of chemical constituents from *Lychnophora salicifolia* Mart. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 8, p. 332-334, 2004.

JOSHI, U. J.; GADGE, A. S.; D'MELLO, P.; SINHA, R.; SRIVASTAVA, S.; GOVIL, G. Anti-inflammatory, antioxidant and anticancer activity of quercetin and its analogues. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 1756-1766, 2011.

KAHILAINENA, A.; PUURTINENA, M.; KOTIAHO, J. S. Conservation implications of species–genetic diversity correlations. **Global Ecology and Conservation**, v. 2, p. 315–323, 2014.

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, p. 309–334, 2011.

KAPLAN, M. A. C.; RIBEIRO, J.; GOTTLIEB, O. R. Chemogeographical evolution of terpenoids in Icacinaceae. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2671-2676, 1991.

KASAI, H.; FUKADA, S.; YAMAIZUMI, Z.; SUGIE, S.; MORI, H. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 467-71, 2000.

KEENAN, K.; MCGINNITY, P.; CROSS, T. F.; CROZIER, W. W.; PRODÖHL, P. A. diveRsity: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors. **Methods in Ecology and Evolution**, 2013.

KHADIVI-KHUBA, A.; AGHAEIB, Y.; MIRJALILIC, M-H. Phenotypic and phytochemical diversity among different populations of *Stachys lavandulifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 54, p. 272–278, 2014.

KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v. 49, p. 725-38, 1964.

KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, n 6, p. 2868-2872, 1978.

KONDO, N.; KAWASHIMA, M. Enhancement of the tolerance to oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by uv-b irradiation: possible involvement of

phenolic compounds and antioxidative enzymes. **Journal of Plant Research**, v. 113, p. 311-317, 2000.

KONO, Y.; SHIBATA, H.; KODAMA, Y.; SAWA, Y. The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. **Biochemical Journal**, v. 312, p. 947-953, 1995.

KORDROSTAMI, M.; RAHIMI, M. Molecular Markers in Plants: Concepts and Applications. **Genetics in the Third Millennium**, p. 4024-4031, 2015.

KORICHEVA, J., LARSSON, S., HAUKIOJA, E.; KEINÄNEN, M. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. **Oikos**, v. 83, n. 2, p. 212-226, 1998.

KOSHIRO, Y.; JACKSON, M. C.; KATAHIRA, R.; WANG, M.-L.; NAGAI, C.; ASHIHARAA, H. Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* plants. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, p.731-742, 2007.

KOVÁČIK, J.; BACKER, M.; KADUKOVÁ, J. Physiological responses of *Matricaria chamomilla* to cadmium and copper excess. **Environmental Toxicology**, v. 23, p. 123–130, 2008.

KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. **Plant Omics Journal Southern Cross Journals**, v. 2, n. 4, p. 141-162, 2009.

LAVOR, P.; BERG, C. V. D.; JACOBI, C. M.; CARMO, F. F.; VERSIEUX, L. M. Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. **American Journal of Botany**, v. 101, p. 1167–1175, 2014.

LEITE, A. M.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; DINIZ, M. F. F. M.; TRAJANO, V. N.; MEDEIROS, I. A. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 1, p. 121-126, 2007.

LEWIS, P. O., AND ZAYKIN, D. 2001. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Disponível em: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>> Acesso em: 06 maio 2016.

LI TZU PAO MEI REGIMAN BEAUTY PUBLIC LTD COMPANY. Hsieh Hui-Lien (USA). **Composite with Antibacterial and Antipruritic Functions**. US n. 2015150926 A1. 04 junho 2015.

LOEUILLE, B.; SEMIR, J.; LOHMANN, L. G.; PIRANI, J. R. A phylogenetic analysis of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernoniaeae) based on molecular and morphological data. **Systematic Botany**, v. 40, n. 1, p. 299–315, 2015.

LOHR, J. N.; DAVID, P.; HAAG, C. R. Reduced lifespan and increased ageing driven by genetic drift in small populations. **Evolution**, v. 68, n. 9, p. 2494–2508, 2014.

LONGHI - WAGNER, H. M.; BOLDRINI, I. I.; MIOTTO, S. T. S.; BOECHAT, S. C. **Apostila de Botânica Agrícola**. Porto Alegre: Departamento de Botânica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 87 p.

LORENZO, D.; GONZALEZ, G.; ROSSINI C. **Farmacognosia y Productos Naturales**. Contenido del curso teórico, Apostila 04: Aceites Esenciales, Montevideo, 2002, p. 14-18.

LUQUE, R.; MENEZES, N. L. de. Estructura primaria del tallo de *Lychnophora* Mart. (Vernonieae: Asteraceae). **Plântula**, v. 3., n. 2, p. 117-128, 2003.

MACHADO, R.B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**: Relatório técnico não publicado. Brasília: Conservação Internacional, 2004. 23 p.

MACTAVISH, H.; HARRIS, D. **An economic study of essential oil production in the UK: A case study comparing non-UK lavender/lavandin production and peppermint/spearmint production with UK production techniques and costs**. 2002. 58 f. ADAS Consulting Ltd. 2002.

MALMIR, H. A. The relations between phenylalanine–ammonia lyase, glutathione-s-transferase activities and the concentrations of total tannins, phytochelatin, glutathione, and peroxidation in two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) exposed to aluminum. **Agricultural Research**, v. 1, n. 3, p. 240–250, 2012.

MALLET, J. Gene Flow. In: WOIWOOD, I.; REYNOLDS, D. R.; THOMAS, C. D. (Org.) **Insect Movement: Mechanisms and Consequences**. CABI: Wallingford, 2001. p. 337-360.

MANSANARES, M. E.; MARTINS, E. E. F.; SEMIR, J. Chromosome numbers in the genus *Lychnophora* Mart. (Lychnophorinae, Vernonieae, Asteraceae). **Caryologia**. Firenze, v. 55, n. 4, p. 367-374, 2002.

MAROUELLI, R. P. **O desenvolvimento sustentável da agricultura no cerrado brasileiro**. 2003, 64 p, Monografia (Especialização em Gestão Sustentável da Agricultura Irrigada) - Ecobusiness school. Brasília, DF. 2003.

MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; HABER, L. L.; VIEIRA, M. A. R. **Essential Oils: History, Biosynthesis, and Agronomic Aspects. Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects**. New York: Nova Science Publishers, 2012. p. 3-22.

MARTIUS, C. F. P. Novum plantarum genus *Lychnophora*. **Denkschriften der Königlich Bayerischen Botanischen**, v. 2, p. 148-159, 1822.

MCCOUCH, S. R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y. G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p. 89–99, 1997.

McKEY, D. The distribution of secondary compounds within plants. In: ROSENTHAL, G. A. e JANZEN, D. H. (Org.), **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites**. Academic Press, p. 56-133, 1979.

MEDOLA, J. F.; CINTRA, V. P.; PESQUEIRA E SILVA, E. P.; ANDRADE ROYO, V.; SILVA, R.; SARAIVA, J.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J. K.; ANDRADE E SILVA, M. L.; TAVARES, D. C. (-)-Hinokinin causes antigenotoxicity but not genotoxicity in peripheral blood of Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 638–642, 2007.

MELO, P. R. B.; OLIVERIA, J. A.; PINTO, J. E. B. P.; CASTRO, E. M.; VIEIRA, A. R.; EVANGELISTA, J. E. E. Germinação de aquênios de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.) armazenadas em diferentes condições. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 75-82, 2007.

MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversas – Fundação Zoo-botânica de Belo Horizonte, 2000.

MELITO, S.; SIAS, A.; PETRETTO, G. L.; CHESSA, M.; PINTORE, G.; PORCEDDU, A. Genetic and metabolite diversity of sardinian populations of *Helichrysum italicum*. **Plos One**, v. 8, n. 11, p. 1-11, 2013.

MIAH, G.; RAFII, M. Y.; ISMAIL, M. R.; PUTEH, A. B.; RAHIM, H. A.; ISLAM, KH. N.; LATIF, M. A. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 22499-22528, 2013.

MIGUEL, O. G.; LIMA, E. O.; MORAIS, V. M. F.; GOMES, S. T. A.; DELLE MONACHE, F.; BELLA CRUZ, A.; BELLA CRUZ, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Antimicrobial activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 694-696, 1996.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente/Secretaria da Biodiversidade e Florestas, 2002. Disponível em: <http://www.biodiversidade.rs.gov.br/arquivos/BiodiversidadeBrasileira_MMA.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2012.

MONDINI, L.; NOORANI, A.; PAGNOTTA, M. A. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. **Diversity**, v. 1, p. 19-35, 2009.

MONTEIRO, J. M.; LINS-NETO, E. M.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Bark regeneration and tannin content in *Myracrodruon urundeuva* Allemão after simulation of extractive damages—implications to management. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, p. 31–39, 2011.

MORAES, C. B.; GIARDINI, M. A.; KIM, A.; FRANCO, C. H.; ARAUJO-JUNIOR, A. M.; SCHENKMAN, S.; CHATELAIN, E.; FREITAS-JUNIOR, L. H. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*:

implications for Chagas disease drug discovery and development. **Scientific Reports**, v. 4, n. 4703, p. 1-11, 2014.

MORAES, S. L.; GREGÓRIO, L. E.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P. Rapid screening and identification of polar constituents from Brazilian Arnica *Lychnophora* sp. by LC-UV/DAD-ESI-MS and LC-UV/DAD-ESI-MS/MS analysis. **Chromatographia**, v. 60, p. 157-165, 2009.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature genetics**, v. 30, p. 194-200, 2002.

MOUNTAIN PROVINCE STATE POLYTECHNIC COLLEGE. Pakipac Elmer D. **Ethnobotanical Blend Insecticides**. PH 22011000159 Y1, 02 dez. 2015.

MÜLLER, V.; LANKES, C.; ALBERT, A.; WINKLER, J. B.; ZIMMERMANN, B. F.; NOGA, G.; HUNSCHE, M. Concentration of hinokinin, phenolic acids and flavonols in leaves and stems of *Hydrocotyle leucocephala* is differently influenced by PAR and ecologically relevant UV-B level. **Journal of Plant Physiology**, v. 173, p. 105–115, 2015.

NAKAJIMA, J. N. **A família Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil**. 2000. 416 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

NEI, M. Genetic distances between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.

NESTEC SA. Westfall Scott A; Wu William; Birch Annette Michelle; Scarlatos Amber Christine. **Method of Producing an Aromatised Food or Beverage Product**. CA2891400 A1. 06 maio 2014.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1143–1155, 2004.

OLIVEIRA, A. B.; ANJOS, A. M. G.; DUARTE, D. S. Atividade *in vitro* de espécies da família Compositae contra formas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*. In: XII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, 1992, Curitiba. **Resumos...Curitiba: UFPR, XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, p. 194, 1992.

OLIVEIRA, A. B.; SAÚDE D. A.; PERRY, K. S. P.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; CHIARI, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 4, p. 292-295, 1996.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, M. J.; CAMPOS, I. F. P.; OLIVEIRA, C. B. A.; SANTOS, M. R.; SOUZA, P. S.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Influence of growth phase on the

essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 3, p. 275–285, 2005.

PARIDA, S. K.; KALIA, S. K.; SUNITA, K.; DALAL, V.; HEMAPRABHA, G.; SELVI, A.; PANDIT, A.; SINGH, A.; GAIKWAD, K.; SHARMA, T. R.; SRIVASTAVA, P. S.; SINGH, N. K.; MOHAPATRA, T. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, p. 327–338, 2009.

PARMESAN, C.; YOHE, G. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. **Nature**, v. 421, p. 37–42, 2003.

PAULUS, D.; VALMORBIDA, R.; TOFFOLI, E.; NAVA, G.; PAULUS, E. Teor e composição química do óleo essencial e crescimento vegetativo de *Aloysia triphylla* em diferentes espaçamentos e épocas de colheita. **Revista Ceres**, v. 60, n.3, p. 372–379, 2013.

PAVARINI, D. P.; CALLEJON, D. R.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. Novo sesquiterpeno isolado do óleo essencial de *Lychnophora ericoides* (Mart.) e a avaliação in vitro de seu potencial antinociceptivo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31, 2008, Águas de Lindóia. **Resumos... Águas de Lindóia: SBQ, 2008. Versão Eletrônica.**

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004. Disponível em: <<http://www.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf?PHPSESSID=e32d8df36f08f86ef80010a253f33762>>. Acesso em: 17 jan 2013.

PETACCI, F.; TAVARES, W. S.; FREITAS, S. S.; TELES, A. M.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Phytochemistry and quantification of polyphenols in extracts of the Asteraceae weeds from Diamantina, Minas Gerais State, Brazil. **Planta Daninha**, v. 30, n. 1, p. 9–15, 2012.

PICAUD, S., BRODELIUS, M., BRODELIUS, P. E. Expression, purification and characterization of recombinant (E)-beta-farnesene synthase from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 961–967, 2005.

PICHERSKY, E.; LEWINSOHN, E. Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, p. 549–66, 2011.

PINHEIRO, M. D.; MAGALHAES, R. M.; TORRES, D. M.; CAVALCANTE, R. C.; MOTA, F. S. X.; COELHO, E. M. A. O.; MOREIRA, H. P.; LIMA, G. C.; ARAUJO, P. C. D.; CARDOSO, J. H. L.; DE SOUZA, A. N. C.; DINIZ, L. R. L. Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from *Hyptis* species. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 41, p. 123–130, 2015.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 502–503, 1999.

PIVELLO, V. R. The use of fire in the Cerrado and Amazonian rainforests of Brazil: past and present. **Fire Ecology**, v. 7, p. 24-39, 2011.

PRITCHARD, R.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959, 2000.

RAMOS, F.; TAKAISHI, Y.; KAWAZOE, K.; OSORIO, C.; DUQUE, C.; ACUNA, R.; FUJIMOTO, Y.; SATO, M.; OKAMOTO, M.; OSHIKAWAE, T.; AHMEDE, S. U. Immunosuppressive diacetylenes, ceramides and cerebroside from *Hydrocotyle leucocephala*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1143–1150, 2006.

