



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



DIVERSIDADE QUÍMICA E GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Lychnophora pinaster* MART.

ANA PAULA DA SILVA MARQUES

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção de título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Fisiologia do Metabolismo Vegetal.

BOTUCATU – SP

-2020-



unesp

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**DIVERSIDADE QUÍMICA E GENÉTICA DE POPULAÇÕES
NATURAIS DE *Lychnophora pinaster* MART**

ANA PAULA DA SILVA MARQUES

ORIENTADORA: DR^a MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

CO-ORIENTADOR: DR. FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção de título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Fisiologia do Metabolismo Vegetal.

BOTUCATU – SP

-2020-

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Marques, Ana Paula da Silva.

Diversidade química e genética de populações naturais de
Lychnophora pinaster Mart. / Ana Paula da Silva Marques. -
Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Marcia Ortiz Mayo Marques
Coorientador: Filipe Pereira Giardini Bonfim
Capes: 20300000

1. Genética de populações. 2. Essências e óleos essenciais
- Uso terapêutico. 3. Plantas medicinais. 4. Metabólitos.

Palavras-chave: Genética de populações; Metabólitos
especializados; Óleos essenciais; Plantas medicinais.

Primeiramente, dedico o meu trabalho à minha família, meu pai Ari, minha mãe Ana Maria, minhas irmãs Ana Claudia e Ana Tereza, e ao meu noivo Gean.

Sem vocês nada disso teria sido possível. Meu coração é todo de vocês.

Não menos importante, dedico esse trabalho a toda egrégora espiritual que tem sido meu suporte e estrutura hoje e sempre. A espiritualidade é perfeita e vive no mais puro amor quem nela faz sua morada.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço pelo auxílio financeiro a mim concedido no formato de bolsa, pois sem a mesma esse trabalho não seria possível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro na forma de recursos (FAPESP nº processo 2017/24927-7) que possibilitaram a execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) pela oportunidade de aperfeiçoamento e aprendizado profissional.

Ao Instituto Agrônomo (IAC) pela experiência profissional oferecida e pelo suporte estrutural para que esses experimentos fossem realizados.

À Profª Drª Marcia Ortiz Mayo Marques pela expansão dos meus horizontes profissionais através da lição de busca constante de melhoria de qualidade de trabalho, melhoria no crivo profissional, pelo conhecimento compartilhado, suporte oferecido durante a realização deste trabalho e pelas lições que vão além do laboratório. À senhora, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Filipe Pereira Giardini Bonfim pelo auxílio constante em nossas atividades profissionais em parceria, pela sua disposição em ajudar e pelo aprendizado constante que sempre me oferece junto com sua mão amiga. Muito obrigada.

A Drª Maria Imaculada Zucchi por todo o aprendizado, ajuda, parceria e por ser luz durante meus momentos de dificuldade ao adentrar uma área científica nova.

Ao Prof. José Baldin Pinheiro pela ajuda e suporte estrutural que permitiram a realização de experimentos deste trabalho.

Ao Prof. Leandro Wang Hanto pela parceria, conhecimento e oportunidade de me aprofundar no universo da química dos óleos essenciais.

Ao Prof. Ronei Jesus Poppi pela parceria, conhecimento partilhado e auxílio em importantes momentos nesse trabalho e de nossa produção científica conjunta.

Ao Dr. Carlos Eduardo de Araújo Batista, à Dr^a Carolina Grando e ao Dr. Erick Maurício Goes Cordeiro pelo auxílio e parceria nas diversas etapas dos experimentos genéticos. Muito obrigada por toda ajuda, amizade e aprendizado.

Às técnicas e amigas Daniela e Lilian, do IAC, pelo companheirismo e auxílio em diversas etapas de meus experimentos.

Aos amigos e parceiros nos desafios de vida acadêmica: Dayane, Letícia, Jordany, Júlio, Roberto e Juliana.

À minha amada família, minha avó Lúcia, meu pai Ariovaldo, minha mãe Ana Maria, minhas irmãs Ana Tereza e Ana Claudia. O amor, a doação pessoal, o apoio e o incentivo vindo de vocês foram o combustível para a realização de todas as conquistas da minha vida. Amo vocês!

Ao meu noivo Geanderson por seu amor, amizade, cuidado, apoio e por sua força guerreira que me revitaliza e empurra na busca de algo maior e melhor sem esmorecimento em todos os dias de nossas vidas. Amo você!

Aos meus amigos Aline, Marcelo, Maria, Denis, Daniela, Alexandre, Selia, Vinícius, Ricardo e July pela amizade e carinho compartilhados.

Por último, mas de nenhuma forma menos importante, aos sagrados Orixás, aos Guias, à Yalorixá Raquel Barbosa de Yemanjá, à Mãe Pequena Patrícia Mazin de Yansã e todos os meus irmãos de fé do Templo de Umbanda Pai Oxalá (TUPO) por todo o amor, carinho, aprendizado e suporte oferecidos durante todo esse período. Meu crescimento pessoal e profissional esteve diretamente atrelado aos trabalhos caritativos realizados no TUPO. Obrigada por me ensinarem a buscar ininterruptamente ser uma pessoa melhor, não aceitar minhas desculpas para minhas falhas, por me ampararem para que eu não caísse ou por me ajudarem a me reenguer nos meus momentos de queda. Axé!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE SIGLAS.....	IV
I. INTRODUÇÃO GERAL.....	5
<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.....	5
Metabolismo vegetal especializado.....	10
Óleos essenciais de <i>Lychnophora pinaster</i> Mart.....	11
Atividades biológicas de <i>L.pinaster</i> Mart.....	12
Diversidade genética.....	14
Marcadores moleculares.....	15
Marcador molecular <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> e sequenciamento de nova geração....	15
II. OBJETIVOS.....	17
III. CAPÍTULO 1 - Diversidade química e genética de populações naturais de	
<i>Lychnophora pinaster</i> Mart. de diferentes ambientes.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1. Material vegetal.....	20
2.2. Condições edafoclimáticas dos locais de coleta das populações.....	23
2.3. Caracterização da diversidade genética.....	23
2.4. Óleos essenciais.....	25
2.4.1. Extração e rendimento dos óleos essenciais.....	25