RAMOS-NETO, M. B.; PIVELLO, V. R. Lightning fires in a Brazilian savanna national park: rethinking management strategies. **Environmental Management**, v. 26, p. 675-684, 2000.

RAO, R. V.; HODGKIN, T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 1–19, 2002.

RAPINI, A.; RIBEIRO, P. L.; LAMBERT, S.; SPIRANI, J. R. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 17-24, 2008.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

REATTO, A.; CORREIA, J. R.; SPERA, S. T. Solos do Bioma do Cerrado: aspectos pedológicos. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Org.). **Cerrado: ambiente e flora**. Embrapa/CPAC, Planaltina, 1998, p. 47-86.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; PAULA, J. R. S. Seasonal variation in essential oils of *Lychnophora pinaster* Mart. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 2, p. 147-149, 2010.

RHOADES, D. F.. Evolution of plant chemical defense against herbivores. In: ROSENTHAL, G. A. e JANZEN, D. H. (Org), **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites**. Academic Press, p. 1-54, 1979.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. **Vegetação Campestre: Campo Rupestre**. 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_39_911200585233.html>. Acesso em: 18 janeiro 2015.

RICHARDS, C. M. Inbreeding depression and genetic rescue in a plant metapopulation. **American Naturalist**, v. 155, n. 383–394, 2000.

RISHI BHATIA. Rishi Bhatia (USA). **Herbal Composition for Vaginal Treatment**. US n. 2015157674 A1. 11 junho 2005 .

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência Agrotecnica**, v. 25, n. 1, p.102-123, 2001.

SAADI, A. A. Geomorfologia da serra do espinhaço em minas gerais e de suas margens. **Geonomos**, v. 3, p. 41-63, 1995.

SAID, S. A.; FERNANDEZ, C.; GREFF, S.; TORRE, F.; DERRIDJ, A.; GAUQUELIN, T.; MEVY, J. P. Inter-Population variability of terpenoid composition in leaves of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria: A chemoecological approach. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2646-2657, 2011.

SAINUDIIN, R.; DURRETT, R. T.; AQUADRO, C. F.; NIELSEN, R. Microsatellite Mutation Models: Insights From a Comparison of Humans and Chimpanzees. **Genetics**, v. 168, p. 383–395, 2004.

SALVADOR, M. J.; SARTORI, F. T.; SACILOTTO, A. C.; PRAL, A. C.; ALFIERI, S. C.; VICHNEWSKI, W. Bioactivity of flavonoids isolated from *Lychnophora arkgravii* against *Leishmania amazonensis* amastigotes. **Zeitschrift für Naturforschung C., Journal of Biosciences**, v. 64, n. 7-8, p. 509-512, 2009.

SANTIAGO, L. M. S.; LOURO, R. P.; DULCE, E. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulfate. **Annals of Botany**, v. 86, p. 1023–1032, 2000.

SANTOS, M. D. dos. *Lychnophora ericoides* Mart: avaliação farmacológica e considerações sobre o metabolismo oxidativo das substâncias bioativas. 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2006.

SANTOS, M. D. dos; CHEN, G.; ALMEIDA, M. C.; SOARES, D. M.; SOUZA, E. P. de; LOPES, N. P. LANTZ, R. C. Effects of caffeoylquinic acid derivatives and C-Flavonoid from *Lychnophora ericoides* on in vitro inflammatory mediator production. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 5, p. 733-740, 2010.

SANTOS, M. D.; GOBBO-NETO, L.; ALBARELLA, L.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of dicaffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 545-549, 2005.

SANTOS, P. A.; AMARANTE, M. F.; PEREIRA, A. M.; BERTONI, B.; FRANÇA, S. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTALOTUFO, L. V.; PEREIRA, M. R.; LOPES, N. P. Production of an antiproliferative furanoheliangolide by *Lychnophora ericoides* cell culture. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1433-1435, 2004.

SARAIVA, J.; VEJA, C.; ROLON, M.; SILVA, R.; ANDRADE E SILVA, M. L.; DONATE, P. M.; BASTOS, J. K.; GOMEZ-BARRIO, A.; ALBUQUERQUE, S. In vitro and in vivo activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 100, n. 4.; p. 791–795, 2007.

SARTORETTO, L. M.; FARIAS, P. C. M. Diversidade genética e técnicas biotecnológicas. **Unoesc & Ciências**, v. 1, n. 2, p. 155-162, 2010.

SARTORI, F. T.; SACILOTTOA, A. C. B. C.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P.; VICHNEWSKIB, W. Phytochemical study of *Lychnophora markgravii* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 6, p. 609-612, 2002.

SAÚDE, D. A.; BARRERO, A. F.; OLTRA, J. E.; RASLAN, D. F.; SILVA, E. A. Atividade antibacteriana de furanoelíngólidos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 7-10, 2002.

SAÚDE, D. A.; RASLAN, D. S.; CHIARI, E.; OLTRA, J. E.; BARRERO, A. F. **Eremantholide C derivatives with trypanocidal activity**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIODIVERSITY, 2, 1999, Belo Horizonte. Resumos... Belo Horizonte: IUPAC, 1999. Versão eletrônica.

SAÚDE, D. A.; RASLAN, D. S.; SOUZA FILHO, J. D.; OLIVEIRA, A. B. Constituentis from the aerial parts of *Lychnophora trichocarpha*. **Fitoterapia**, Milano, v. 69, n. 1, p. 90-91, 1998.

SCHLOTTERER, C. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**. v. 5, p. 63-69, 2004.

SCHMIDT, I. B.; FIGUEIREDO, I. B.; SCARIOT, A. Ethnobotany and effects of harvesting on the population ecology of *Syginanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae), a NTFP from Jalapão region, Central Brazil. **Economic Botany**, v. 1, p. 73-85, 2007.

SCHUH, G.; HEIDEN, A. C.; HOFFMAN, T.; KAHL, J.; ROCKEL, P.; RUDOLPH, J.; WILDT, J. Emissions of volatile organic compounds from sunflower and beech: dependence on temperature and light intensity. **Journal of Atmospheric Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 291-318, 1997.

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae: Compositae)**. 1991. 515 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade de Campinas, Campinas. 1991.

SEMIR, J.; REZENDE, A. R.; MONGE, M.; LOPES, N. P. **As arnicas endêmicas das Serras do Brasil: Uma visão sobre a biologia e a química das espécies de *Lychnophora* (Asteraceae)**. Ouro Branco (MG): UFOP, 212 p., 2011.

SHAO, M.; CZAPIEWSKI, K. V.; HEIDEN, A. C.; KOBEL, K.; KOMENDA, M.; KOPPMANN, R.; WILDT, J. Volatile organic compound emissions from Scots pine: mechanisms and description by algorithms. **Journal Geophysical Reserch**, v.106, n. 17, p. 483- 491, 2001.

SHARMA C. K.; KANWAR S. S. Synthesis of methyl cinnamate using immobilized lipase from *B. licheniformis* MTCC-10498. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 1, n. 3, p. 68-71, 2012.

SHIBATA, H.; SAKAMOTO, Y.; OKA, M.; KONO, Y. Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 63, p. 1295-1297, 1999.

SHORR, A. F. Epidemiology and economic impact of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaco Economics**, v. 25, p. 751-768, 2007.

SILVA, A. C. R.; LOPES, P. M.; AZEVEDO, M. M. B.; COSTA, D. C. M.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, 2012.

SILVA, F. G.; OLIVEIRA, C. B. A.; PINTO, J. E. B. P.; NASCIMENTO, S. C. S.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Seasonal variability the essential oils od wild and cultivates *Baccharis trimera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 990-997, 2007.

SILVA, P. S. S. **Caracterização da composição química dos óleos essenciais de *Lychnophora pinaster* Mart. em função da sazonalidade**. 2013. 167 f. Dissertação de Mestrado (Agronomia: Horticultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2013.

SILVA, R.; SOUZA, G. H. B.; SILVA, A. A.; SOUZA, V. A.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. D. A.; E SILVA, M. L. A.; DONATE, P. M.; MATOS ARAÚJO, A. L. S.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Synthesis and biological activity of lignan lactones derived from (-)-cubebin. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 1033-1037, 2005.

SILVEIRA, D.; SOUZA FILHO, J. D.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S. Lychnophoric acid from *Lychnophora pinaster*: a complete and unequivocal assignment by NMR spectroscopy. **Eclética Química**, v. 30, n. 1, p. 37-41, 2005b.

SILVEIRA, D.; WAGNER, H.; CHIARI, E.; LOMBARDI, J. A.; ASSUNÇÃO, A. C.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S. Biological activity of the aqueous extract of *Lychnophora pinaster* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 294-297, 2005a.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. cap. 18, p. 467-495.

SLATKIN, M. Rare Alleles as Indicators of Gene Flow. **Evolution**, v. 39, n. 1, p. 53-65, 1985.

SMOUSE, P. E.; LONG, J. C.; SOKAL, R. R. Multiple Regression and Correlation Extensions of the Mantel Test of Matrix Correspondence. **Systematic Zoology**, v. 35, n. 4, p. 627-632, 1986.

SOMERVILLE, C.; SOMERVILLE, S. Plant functional genomics. **Science**, v. 285, 380-383, 1999.

SOUZA, M. R.; PAULA, C. A.; PEREIRA, R. M. L.; GRABE-GUIMARÃES, A.; SOUZA FILHO, J. D.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpha* in gouty arthritis: anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its

extract, fraction and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 845-850, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI H. **Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira**, baseado em APG II. 2. ed, Nova Odessa: Plantarum, 2008, 703 p.

STEVOVIĆ, S.; ČALIĆ-DRAGOSAVAC, D.; MIKOVILOVIĆ, V. S.; ZDRAVKOVIĆ-KORAĆ, S.; MILOJEVIĆ, J.; CINGE, A. Correlation between environment and essential oil production in medical plants. **Advances in Environmental Biology**, v. 5, n. 2, p. 465-468, 2011.

SULTANA, B.; ANWAR, F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 108, p. 879-884, 2008.

SUN, J. T.; JIANG, X. Y.; WANG, M. M.; HONG, X. Y. Development of microsatellite markers for, and a preliminary population genetic analysis of, the white-backed planthopper. **Bulletin of Entomological Research**, v. 104, p. 765-773, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TAJIMA, F. Infinite-allele model and infinite-site model in population genetics. **Journal of Genetics**, v. 75, n. 1., p. 27-31, 1996.

TAKEARA R.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. Trypanocidal activity of *Lychnophora staavioides* Mart. (Vernonieae, Asteraceae). **Phytomedicine**, Amsterdam, v. 10, n. 6-7, p. 490-493, 2003.

TANAKA, K.; OSHIO, A.; ENOKI, S. KUBO, A.; TAKAHARA, Y. Population genetic diversity of the endemic plant subspecies *Ixeridium dentatum* subsp. nipponicum (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 73-78, 2014.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **Plant Journal**, v. 54, p. 733-749, 2008.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, p. 1089-1099, 2008.

TEIXEIRA, A. R. L.; HECHT, M. M.; GUIMARO, M. C.; SOUSA, A. O.; NITZ, N. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 592-630, 2011.

TELLES, M. P. C.; SILVA, R. S. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. J.; FILHO, J. A. F. D. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 11, p. 1387-1394, 2001.

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. D.; Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics Society of America**, v. 158, p. 811-832, 2001.

TROPICOS.org. Missouri Botanical Garden [Internet]. *Lychnophora pinaster* Mart. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/2738593>>. Acesso em: 13 setembro 2014.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D.J. A generalization of the relation index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-467, 1963.

VASCONCELOS, M. F. O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, n. 2, p. 241-246, 2011.

VENCOVSKY, R. Variance of an estimative of the outcrossing rate. **Brazilian of Journal of Genetics**, v. 15, p. 53-60, 1992.

VERNET, Ph; GOUYON, R. H.; VALDEYRON, G. Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L: a case of polymorphism in a biosynthetic chain. **Genetica**, v. 69, n 3, n. 227-231, 1986.

VESTAL, M. L. Methods of ion generation. **Chemical Reviews**. 101, v. 2, p. 361-75, 2001.

VEVERKA, V.; DUBAJ, T.; GALLOVIC, J.; JORIK, V.; VEVERKOVA, E.; DANIHELOVA, M.; SIMON, P. Cocrystals of quercetin: synthesis, characterization, and screening of biological activity. **Monatshefte für Chemie**, v. 146, p. 99–109, 2015.

VIANA, P. L.; LOMBARDI, J. A. Florística e caracterização dos campos rupestres sobre canga na Serra da Calçada, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**. v. 58, p. 159-177, 2007.

VIEIRA, M Ap R. 2012. **Diversidade genética e constituição química dos óleos essenciais de populações de *Lychnophora ericoides* Mart. E *Lychnophora pinaster* Mart.** 2012. 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas/Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**. v. 3, n. 1, p. 2-20, 2010.

WALTHER, G. R.; POST, E.; CONVEY, P. *et al.* Ecological responses to recent climate change. **Nature**, v. 416, p. 389-395, 2002.

WAN, Q-H.; WU, H.; FUJIHARA, T.; FANG, S-G. Which genetic marker for which conservation genetics issue? **Electrophoresis**, v. 25, p. 2165–2176, 2004.

WANG LI-REN; HUA GUAN BIOCHEMICAL TECH CO LTD. Wang Li-Ren (China). **Plant composition for promoting hair growth**. TW n. 201509438 A. 03 junho 2015.

WANG, M. L.; BARKLEY, N. A.; JENKIS, T. M. Microsatellite markers in plants and insects. Part I: Applications of Biotechnology. **Genes, Genomes and Genomics**, v. 3, n. 1., p. 1-14, 2009.

WARDLE, D. A.; NILSSON, M.-C.; GALLET, C.; ZACKRISSON, O. An ecosystem-level perspective of allelopathy. **Biological Reviews**, v. 73, p. 305-319, 1998.

WEIR, B. S. **Genetics data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996.

WEIR, B.S; COCKERHAM, C. Estimating F statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358 – 1370, 1984.

WHITELEY, A. R.; FITZPATRICK, S. W.; FUNK, W. C.; TALLMON, D. A. Genetic rescue to the rescue. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 30, n. 1, p. 42-49, 2015.

WHO (World Health Organization). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em: 14 setembro 2014.

WILDER, J.; HOLLOCHER, H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 384–392, 2001.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3–19, 2003.

WINKEL-SHIRLEY, B. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. **Physiologia Plantarum**, v. 107, p. 142–149, 1999.

WRIGHT, A. F. Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-10, 2005.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Variability within and among populations. Chicago: The University of Chicago Press, 1978.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97-158, 1931.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, p. 114-138, 1943

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, n. 3, p. 395-420, 1965.

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

YANG, S.; WANG, L.; HUANG, J.; ZHANG, X.; YUAN, Y.; CHEN, J-Q.; HURST, L. D.; TIAN, D. Parent–progeny sequencing indicates higher mutation rates in heterozygotes. **Nature**, p. 1-5, 2015.

YAO, Y. F.; DAI, Q. X.; LIU, J.; NI, Q. Y.; ZHANG, M. W.; XU, H. L. Genetic diversity and differentiation of the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) population in western Sichuan, China, based on the second exon of the major histocompatibility complex class II DQB (*MhcMamu-DQB1*) alleles. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 130, p. 2-13, 2014.

YAVARI, A.; NAZERI, V.; SEFIDKON, F.; HASSANI, M. E. Influence of some environmental factors on the essential oil variability of *Thymus migricus*. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 6, p. 943-948, 2010.

YOU-CHUN, L.; ABRAHAM, B. K.; TZION F.; AVIGDOR, B.; EVIATAR N. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2453-2465, 2002.

ZHANG, J. H.; CHUNG, T. D.; OLDENBURG, K. R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 4, n. 2, p. 67-73, 1999.

ZHANG, P.; LIU, D.; SHEN, H.; LI, Y.; NIE, Y. Proteome analysis of dormancy-released seeds of *Fraxinus mandshurica* Rupr. in response to re-dehydration under different conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 4713-4730, 2015.

ZHOU, T.-H.; WU, K.-X.; QIAN, Z.-Q.; ZHAO, G.-F.; LIU, Z.-L.; LI, S. Genetic diversity of the threatened Chinese endemic plant, *Sinowilsonia henryi* Hemsl. (Hamamelidaceae), revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 56, p. 171-177, 2014.

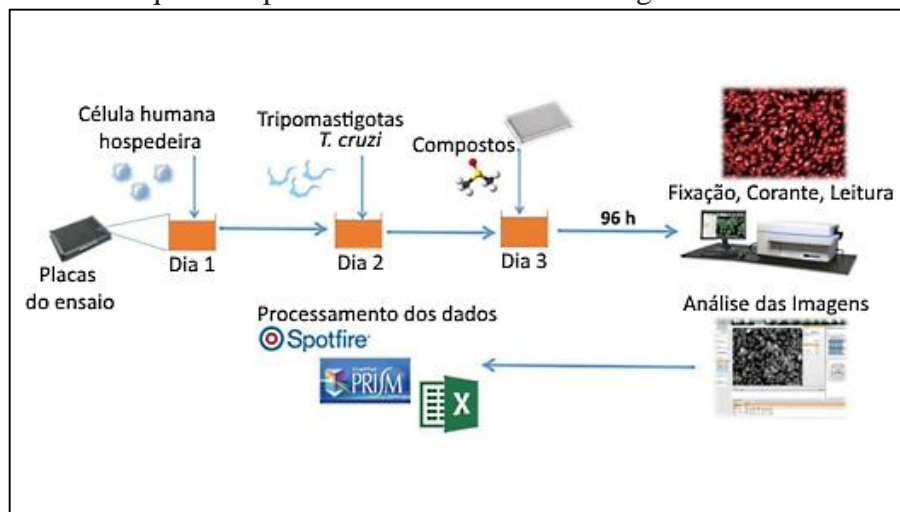
ZHU, Y.; STRASSMANN, J. E.; QUELLER, D. C. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. **Genetics Research**, 76, p. 227–236, 2000.

ZOUARI, S.; AYADI, I.; FAKHFAKH, N.; JDIR, H.; ALOUI, L.; KOSENTINI, M.; REBAI, A.; ZOUARI, N. Essential oil variation in wild populations of *Artemisia saharae* (Asteraceae) from Tunisia: chemical composition, antibacterial and antioxidant properties. **Botanical Studies**, v. 55, n. 76, p. 1-10, 2014.

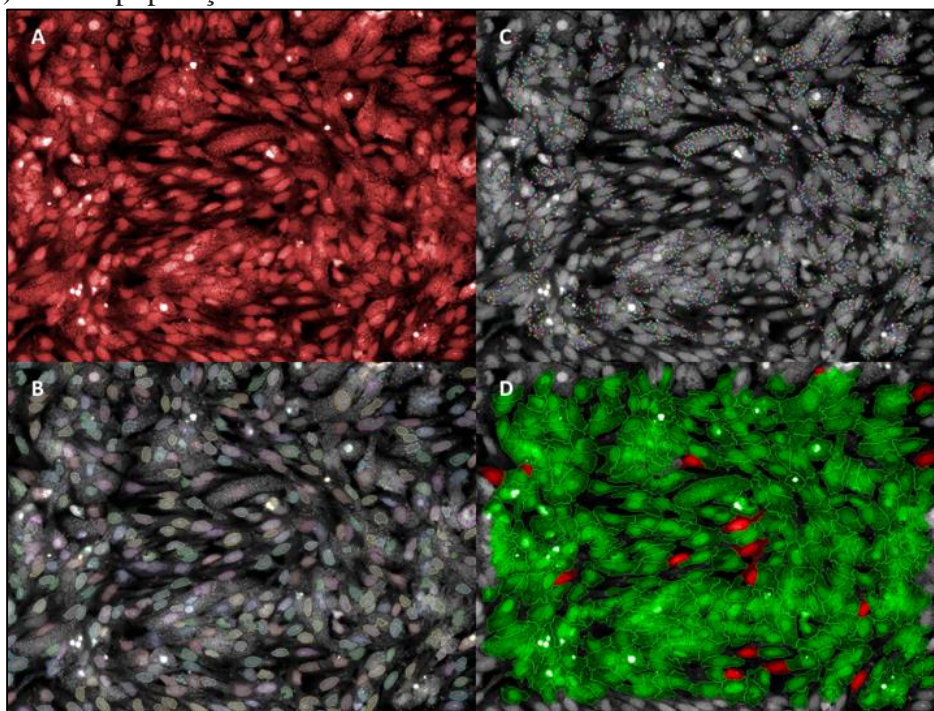
ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130 f. Tese (doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Esquema representativo de ensaio de triagem de alto conteúdo (HCS).



APÊNDICE 2. Análise de alto conteúdo. **A) Input**, imagem de saída. **B) Find Nuclei**, identifica os núcleos das células hospedeiras baseando-se na marcação nuclear. **C) Find Spots**, identifica e quantifica o ponto que representa o DNA corado do parasita dentro do citoplasma da célula hospedeira. **D) Select Population**, seleciona a células infectadas (verde) entre a população total de células.



APÊNDICE 3. Matriz de confusão para classificação das amostras dos solos de origem das populações AB, OB e SSa estimadas pela DA. As populações AB e SSa são provenientes da região sul e OB é proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.

de \ a	AB	OB	SSa	Total	% correto
AB	10	0	0	10	100%
OB	0	4	0	4	100%
SSa	0	0	9	9	100%
Total	10	4	9	23	100%

APÊNDICE 4. Matriz de confusão para classificação das amostras dos solos de origem das populações AB e SSa, provenientes da região sul, estimadas pela DA. As populações AB e SSa são provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais - Brasil.

de \ a	AB	SSa	Total	% correto
AB	10	0	10	100%
SSa	0	9	9	100%
Total	10	9	19	100%

APÊNDICE 5. Composição química dos óleos essenciais (%) dos acessos de *Lychnophora pinaster* provenientes da população AB, Carrancas, Minas Gerais, Brasil. Na tabela, destaque em **negrito** para as substâncias e classes químicas mais abundantes do óleo essencial.

Substâncias	IRc ^a	AB5	AB7	AB8	AB9	AB10	AB 1344	AB 1345	AB11	AB 1355	AB20	AB23	MÉDIA
α -pineno ^{HM}	931	0.2	0.4	0.4	0.2	0.1	1.0	0.8	0.6	0.5	1.7	tr	0.5
β -pineno ^{HM}	974	0.4	0.3	0.4	0.2	0.1	1.6	1.4	0.4	0.3	1.9	tr	0.6
limoneno ^{HM}	1026	tr	0.2	0.3	0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	0.3	0.4	tr	0.2
γ -terpineno ^{HM}	1055	tr	0.3	0.4	0.2	0.1	0.2	0.2	0.3	0.3	0.1	tr	0.2
terpinen-4-ol ^{MO}	1174	0.2	0.8	0.8	0.5	0.2	0.5	0.3	0.7	0.6	0.5	0.2	0.5
α -terpineol ^{MO}	1188	tr	tr	tr	tr	tr	0.2	tr	tr	Tr	tr	tr	tr
Z-cinamato de metila^{FP}	1301	6.1	1.1	1.5	1.1	0.4	1.2	1.8	0.6	0.6	0.4	1.6	1.5
E-cinamato de metila^{FP}	1382	69.6	85.1	79.0	78.6	79.5	78.3	69.6	62.2	68.0	65.4	58.2	72.1
E-cariofileno^{HS}	1418	9.5	6.2	9.3	9.2	11.7	8.3	14.6	12.1	18.2	15.8	13.8	11.7
α-humuleno^{HS}	1452	2.6	1.8	2.8	2.8	3.5	2.5	4.2	3.6	5.3	4.8	4.3	3.5
nd1	1550	1.2	0.2	0.4	0.3	0.2	0.5	0.5	0.3	0.4	0.5	1.3	0.5
óxido de cariofileno^{SO}	1581	4.8	1.5	2.3	3.1	2.1	2.0	3.4	1.6	2.5	3.9	9.4	3.3
Z-sesquilavandulol ^{SO}	1607	0.8	0.3	0.5	0.6	0.4	0.5	0.6	0.2	0.5	0.9	1.3	0.6
isolongifolan-7- α -ol ^{SO}	1615	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1	0.2	0.3	0.4	0.2
epóxi-alo-aromadendreno ^{SO}	1630	0.9	0.2	0.3	0.6	0.2	0.6	0.5	0.2	0.3	0.8	1.7	0.6
selina-3,11-dien-6- α -ol ^{SO}	1634	2.5	0.6	0.9	1.5	0.7	1.2	1.3	0.5	0.8	1.6	3.5	1.4
^{HM} = hidrocarboneto monoterpênico		0.6	1.2	1.5	0.8	0.4	3.1	2.6	1.5	1.4	4.1	tr	1.5
^{MO} = monoterpeneo oxigenado		0.2	0.8	0.8	0.5	0.2	0.7	0.3	0.7	0.6	0.5	0.2	0.5
^{FP} = fenilpropanóide		75.7	86.2	80.5	79.7	79.9	79.5	71.4	62.8	68.6	65.8	59.8	73.6
^{HS} = hidrocarboneto sesquiterpênico		12.1	8.0	12.1	12	15.2	10.8	18.8	15.7	23.5	20.6	18.1	15.2
^{SO} = sesquiterpeneo oxigenado		9.1	2.7	4.2	6.0	3.5	4.6	6.0	2.6	4.3	7.5	16.3	6.1
TOTAL IDENTIFICADO		97.7	98.9	99.1	99.0	99.2	98.7	99.1	83.3	98.4	98.5	94.4	96.9

^aIRc= Índice de Retenção calculado; tr: traço (tr \leq 0,04).

APÊNDICE 6. Composição química dos óleos essenciais (%) dos acessos de *Lychnophora pinaster* provenientes da população SSa, Carrancas, Minas Gerais, Brasil. Na tabela, destaque em **negrito** para as substâncias e classes químicas mais abundantes do óleo essencial.

Substância	IRc ^a	SSa2	SSa4	SSa5	SSa6	SSa7	SSa8	SSa9	SSa11	SSa12	SSa13	SSa14	SSa16	SSa17
α -pineno ^{HM}	931	1.9	0.6	0.7	0.7	2.6	1.0	0.6	0.5	1.6	2.5	0.8	1.3	1.4
β -pineno ^{HM}	974	1.9	0.5	0.8	0.6	3.4	0.8	0.9	0.8	1.9	3.6	0.7	2.1	1.8
limoneno ^{HM}	1026	0.3	0.3	0.2	0.4	0.4	0.4	tr	0.1	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3
γ -terpineno ^{HM}	1055	0.2	0.4	0.1	0.5	0.2	0.3	tr	0.1	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2
terpinen-4-ol ^{MO}	1174	0.4	0.8	0.2	0.9	0.3	0.9	0.3	0.3	0.4	0.4	0.6	0.4	0.4
α -terpineol ^{MO}	1188	0.1	tr	tr	tr	0.2	tr	tr	Tr	tr	tr	tr	tr	tr
Z-cinamato de metila ^{FP}	1301	0.5	0.4	0.4	0.1	0.3	0.6	0.3	Tr	0.5	0.2	0.3	0.4	0.4
E-cinamato de metila^{FP}	1382	80.3	82.7	84.5	82.0	79.2	78.2	75.4	87.2	81.6	74.9	80.2	74.3	83.0
E-cariofileno^{HS}	1418	8.3	8.1	7.2	8.9	7.4	10.7	8.7	3.4	7.2	11.2	9.8	13.0	7.0
α-humuleno^{HS}	1452	2.4	2.4	2.2	2.6	2.2	3.2	2.7	1.1	2.1	3.4	2.9	4.1	2.2
nd1	1550	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	tr	0.2	0.1	0.1
óxido de cariofileno^{SO}	1581	1.8	1.6	1.5	1.4	1.6	1.5	4.7	3.0	1.8	1.5	1.7	2.1	1.5
Z-sesquilavandulol ^{SO}	1607	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	1.0	0.6	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3
isolongifolan-7- α -ol ^{SO}	1615	0.1	tr	tr	tr	tr	tr	0.4	0.2	0.1	tr	0.1	0.1	tr
epóxi-alo-aromadendreno ^{SO}	1630	0.2	0.2	0.2	tr	0.1	0.2	1.2	0.6	0.2	tr	0.3	0.2	0.2
selina-3,11-dien-6- α -ol ^{SO}	1634	0.6	0.5	0.5	0.3	0.4	0.6	2.1	1.4	0.5	0.2	0.6	0.7	0.5
^{HM} = hidrocarboneto monoterpênico		4.3	1.8	1.8	2.2	6.6	2.5	1.5	1.5	4.1	6.6	2.1	3.9	3.7
^{MO} = monoterpeneo oxigenado		0.5	0.8	0.2	0.9	0.5	0.9	0.3	0.3	0.4	0.4	0.6	0.4	0.4
^{FP}= fenilpropanóide		80.8	83.1	84.9	82.1	79.5	78.8	75.7	87.2	82.1	75.1	80.5	74.7	83.4
^{HS}= hidrocarboneto sesquiterpênico		10.7	10.5	9.4	11.5	9.6	13.9	11.4	4.5	9.3	14.6	12.7	17.1	9.2
^{SO} = sesquiterpeneo oxigenado		3.1	2.6	2.5	2.0	2.4	2.7	9.4	5.8	2.9	2.0	3.1	3.5	2.5
TOTAL IDENTIFICADO		99.4	98.8	98.8	98.7	98.6	98.8	98.3	99.3	98.8	98.7	99.0	99.6	99.2

^aIRc= Índice de Retenção calculado; tr: traço (tr \leq 0,04).

APÊNDICE 6. Continuação...

Substância	IRc ^a	SSa18	SSa19	SSa23	SSa25	MÉDIA
α -pineno ^{HM}	931	0.4	2.4	1.1	0.8	1.2
β -pineno ^{HM}	974	0.7	2.8	1.2	1.3	1.5
limoneno ^{HM}	1026	tr	0.5	0.2	0.4	0.3
γ -terpineno ^{HM}	1055	tr	0.4	0.2	0.2	0.2
terpinen-4-ol ^{MO}	1174	0.3	0.8	0.3	0.3	0.5
α -terpineol ^{MO}	1188	tr	0.1	tr	tr	Tr
Z-cinamato de metila ^{FP}	1301	tr	0.3	0.5	0.2	0.3
E-cinamato de metila^{FP}	1382	86.9	76.1	76.0	83.3	80.3
E-cariofileno^{HS}	1418	3.3	9.5	11.1	7.0	8.3
α-humuleno^{HS}	1452	1.1	2.8	3.3	2.1	2.5
nd1	1550	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
óxido de cariofileno^{SO}	1581	3.0	1.9	2.6	2.2	2.1
(Z)-sesquilavandulol ^{SO}	1607	0.6	0.4	0.5	0.5	0.4
isolongifolan-7- α -ol ^{SO}	1615	0.3	tr	0.2	0.2	0.1
epóxi-alo-aromadendreno ^{SO}	1630	0.8	0.2	0.5	0.3	0.3
selina-3,11-dien-6- α -ol ^{SO}	1634	1.6	0.5	1.2	0.9	0.8
^{HM} = hidrocarboneto monoterpênico		1.1	6.1	2.7	2.7	3.2
^{MO} = monoterpeneo oxigenado		0.3	0.9	0.3	0.3	0.5
^{FP} = fenilpropanóide		86.9	76.4	76.5	83.5	80.6
^{HS} = hidrocarboneto sesquiterpênico		4.4	12.3	14.4	9.1	10.8
^{SO} = sesquiterpeneo oxigenado		6.3	3.0	5.0	4.1	3.7
TOTAL IDENTIFICADO		99.0	98.7	98.9	99.7	98.8

^aIRc= Índice de Retenção calculado; tr: traço (tr \leq 0,04).

APÊNDICE 7. Composição química dos óleos essenciais (%) dos acessos de *Lychnophora pinaster* provenientes da população OB, localizada entre os municípios de Moeda e Itabirito, Minas Gerais, Brasil. Na tabela, destaque em **negrito** para as substâncias e classes químicas mais abundantes do óleo essencial.

Substâncias	IRc ^a	OB2	OB3	OB4	OB5	OB6	OB7	OB8	OB10	OB11	OB12	OB13	OB14	OB15
α -pineno ^{HM}	930	tr	0.4	tr	0.5	tr	0.4	0.7	0.4	tr	0.3	0.5	0.6	0,6
sabineno ^{HM}	969	0.1	0.6	0.2	1.0	tr	0.6	1.2	0.4	0.1	0.6	0.6	0.8	0,7
β -pineno ^{HM}	973	0.8	0.8	0.3	1.0	tr	0.7	1.2	0.5	0.2	0.6	0.8	1.0	1,0
limoneno ^{HM}	1025	1.4	1.5	0.4	0.5	0.2	0.5	0.6	0.8	0.4	1.0	0.7	1.1	0,4
γ -terpineno ^{HM}	1055	tr	0.9	0.5	1.1	0.2	0.6	1.2	0.5	tr	0.5	0.7	1.0	0,8
linalol ^{MO}	1097	0.4	1.2	0.4	0.3	0.4	0.4	0.8	0.2	0.6	0.6	0.2	0.6	0,4
n-nonanal ^{AL}	1101	tr	0.2	0.1	tr	0.2	tr	0.2	nr	tr	nr	0.3	0.2	Tr
Z-p-mente-2-en-ol ^{MO}	1118	tr	0.2	0.3	0.5	tr	0.3	0.4	0.2	tr	0.3	0.2	0.1	0,4
terpinen-4-ol ^{MO}	1174	0.4	2.0	1.5	3.0	0.3	1.4	2.2	1.1	0.8	1.5	1.2	2.7	1,9
cipereno^{HS}	1398	4.3	2.0	1.5	0.4	0.4	1.4	3.9	1.6	2.9	0.8	3.3	6.8	4,6
E-cariofileno ^{HS}	1418	0.8	1.2	0.6	0.2	0.5	0.6	0.6	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	2,9
nd1	1448	2.5	2.6	2.5	2.3	2.9	2.4	2.6	2.9	2.6	2.5	2.8	2.4	2,6
α-humuleno^{HS}	1452	1.4	1.4	1.3	1.0	1.4	1.2	1.3	1.1	1.2	1.1	1.3	0.9	1,1
dehidro-sesquiceneol ^{SO}	1467	nr	tr	nr	tr	nr	nr	nr	0.2	nr	nr	nr	nr	nr
7-epi-1,2-dehidro-sesquiceneol ^{SO}	1475	0.3	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	tr	0,2
nd2	1483	0.1	tr	0.1	tr	tr	tr	0.2	tr	tr	tr	tr	tr	0,2
β -selineno ^{HS}	1492	2.7	2.6	2.6	2.0	2.4	2.3	2.2	2.5	2.2	2.1	2.4	1.6	1,6
viridifloreno ^{HS}	1496	0.6	0.4	0.3	0.3	0.3	0.5	0.2	0.4	0.4	0.3	0.4	0.1	tr
nd3	1511	28.0	33.5	41.1	37.3	43.3	38.6	32.5	41.7	30.4	35.7	40.7	29.7	17,9
nd4	1514	0.5	1.8	3.7	0.4	4.7	4.4	tr	tr	0.5	4.7	4.0	9.5	4,0
nd5	1519	tr	tr	0.1	0.1	tr	tr	tr	tr	tr	0.4	tr	0.6	tr
σ -cadineno ^{HS}	1521	0.1	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.2	tr	tr	0.4	tr
nd6	1535	4.8	5.6	5.7	5.4	3.9	4.5	3.9	6.5	4.7	5.3	5.8	5.1	4,2

IRc= Índice de Retenção calculado; nr: não registrado na população; tr: traço (tr \leq 0,04).

APÊNDICE 7. Continuação...

Substâncias	IRc ^a	OB2	OB3	OB4	OB5	OB6	OB7	OB8	OB10	OB11	OB12	OB13	OB14	OB15
óxido de cariofileno ^{SO}	1580	1.4	1.1	0.7	1.0	1.5	0.9	1.3	0.6	1.3	1.2	0.9	1,4	1,9
nd8	1587	nr	tr	nr	nr	0.3	tr	nr	Tr	nr	0.1	nr	0,4	tr
nd9	1603	2.2	0.9	0.9	1.0	1.1	0.8	1.7	1.2	3.0	0.6	1.6	4,1	2,9
β-atlantol ^{SO}	1611	1.2	0.4	1.2	0.4	0.9	0.7	1.0	0.2	0.6	1.5	0.6	0,9	0,6
isolongifalan-7-α-ol ^{SO}	1614	0.6	0.5	0.6	0.3	0.5	0.6	0.5	0.0	0.4	0.7	0.5	0,7	0,4
nd10	1628	nr	nr	0.2	tr	0.3	0.2	tr	Tr	0.2	0.3	0.3	0,4	0,4
nd12	1633	0.3	0.3	0.2	tr	0.4	tr	0.4	Tr	0.4	0.4	0.1	tr	0,7
cedreanol^{SO}	1648	6.5	5.9	4.6	3.8	7.9	6.4	6.1	2.7	9.8	4.5	4.3	4,6	7,4
nd13	1652	0.2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	Tr	1.5	0.2	tr	0,1	1,2
14-hidroxi-Z-cariofileno^{SO}	1663	4.0	2.9	1.3	1.7	1.9	1.6	3.0	0.8	3.0	2.4	1.5	2,4	5,9
nd14	1668	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	Nr	0.2	tr	tr	tr	0,1
nd15	1675	1.1	1.0	0.5	0.5	0.9	0.6	1.1	0.2	1.5	0.8	0.4	1,0	3,0
nd16	1682	0.6	1.4	1.8	2.4	0.5	1.4	1.4	0.2	4.6	0.4	1.5	0,4	1,9
nd17	1696	0.7	0.2	0.2	0.5	0.2	0.3	tr	0.2	0.6	tr	0.3	tr	tr
14-hidroxi-α-humulene ^{SO}	1708	1.3	1.2	0.6	0.8	0.5	0.5	0.7	0.2	1.2	0.5	0.6	0,7	1,3
2Z, 6E-farnesol ^{SO}	1720	0.1	0.8	0.8	0.8	0.5	0.5	0.5	0.2	1.6	tr	0.4	tr	0,5
nd18	1737	tr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	Nr	nr	nr	nr	nd	nd
nd19	1768	6.0	3.8	3.2	7.4	2.7	6.3	2.8	9.1	4.9	7.7	4.9	2,0	4,6
nd20	1786	2.3	0.3	0.9	0.2	3.0	1.0	6.0	1.4	0.9	0.5	0.6	1,1	1,2
nd21	1797	9.6	9.6	4.7	8.9	2.2	5.3	4.3	10.2	6.9	7.5	4.1	2,8	10,5
^{HM} = hidrocarboneto monoterpênico		2.2	4.2	1.4	4.1	0.4	2.9	4.9	2.7	0.7	3.0	3.3	4.6	3.5
^{AL} = aldeído		tr	0.2	0.1	tr	0.2	tr	0.2	Nr	tr	nr	0.3	0.2	tr
^{MO} = monoterpeno oxigenado		0.8	3.4	2.3	3.7	0.7	2.0	3.3	1.5	1.4	2.4	1.7	3.4	2.6
^{HS} = hidrocarboneto sesquiterpênico		9.8	7.5	6.3	4.0	5.1	5.9	8.2	5.8	7.5	4.8	7.9	10.2	10.2
^{SO} = sesquiterpeno oxigenado		15.4	12.8	9.9	8.9	13.8	11.5	13.2	5.1	18.0	10.9	9.0	10.7	18.3
TOTAL IDENTIFICADO		28.3	28.2	20.0	20.7	20.3	22.3	29.9	15.2	27.6	21.0	22.1	29.1	34.5

^aIRc= Índice de Retenção calculado; nr: não registrado na população; tr: traço (tr ≤ 0,04).

APÊNDICE 7. Continuação...

Substâncias	IRc ^a	OB	OB	OB	OB	OB	OB	OB2	OB	OB	OB	OB	OB	OB
		16	17	18	19	20	21	2	23	24	25	26	33	34
α -pineno ^{HM}	930	0.1	nr	0.3	tr	0.5	tr	0.4	0.1	0.3	0.4	0.8	tr	1.3
sabineno ^{HM}	969	0.4	tr	0.7	0.6	0.7	nr	0.6	0.4	0.5	0.7	0.8	0.2	1.4
β -pineno ^{HM}	973	0.7	tr	0.7	0.6	0.8	tr	0.6	0.4	0.5	0.7	1.2	0.2	1.8
limoneno ^{HM}	1025	0.6	tr	1.2	0.9	0.4	tr	0.7	0.5	0.3	0.9	1.0	0.2	1.1
γ -terpineno ^{HM}	1055	0.6	0.2	0.8	0.8	0.9	nr	0.6	0.3	0.5	0.7	1.1	0.2	1.4
linalol ^{MO}	1097	0.4	0.1	0.4	0.6	0.2	nr	0.3	tr	tr	0.5	tr	tr	0.2
n-nonanal ^{AL}	1101	tr	nr	tr	tr	tr	nr	Tr	nr	tr	0.1	tr	nr	tr
Z-p-mente-2-en-ol ^{MO}	1118	0.3	0.4	0.3	0.7	0.3	nr	Tr	tr	tr	0.2	0.4	tr	0.4
terpinen-4-ol ^{MO}	1174	0.7	2.8	2.0	3.6	2.1	0.2	1.5	0.7	1.1	2.1	3.4	0.7	3.4
cipereno^{HS}	1398	2.5	0.5	0.9	0.8	4.4	1.4	6.5	6.8	2.8	10.0	3.2	1.7	3.8
E-cariofileno ^{HS}	1418	0.3	0.3	0.4	0.4	0.7	0.2	0.7	1.3	0.6	2.5	0.4	0.5	0.6
nd1	1448	2.5	2.5	2.4	2.2	2.3	1.9	2.0	1.5	2.6	2.4	1.7	2.6	1.6
α-humuleno^{HS}	1452	0.9	1.0	1.0	1.5	1.2	0.8	0.8	1.1	1.3	1.6	0.8	1.1	0.6
dehidro-sesquicineol ^{SO}	1467	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	0.3	nr	0.4	nr	nr	nr
7-epi-1,2-dehidro-sesquicineol ^{SO}	1475	tr	0.1	tr	0.3	0.3	0.2	tr	0.3	0.2	0.5	tr	0.2	tr
nd2	1483	tr	tr	tr	tr	tr	0.2	0.2	0.3	tr	0.4	0.1	0.0	tr
β -selineno ^{HS}	1492	1.9	1.8	2.0	3.0	2.2	1.7	1.3	1.4	2.1	2.6	1.2	2.4	1.0
viridifloreno ^{HS}	1496	0.1	0.3	0.5	tr	1.3	0.3	Tr	1.0	0.3	0.5	0.4	0.4	0.4
nd3	1511	32.5	36.5	34.7	30.2	31.7	27.1	32.1	23.7	34.1	27.5	30.3	35.4	22.5
nd4	1514	tr	4.1	tr	9.6	6.1	3.9	3.7	7.7	5.0	1.1	0.2	0.0	4.7
nd5	1519	tr	0.1	tr	0.6	tr	0.2	Tr	tr	tr	1.0	tr	tr	tr
σ -cadineno ^{HS}	1521	tr	Tr	tr	tr	tr	tr	Tr	tr	tr	0.4	tr	tr	tr
nd6	1535	5.0	4.0	5.9	5.3	4.9	4.0	3.6	4.3	5.3	4.6	2.8	5.5	2.8

^aIRc= Índice de Retenção calculado; nr: não registrado na população; tr: traço (tr \leq 0,04).

APÊNDICE 7. Continuação...

Substâncias	IRc ^a	OB16	OB17	OB18	OB19	OB20	OB21	OB22	OB23	OB24	OB25	OB26	OB33	OB34
Óxido de cariofileno ^{SO}	1580	1.6	1.3	1.2	0.6	1.1	0.6	1.2	1.2	1.8	1.6	0.8	1.0	1.3
nd8	1587	nr	0.2	nr	0.3	nr	0.2	0.1	0.4	0.1	nr	nr	nd	nd
nd9	1603	2.0	0.8	0.8	0.9	2.1	0.8	2.0	1.9	1.9	2.7	1.2	1.4	1.8
β-atlantolSO	1611	1.2	1.0	1.0	1.7	1.7	2.1	0.7	1.8	0.6	0.4	0.4	0.9	0.7
isolongifalan-7-α-ol ^{SO}	1614	0.4	0.6	0.5	1.0	1.3	0.9	0.5	1.4	0.6	tr	0.3	0.3	0.7
nd10	1628	0.2	0.3	tr	0.4	0.3	0.2	0.3	0.5	0.5	tr	tr	0.2	0.3
nd12	1633	0.5	0.5	0.4	tr	tr	0.1	0.3	0.1	0.6	0.4	0.2	0.2	0.3
cedreanol^{SO}	1648	5.6	7.0	6.1	4.4	2.6	3.4	6.2	4.7	6.0	5.0	8.0	4.5	6.8
nd13	1652	tr	tr	tr	tr	nr	tr	tr	tr	0.6	tr	tr	0.3	tr
14-hidroxi-Z-cariofileno^{SO}	1663	3.0	2.4	2.4	1.3	2.2	2.1	2.6	5.0	5.3	5.5	1.8	2.4	3.5
nd14	1668	tr	tr	tr	tr	nr	tr	tr	tr	0.2	tr	tr	0.1	0.1
nd15	1675	1.0	1.0	0.8	0.3	0.3	0.2	0.6	0.4	1.2	1.2	0.5	0.8	0.9
nd16	1682	2.1	0.8	0.9	0.5	2.2	4.2	1.2	4.0	0.4	2.1	0.6	2.0	6.1
nd17	1696	0.1	0.3	0.2	0.5	0.2	0.4	0.5	0.6	0.4	0.3	0.5	tr	0.1
14-hidroxi-α-humulene ^{SO}	1708	1.1	0.7	0.7	1.0	0.9	1.0	1.0	1.9	1.4	1.3	0.9	0.6	1.4
2Z, 6E-farnesol ^{SO}	1720	0.8	0.2	0.4	0.4	0.8	1.6	0.6	1.8	0.3	0.9	0.3	0.8	2.1
nd18	1737	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	0.3	nr	nr	nr	nd	nd
nd19	1768	6.4	9.5	6.8	4.7	4.8	9.5	6.2	3.7	3.9	2.2	9.0	4.1	6.2
nd20	1786	0.6	0.7	0.5	0.4	0.9	0.7	1.1	0.9	0.1	0.1	5.1	5.9	0.7
nd21	1797	8.9	7.6	10.4	7.8	5.6	19.6	8.0	5.9	6.0	4.6	7.1	11.3	8.0
^{HM} = hidrocarboneto monoterpênico		2.4	0.2	3.7	2.8	3.3	0.0	2.9	1.7	2.0	3.5	4.8	0.8	7.0
^{AL} = Aldeído		tr	nd	tr	tr	tr	nr	tr	nr	tr	0.1	tr	nr	tr
^{MO} = monoterpêno oxigenado		1.4	3.3	2.8	4.9	2.6	0.2	1.8	0.7	1.1	2.8	3.8	0.7	4.0
^{HS} = hidrocarboneto sesquiterpênico		5.8	3.9	4.8	5.7	9.8	4.4	9.3	11.6	7.1	17.6	6.0	6.1	6.5
^{SO} = sesquiterpêno oxigenado		13.7	13.3	12.3	10.7	10.8	11.9	12.7	18.4	16.3	15.7	12.7	10.8	16.4
TOTAL IDENTIFICADO		23.3	20.6	23.7	24.0	26.5	16.5	26.8	32.3	26.5	39.7	27.3	18.3	33.8

^aIRc= Índice de Retenção calculado; nr: não registrado na população; tr: traço (tr ≤ 0,04).

APÊNDICE 7. Continuação...

Substâncias	IRc ^a	OB36	MÉDIA	Substâncias	IRc ^a	OB36	MÉDIA
α -pineno ^{HM}	930	tr	0.5	óxido de cariofileno ^{SO}	1580	0.5	1.1
sabineno ^{HM}	969	0.2	0.6	nd8	1587	0.1	0.2
β -pineno ^{HM}	973	0.3	0.7	nd9	1603	0.5	1.6
limoneno ^{HM}	1025	0.4	0.7	β -atlantol ^{SO}	1611	0.9	0.9
γ -terpineno ^{HM}	1055	0.3	0.7	isolongifalan-7- α -ol ^{SO}	1614	0.4	0.6
linalol ^{MO}	1097	0.6	0.4	nd10	1628	tr	0.3
n-nonanal ^{AL}	1101	0.1	0.2	nd12	1633	1.3	0.4
Z-p-mente-2-en-ol ^{MO}	1118	0.1	0.3	cedreanol ^{SO}	1648	7.7	5.7
terpinen-4-ol ^{MO}	1174	0.9	1.7	nd13	1652	tr	0.6
cipereno^{HS}	1398	4.0	3.1	14-hidroxi-Z-cariofileno^{SO}	1663	0.8	2.7
E-cariofileno ^{HS}	1418	2.6	0.8	nd14	1668	nr	0.1
nd1	1448	2.3	2.4	nd15	1675	0.5	0.8
α-humuleno^{HS}	1452	1.5	1.1	nd16	1682	0.1	1.7
dehidro-sesquicineol ^{SO}	1467	0.3	0.3	nd17	1696	tr	0.3
7-epi-1,2-dehidro-sesquicineol ^{SO}	1475	0.4	0.2	14-hidroxi- α -humulene ^{SO}	1708	0.3	0.9
nd2	1483	0.3	0.2	2Z, 6E-farnesol ^{SO}	1720	0.1	0.7
β -selineno ^{HS}	1492	2.9	2.1	nd18	1737	nr	0.3
viridifloreno ^{HS}	1496	0.4	0.4	nd19	1768	3.9	5.4
nd3	1511	36.9	32.8	nd20	1786	0.7	1.4
nd4	1514	4.2	3.8	nd21	1797	5.2	7.5
nd5	1519	0.4	0.4				
σ -cadineno ^{HS}	1521	0.1	0.2	^{HM} = hidrocarboneto monoterpênico		1.2	3.2
nd6	1535	4.0	4.7	^{AL} = Aldeído		0.1	0.1
				^{MO} = monoterpeneo oxigenado		1.7	2.4
				^{HS} = hidrocarboneto sesquiterpênico		11.5	7.8
				^{SO} = sesquiterpeneo oxigenado		11.4	13.1
				TOTAL IDENTIFICADO		25.9	26.7

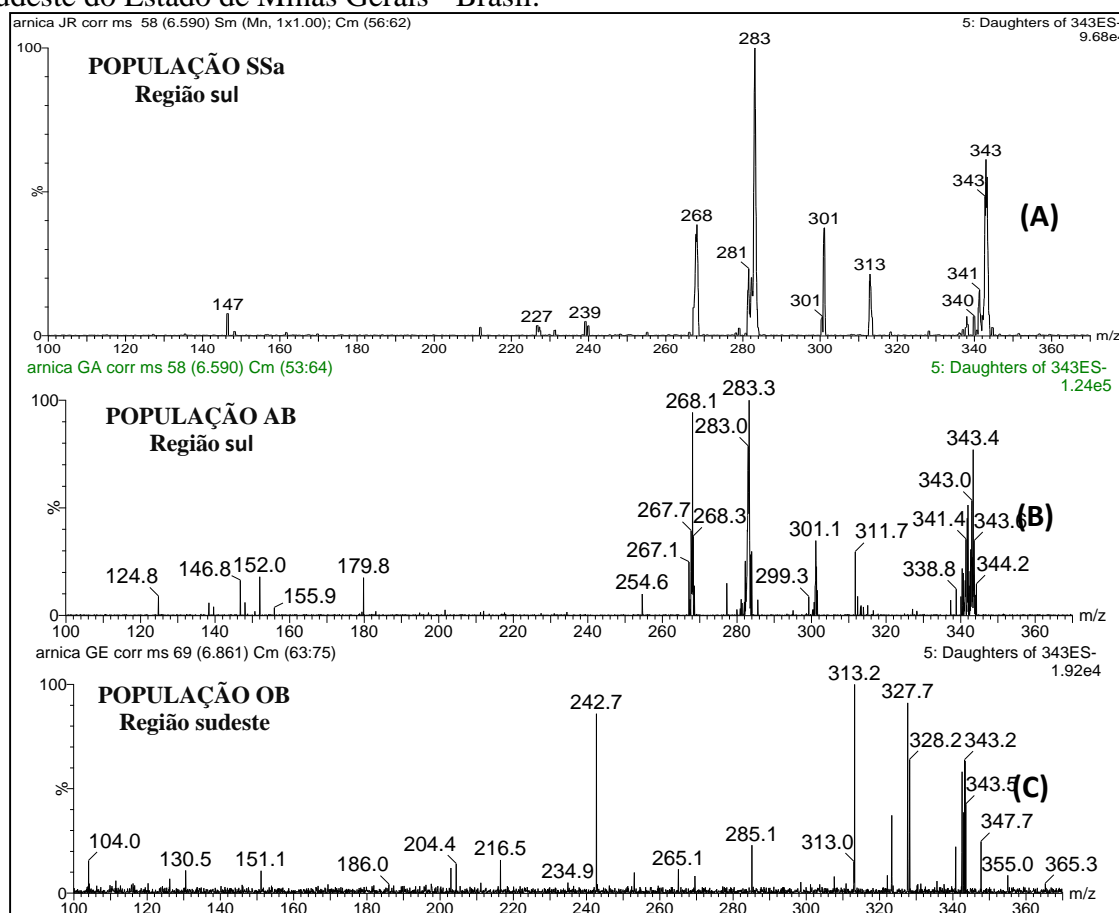
APÊNDICE 8. Matriz de confusão para classificação dos fenótipos químicos de AB, OB e SSa estimados pela DA. As populações AB e SSa são provenientes da região sul e OB é proveniente da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.

de \ a	AB	OB	SSa	Total	% correto
AB	11	0	0	11	100%
OB	0	27	0	27	100%
Ssa	0	0	17	17	100%
Total	11	27	17	55	100%

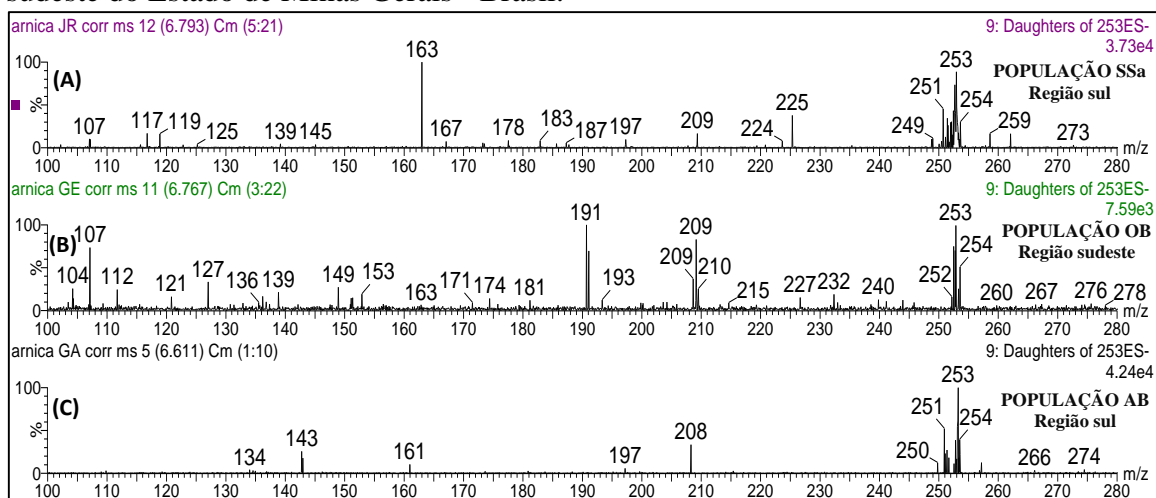
APÊNDICE 9. Matriz de confusão para classificação dos fenótipos químicos de AB e SSa estimados DA. As populações AB e SSa são provenientes da região sul do Estado de Minas Gerais - Brasil.

de \ a	AB	SSa	Total	% correto
AB	11	0	11	100%
Ssa	0	17	17	100%
Total	11	17	28	100%

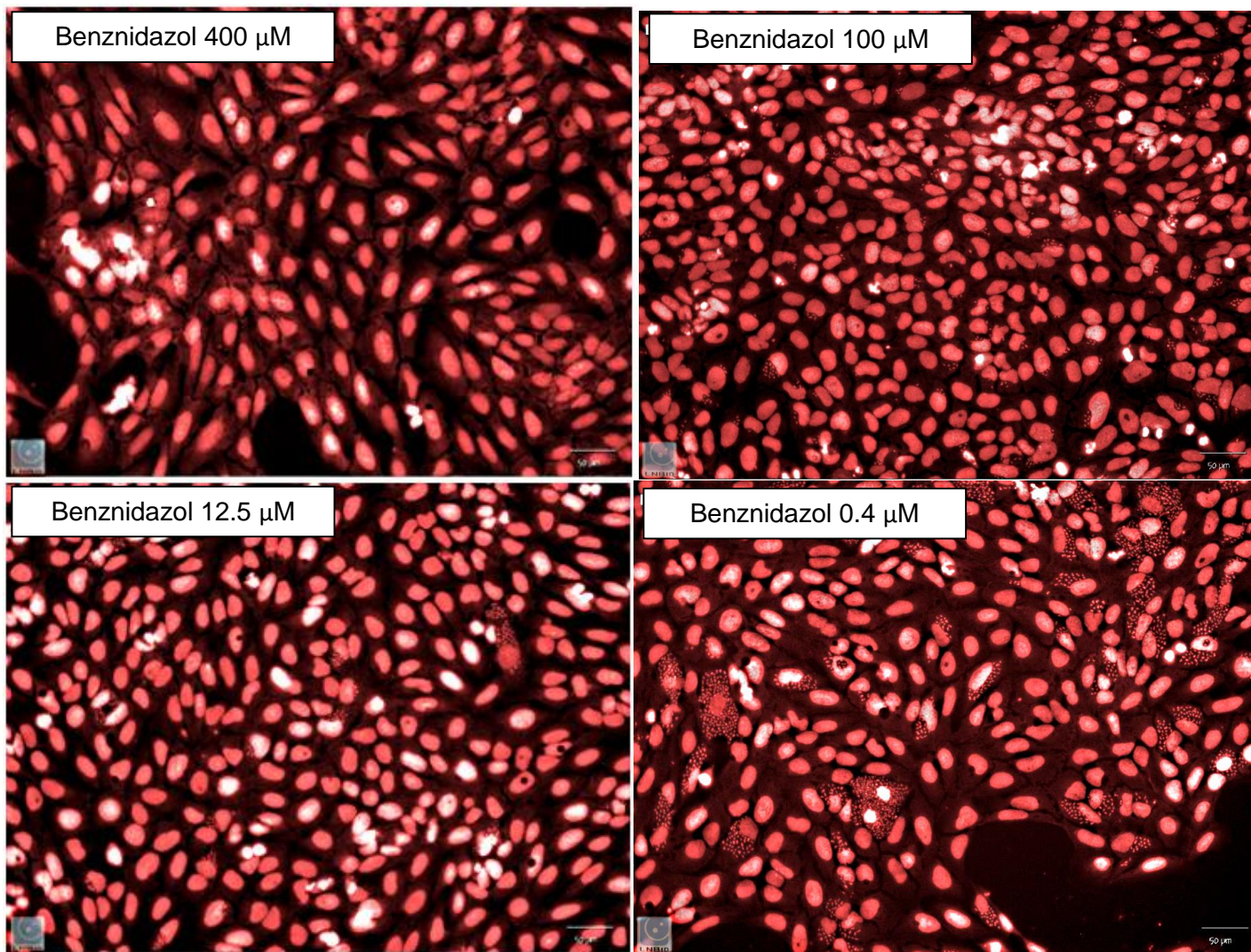
APÊNDICE 10. Espectros de fragmentação ESI(-) (MS/MS) do íon de m/z 343 encontrado nos extratos etanólicos das partes aéreas das populações de *Lychnophora pinaster* SSa (A), AB (B) e OB (C). As populações AB e SSa são provenientes da região sul e OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.



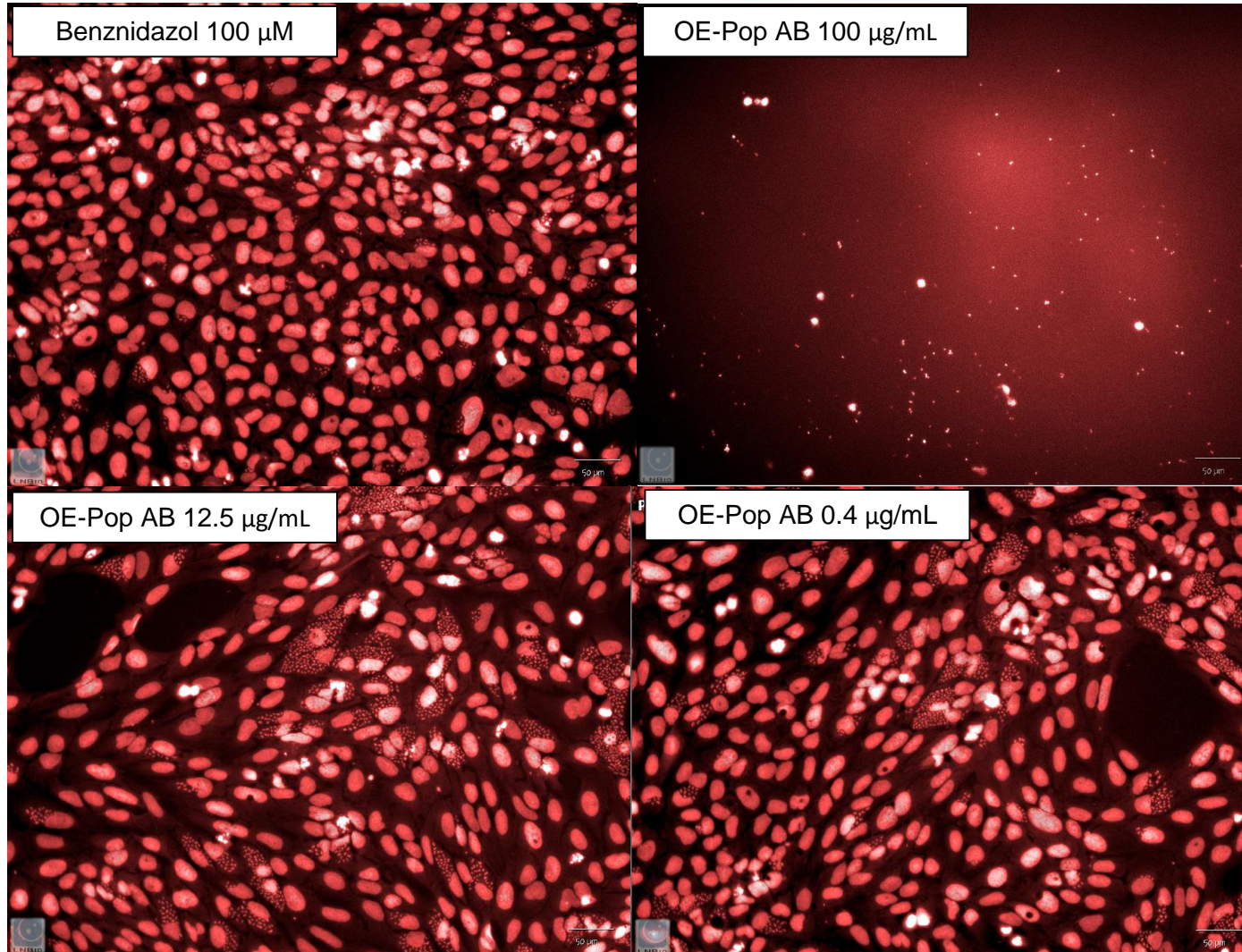
APÊNDICE 11. Espectros de fragmentação ESI(-) (MS/MS) do íon de m/z 253 encontrado nos extratos etanólicos das partes aéreas das populações de *Lychnophora pinaster* SSa (A), OB (B) e AB (C). As populações AB e SSa são provenientes da região sul e OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.



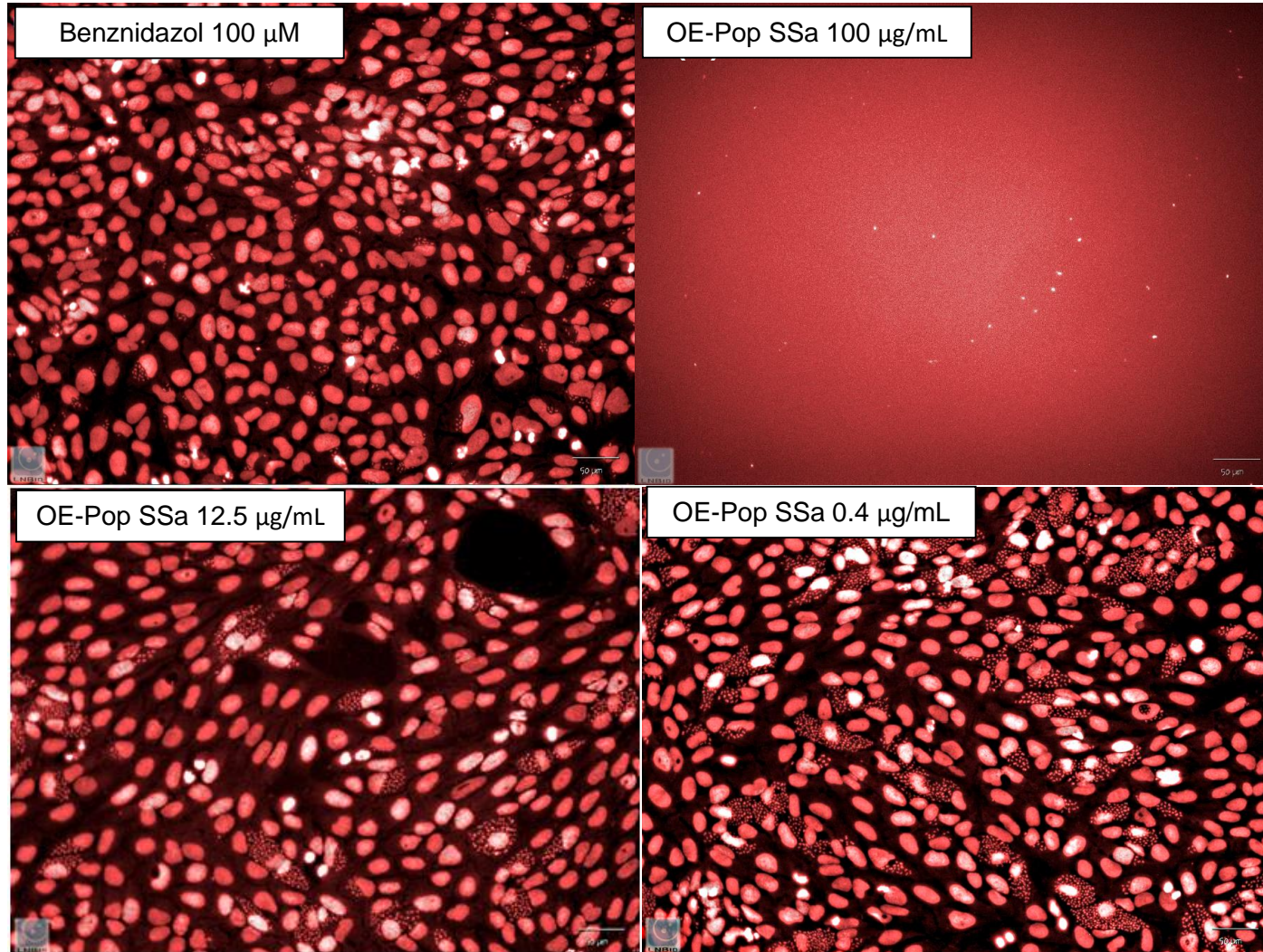
APÊNDICE 12. Células hospedeiras U2OS infectadas com *T. cruzi* tratadas com (A) 400, (B) 100, (C) 12.5 e (D) 0.4 μM do composto de referência benznidazol.



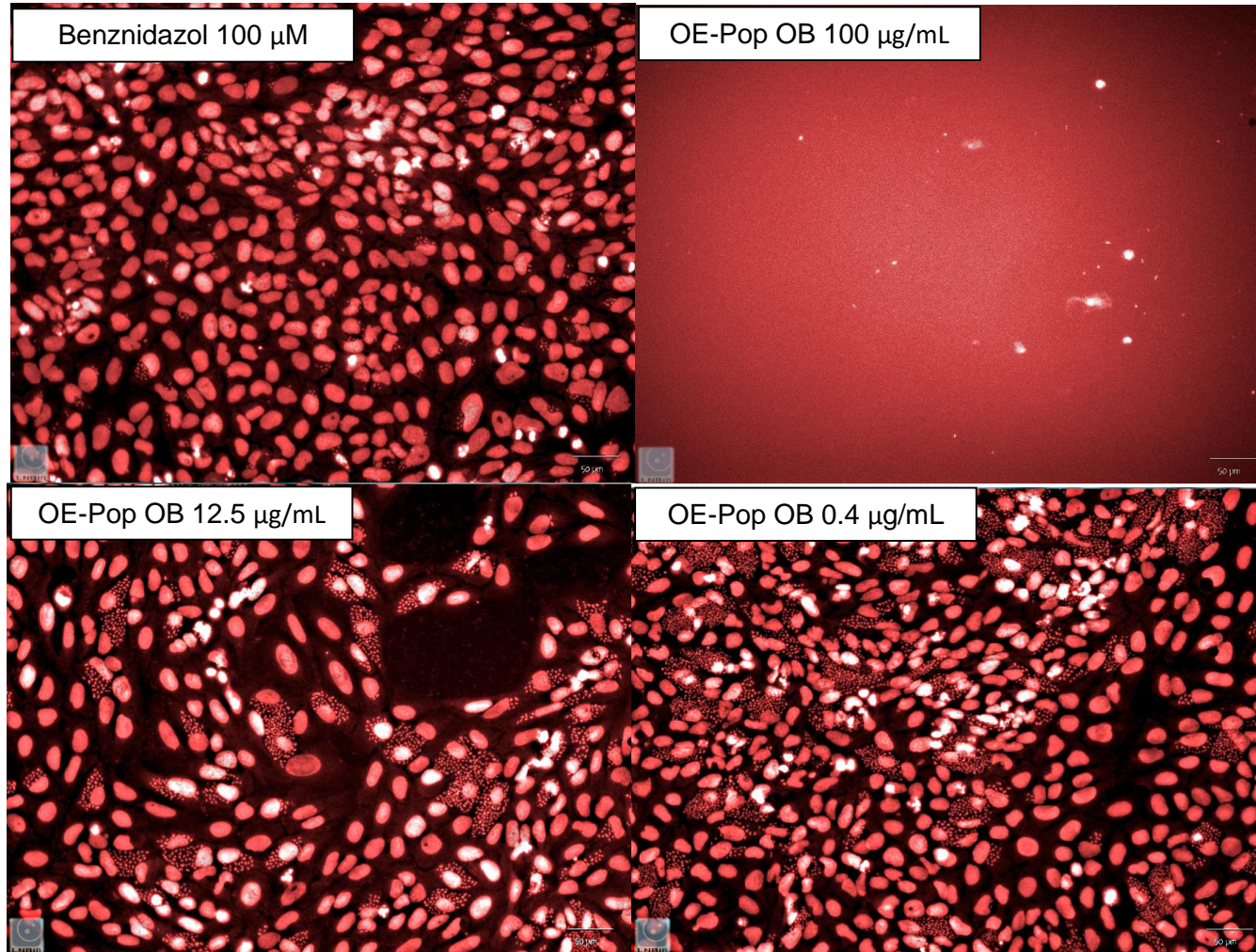
APÊNDICE 13. Células U2OS infectadas com *T. cruzi* tratadas com (A) 100 μ M de benznidazol e (B) 100, (C) 12.5 e (D) 0.4 μ g/mL do óleo essencial de AB, do sul do Estado de Minas Gerais - Brasil.



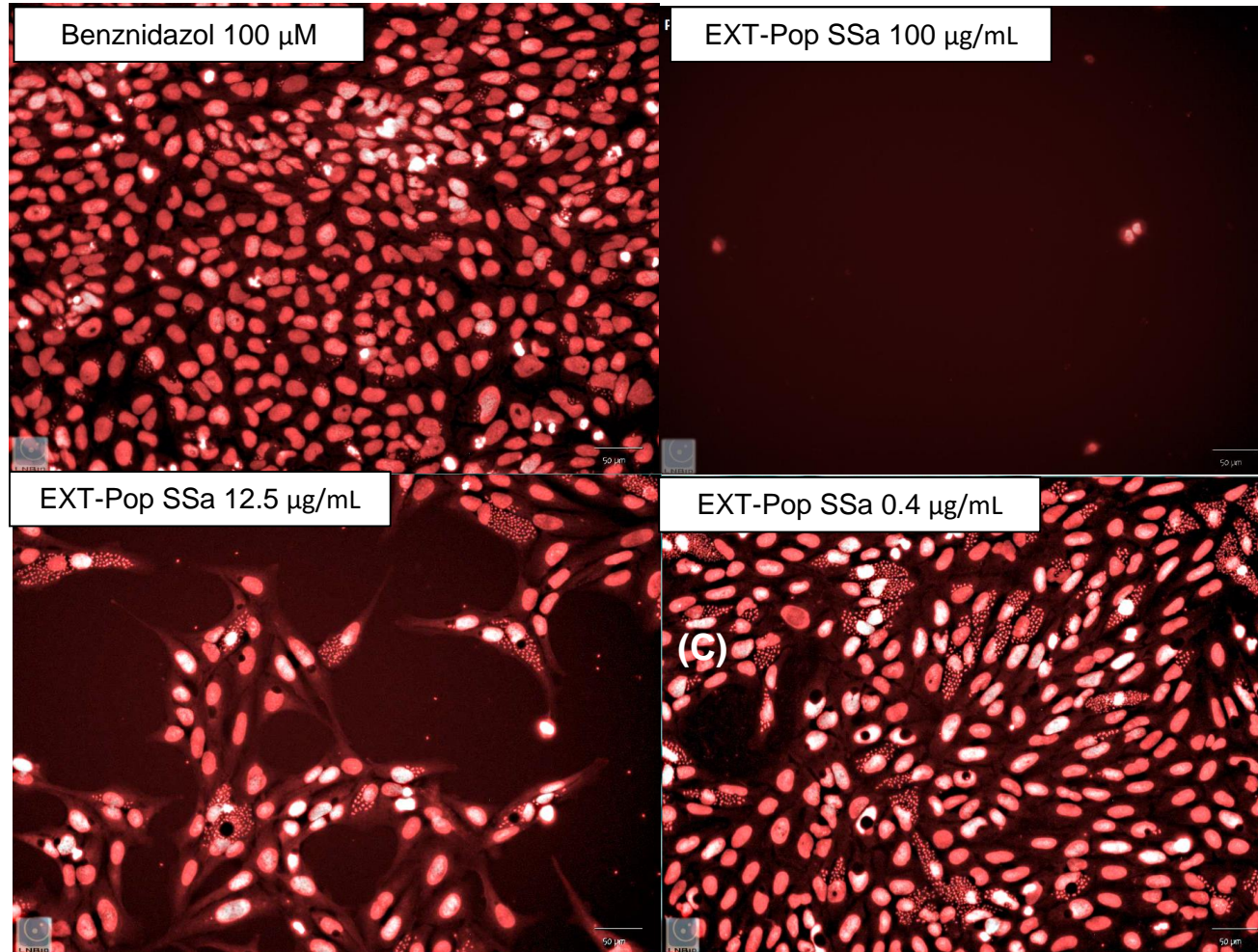
APÊNDICE 14. Células U2OS infectadas com *T. cruzi* tratadas com (A) 100 μ M de benznidazol e (B) 100, (C) 12.5 e (D) 0.4 μ g/mL do óleo essencial de SSa, do sul do Estado de Minas Gerais - Brasil.



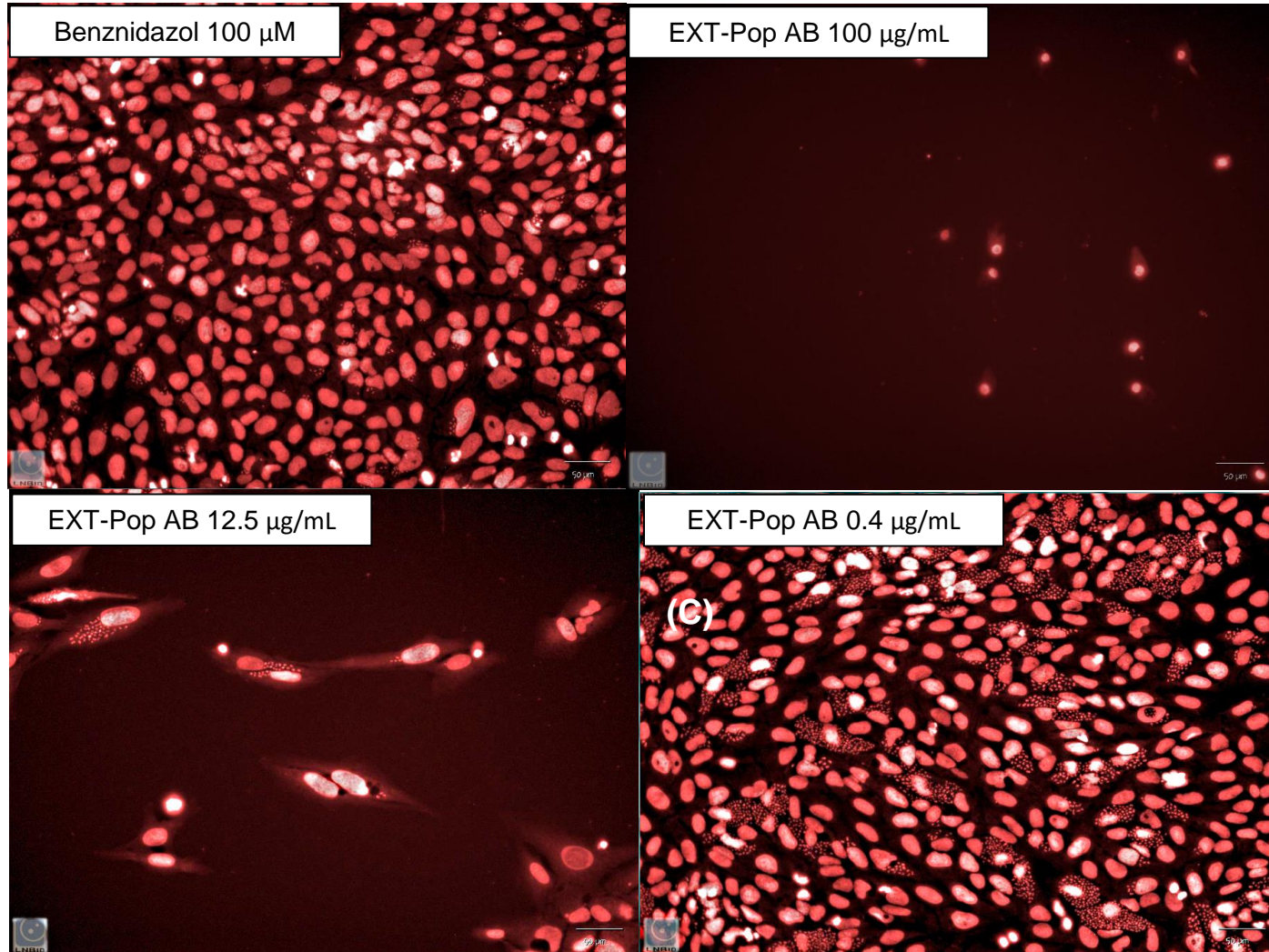
APÊNDICE 15. Células U2OS infectadas com *T. cruzi* tratadas com (A) 100 μM de benznidazol e (B) 100, (C) 12.5 e (D) 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do óleo essencial de OB, do sudste de Minas Gerais - Brasil.



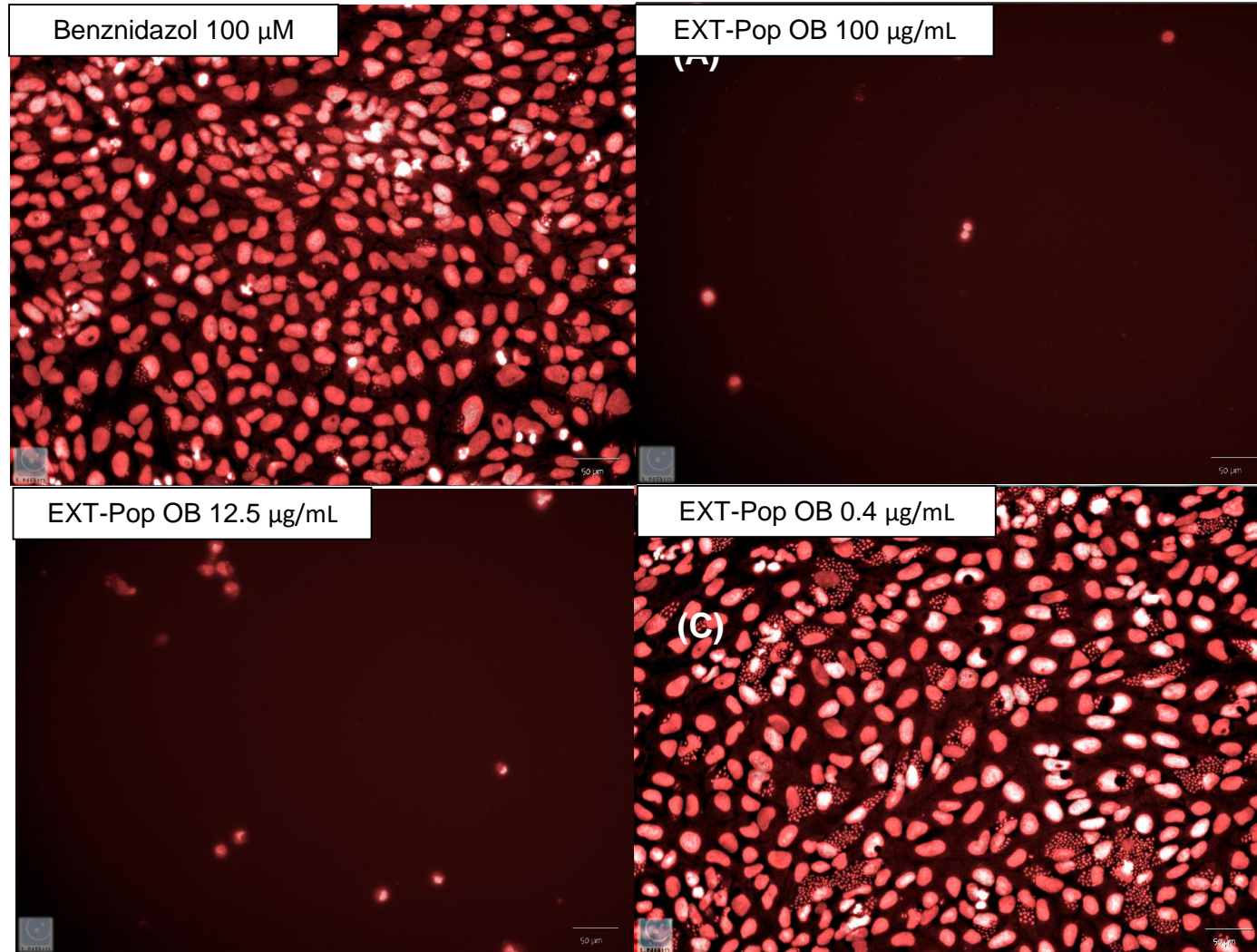
APÊNDICE 16. Células U2OS infectadas com *T. cruzi* tratadas com (A) 100 μM de benznidazol e (B) 100, (C) 12.5 e (D) 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato de SSa, do sul do Estado de Minas Gerais - Brasil.



APÊNDICE 17. Células U2OS infectadas com *T. cruzi* tratadas com (A) 100 μM de benznidazol e (B) 100, (C) 12.5 e (D) 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato de AB, do sul do Estado de Minas Gerais - Brasil.



APÊNDICE 18. Células U2OS infectadas com *T. cruzi* tratadas com (A) 100 μM de benznidazol e (B) 100, (C) 12.5 e (D) 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato de OB, do sudeste do Estado de Minas Gerais - Brasil.



ANEXO 19. Informações geográficas dos acessos de *L. pinaster* estudados.

Nº/População	Altitude (m)	Código da planta	Coordenadas					
			S		W		S	
			graus	Min	s	graus		min
1. PB	1044	1201	21	20	2,1	44	58	22,1
2. PB	1044	1202	21	20	2	44	58	22,1
3. PB	1044	1203	21	20	2,1	44	58	22
4. PB	1037	1204	21	20	2,7	44	58	22
5. PB	1038	1205	21	20	2,6	44	58	22
6. PB	1043	1206	21	20	2,6	44	58	21,7
7. PB	1035	1208	21	20	3	44	58	21,9
8. PB	1035	1209	21	20	3	44	58	21,9
9. PB	1049	1210	21	20	2,2	44	58	21,5
10. PB	1050	1211	21	20	3,7	44	58	20,6
11. PB	1050	1212	21	20	3,7	44	58	20,6
12. PB	1050	1213	21	20	3,7	44	58	20,4
13. PB	1044	1214	21	20	4,5	44	58	19,3
14. PB	1044	1215	21	20	4,5	44	58	19,3
15. PB	1041	1216	21	20	4,8	44	58	19,5
16. PB	1041	1217	21	20	4,8	44	58	19,5
17. PB	1051	1218	21	20	4,4	44	58	20,2
18. PB	1051	1219	21	20	4,4	44	58	20,3
19. PB	1046	1220	21	20	3,8	44	58	20,8
20. PB	1045	1222	21	20	4,5	44	58	18,5
21. SS	919	1301	21	21	28,7	44	51	30,9
22. SS	930	1302	21	21	28,5	44	51	30,6
23. SS	948	1303	21	21	28,5	44	51	30
24. SS	947	1305	21	21	29,4	44	51	30,9
25. SS	946	1306	21	21	29,5	44	51	31,1
26. SS	953	1307	21	21	29,7	44	51	31,5
27. SS	954	1308	21	21	29,5	44	51	31,7
28. SS	953	1309	21	21	30	44	51	32
29. SS	953	1310	21	21	29,8	44	51	32,1
30. SS	935	1311	21	21	29	44	51	30,2
31. SS	933	1312	21	21	28,8	44	51	30,1
32. SS	939	1313	21	21	28,7	44	51	29,7
33. SS	940	1314	21	21	28,7	44	51	29,5
34. SS	943	1315	21	21	28,5	44	51	29,7
35. SS	946	1316	21	21	28,3	44	51	29,6
36. SS	959	1318	21	21	28,2	44	51	29,3
37. SS	963	1319	21	21	28,2	44	51	29,2
38. SS	967	1320	21	21	28,2	44	51	28,1
39. SS	927	1321	21	21	34	44	51	35
40. SS	924	1322	21	21	34,6	44	51	34,6

*min= minutos/ s= segundos.

ANEXO 19. Continuação...

Nº/População	Altitude (m)	Código	Coordenadas					
			S			W		
			graus	min	s	graus	min	S
41. SS	924	1323	21	21	38,8	44	51	34,2
42. SS	925	1324	21	21	34,8	44	51	34
43. SS	928	1325	21	21	34,7	44	51	33,3
44. SS	928	1326	21	21	34,9	44	51	33
45. SS	933	1327	21	21	34,6	44	51	32,8
46. SS	934	1328	21	21	34,5	44	51	32,7
47. SS	935	1329	21	21	34,1	44	51	33,2
48. SS	939	1330	21	21	33,4	44	51	33,1
49. S.A	1053	301	21	26	38,9	44	55	57
50. S.A	1060	302	21	26	38,4	44	55	56,6
51. S.A	1065	303	21	26	38,9	44	55	54,6
52. S.A	1068	304	21	26	39,8	44	55	54,1
53. S.A	1071	305	21	26	41,1	44	55	53,9
54. S.A	1073	306	21	26	41,7	44	55	53,5
55. S.A	1072	307	21	26	41,5	44	55	54,1
56. S.A	1074	308	21	26	41,7	44	55	54,4
57. S.A	1065	309	21	26	39,6	44	55	55,6
58. S.A	1065	310	21	26	40,1	44	55	56,3
59. S.A	1064	311	21	26	40,3	44	55	57,8
60. S.A	1065	312	21	26	40,3	44	55	57,5
61. S.A	1050	313	21	26	39,3	44	55	1
62. S.A	1050	314	21	26	39,3	44	55	1,2
63. S.A	1051	315	21	26	38,2	44	56	1,1
64. S.A	1050	316	21	26	38	44	56	2
65. S.A	1049	317	21	26	37,9	44	56	2,2
66. S.A	1047	318	21	26	38,8	44	56	2
67. S.A	1045	319	21	26	39,2	44	56	2,1
68. S.A	1039	320	21	26	40,5	44	56	4,5
69. S.A	1041	321	21	26	40,5	44	56	4,7
70. S.A	1038	322	21	26	40,4	44	56	4,9
71. S.A	1039	323	21	26	38,4	44	56	5,4
72. S.A	1037	324	21	26	38,1	44	56	5,5
73. S.A	1041	325	21	26	38,4	44	56	4,5
74. SSa	1292	201	21	26	56,5	44	38	15,7
75. SSa	1295	202	21	26	56,4	44	38	15,4
76. SSa	1294	203	21	26	55,8	44	38	15,9
77. SSa	1295	204	21	26	55,7	44	38	16,3
78. SSa	1293	205	21	26	55,2	44	38	16,7
79. SSa	1291	206	21	26	54,9	44	38	16,9
80. SSa	1289	207	21	26	54,11	44	38	17,7

*min= minutos/ s= segundos.

ANEXO 19. Continuação...

Nº/População	Altitude (m)	Código	Coordenadas					
			S			W		
			graus	min	s	graus	Min	S
81. SSa	1293	208	21	26	55,6	44	38	17,9
82. SSa	1294	209	21	26	55,8	44	38	18,4
83. SSa	1288	210	21	26	55,1	44	38	18,6
84. SSa	1287	211	21	26	54,8	44	38	18,6
85. SSa	1288	212	21	26	55,3	44	38	19,7
86. SSa	1285	213	21	26	55,1	44	38	19,8
87. SSa	1285	214	21	26	55,1	44	38	20
88. SSa	1291	215	21	26	55,5	44	38	20,2
89. SSa	1295	216	21	26	55,8	44	38	20,3
90. SSa	1292	217	21	26	55,7	44	38	18,4
91. SSa	1292	218	21	26	55,7	44	38	18
92. SSa	1307	219	21	26	56,2	44	38	17,8
93. SSa	1310	220	21	26	56,2	44	38	17,9
94. SSa	1293	221	21	26	55,2	44	38	15,4
95. SSa	1291	222	21	26	54,8	44	38	15,6
96. SSa	1289	223	21	26	54,5	44	38	15,9
97. SSa	1292	224	21	26	54,9	44	38	15,9
98. SSa	1294	225	21	26	55,1	44	38	15,8
99. SB	1112	101	21	26	42,2	44	35	18,7
100. SB	1113	102	21	26	42,4	44	35	18,8
101. SB	1110	103	21	26	42,4	44	35	19,1
102. SB	1117	104	21	26	42,4	44	35	18,4
103. SB	908	105	21	26	42,6	44	35	18,4
104. SB	1120	106	21	26	43,1	44	35	18
105. SB	1119	107	21	26	43,4	44	35	18
106. SB	1121	108	21	26	44,6	44	35	17,6
107. SB	1121	109	21	26	44,5	44	35	17,3
108. SB	1125	110	21	26	44,5	44	35	16,4
109. SB	1126	111	21	26	44,5	44	35	16,1
110. SB	1127	112	21	26	44,5	44	35	16,1
111. SB	1126	113	21	26	46,4	44	35	15,7
112. SB	1125	114	21	26	46,6	44	35	15,7
113. SB	1126	115	21	26	46,6	44	35	15,4
114. SB	1125	116	21	26	46,7	44	35	15,3
115. SB	1127	117	21	26	46,8	44	35	14,9
116. SB	1129	118	21	26	46,7	44	35	14
117. SB	1132	119	21	26	46,7	44	35	13,6
118. SB	1135	120	21	26	47,3	44	35	13,1
119. SB	1134	121	21	26	47,5	44	35	13,2
120. SB	1131	122	21	26	47,6	44	35	13,3

*min= minutos/ s= segundos.

ANEXO 19. Continuação...

Nº/População	Altitude (m)	Código	Coordenadas					
			S			W		
			graus	min	s	graus	min	S
121. SB	1128	123	21	26	47,8	44	35	13,7
122. SB	1126	124	21	26	48,1	44	35	13,9
123. SB	1125	125	21	26	48,1	44	35	14,1
124. OB	1223	401	21	20	18,3	43	35	29,9
125. OB	1223	402	21	20	18,4	43	35	29,9
126. OB	1226	403	20	20	19	43	55	30,2
127. OB	1227	404	20	20	19	43	55	30,5
128. OB	1229	405	20	20	18,7	43	55	31,3
129. OB	1234	406	20	20	18,9	43	55	31,8
130. OB	1236	407	20	20	18,2	43	55	32,6
131. OB	1237	408	20	20	18,5	43	55	32,8
132. OB	1238	409	20	20	18,4	43	55	33
133. OB	1238	410	20	20	18,4	43	55	33,1
134. OB	1239	411	20	20	18,4	43	55	33,2
135. OB	1240	412	20	20	18,7	43	55	33,2
136. OB	1242	413	20	20	19	43	55	33,3
137. OB	1243	414	20	20	19,4	43	55	33
138. OB	1243	415	20	20	19,6	43	55	33
139. OB	1243	416	20	20	19,9	43	55	33,4
140. OB	1243	417	20	20	20,2	43	55	33,3
141. OB	1243	418	20	20	20,2	43	55	33,3
142. OB	1244	419	20	20	20,5	43	55	33,5
143. OB	1245	420	20	20	20,6	43	55	33,5
144. OB	1259	421	20	20	22,4	43	55	37,1
145. OB	1238	422	20	20	22,1	43	55	37,4
146. OB	1263	423	20	20	21,7	43	55	37,9
147. OB	1263	425	20	20	21,7	43	55	38,1
148. OB	1248	426	20	20	22	43	55	34,7
149. OB	1246	427	20	20	21,8	43	55	34,1
150. OB	1244	428	20	20	22,7	43	55	33,4
151. OB	1243	429	20	20	22,6	43	55	33,3
152. OB	1239	430	20	20	22,3	43	55	32,8
153. OB	1232	431	20	20	21,2	43	55	30,7
154. OB	1232	432	20	20	21,3	43	55	30,7
155. OB	1232	433	20	20	21,3	43	55	30,81
156. OB	1227	434	20	20	20,4	43	55	30,2
157. OB	1227	435	20	20	20,4	43	55	30,3
158. OB	1224	436	20	20	19,9	43	55	28,9
159. OB	1225	437	20	20	20	43	55	29,1
160. OB	1225	438	20	20	20	43	55	29,4

*min= minutos/ s= segundos.

ANEXO 19. Continuação...

Nº/População	Altitude (m)	Código	Coordenadas					
			S			W		
			graus	min	s	graus	min	S
161. OB	1221	440	20	20	19,2	43	55	28,4
162. AB	1138	1331	21	27	26	44	35	50,3
163. AB	1138	1332	21	27	26,1	44	35	50,2
164. AB	1140	1333	21	27	25,6	44	35	49,9
165. AB	1140	1334	21	27	25,6	44	35	49,7
166. AB	1143	1335	21	27	25,1	44	35	49,3
167. AB	1141	1336	21	27	25,4	44	35	49,7
168. AB	1144	1337	21	27	25,1	44	35	49,1
169. AB	1145	1338	21	27	25	44	35	49
170. AB	1146	1339	21	27	25,1	44	35	48,7
171. AB	1150	1340	21	27	24,9	44	35	47,7
172. AB	1142	1350	21	27	26,1	44	35	48,8
173. AB	1136	1341	21	27	26,7	44	35	50,1
174. AB	1138	1342	21	27	26,6	44	35	49,3
175. AB	1138	1343	21	27	26,6	44	35	49
176. AB	1138	1344	21	27	27,1	44	35	48,6
177. AB	1143	1346	21	27	26,3	44	35	48,4
178. AB	1143	1347	21	27	26,1	44	35	48,3
179. AB	1142	1348	21	27	26,1	44	35	48,7
180. AB	1141	1349	21	27	26,2	44	35	48,8
181. AB	1138	1351	21	27	27	44	35	49
182. AB	1142	1352	21	27	25,9	44	35	48,6
183. AB	1143	1353	21	27	26	44	35	48,2
184. AB	1144	1356	21	27	26,7	44	35	47,8
185. AB	1145	1357	21	27	26	44	35	47,8
186. AB	1137	1358	21	27	26,9	44	35	48,7

*min= minutos/ s= segundos.