2.4.2. Análise da composição química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa unidimensional (CG).....	25
2.5. Identificação de substâncias por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H) e Carbono-13 (RMN ¹³ C).....	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
3.1 Condições edafoclimáticas dos locais de coletas das regiões norte, metropolitana de Belo Horizonte e Campos das Vertentes.....	27
3.1.1. Temperatura no período de coleta.....	27
3.1.2. Características dos solos das populações.....	28
3.2.Rendimento do óleo essencial das populações.....	32
3.3.Caracterização dos óleos essenciais de <i>L. pinaster</i>	34
3.4.Composição química intrapopulacional dos óleos essenciais de <i>L. pinaster</i>	39
3.5.Características dos solos <i>versus</i> composição química dos óleos essenciais.....	40
3.6.Análises quimiométricas dos óleos essenciais.....	47
3.6.1. Análises de correlação.....	47
3.6.2. Análise de componentes principais.....	51
3.7.Análises genéticas de populações de <i>L. pinaster</i> Mart. oriundas de diferentes regiões do estado de Minas Gerais.....	54
3.7.1. Diversidade e estrutura genômica das populações.....	55
3.7.2. Diversidade da composição química dos óleos essenciais <i>versus</i> diversidade genética das populações de <i>Lychnophora pinaster</i> Mart. das diferentes regiões.....	62
4. CONCLUSÕES.....	63
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
6. APÊNDICES.....	75
IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	109

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Locais de coleta, código das populações, coordenadas geográficas e estudos realizados com as populações naturais <i>Lychnophora pinaster</i> , Minas Gerais, Brasil.....	21
Tabela 2 - Rendimento médio de óleo essencial das populações de <i>L.pinaster</i> , Minas Gerais, Brasil, 2017.....	32
Tabela 3 – Composição química média (%) dos óleos essenciais de populações de <i>L. pinaster</i> , Minas Gerais, Brasil, 2017.....	34
Tabela 4 – Número de amostras de DNA de indivíduos de <i>Lychnophora pinaster</i> Mart de diferentes regiões do estado de Minas Gerais sequenciadas e selecionadas após filtragem.....	54
Tabela 5 – Estimativa dos índices de diversidade genética obtidos para as nove populações de <i>L.pinaster</i> . Em negrito, estão os valores extremos, menores e maiores.....	55

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura I – Imagens de *L. pinaster*, Minas Gerais, 2019. Marques, 2019. (A) Espécime de *L. pinaster* Mart. da região norte do estado de Minas Gerais, (B) Em detalhe, inflorescência de *L. pinaster*.....6
- Figura II – Imagens de indivíduos de *L. pinaster*, Minas Gerais, 2017. (A) 0,8 m; (B) 2,10 m ;(C) 3,0 m, Minas Gerais, Brasil. Fonte: Santos, D. G. P.O., 2017.....8
- Figura 1** - (A) Locais de coleta das populações naturais de *L. pinaster* Mart, no estado de Minas Gerais, Brasil, no ano de 2017. (B) Distâncias entre os pontos de coleta na região norte (GM, DIMa e OD). (C) Distâncias entre os pontos de coleta na região metropolitana de Belo Horizonte (CTRA, NLSC e SM). (D) Distâncias entre os pontos de coleta na região de Campos das Vertentes (AB, SA e SS).....21
- Figura 2** – Temperaturas máximas e mínimas dos locais de coleta das populações de *L. Mart.*, Minas Gerais, Brasil, 2017. (A) Dados de Grão Mogol e Diamantina/Olhos D’Água, região norte do estado. (B) Dados de Nova Lima, Moeda e Rio Acima, região metropolitana de Belo Horizonte.....28
- Figura 3** – Análise de componentes principais das variáveis químicas, macro e micronutrientes, e físicas dos solos das áreas de coleta das populações de *L. pinaster* Mart.....31
- Figura 4** - Gráfico de *scores* (A) e de variáveis (B) da análise discriminante de populações de *L. pinaster* Mart. em função da composição de óleo essencial e das características químicas e físicas dos solos. Detalhe em amarelo, o centróide de cada população e sua elipse de confiança.....42
- Figura 5** – *Heatmap* dos compostos dos óleos essenciais em função das populações de *L. pinaster*. OD = Olhos D’Água, DIM^a = Dimantina, NLSC = Nova Lima/Serra da Calçada, SM = Serra da Moeda, CTRA = Caeté/Rio Acima, GM = Grão Mogol.....48
- Figura 6** – *Heatmap* resultante da análise de correlação dos compostos presentes no óleo essencial das populações de *L. pinaster*.....49
- Figura 7** – *Scores* das amostras de óleos essenciais das populações de *L. pinaster* de diferentes regiões do estado de Minas Gerais, Brasil, 2017.....52

Figura 8– *Heatmap* e dendograma em função dos valores de F_{ST} par-a-par entre as populações de *L.pinaster*. Região Norte= GM, DIMa e OD; Região Metropolitana de Belo Horizonte = NLSC, CTRA e SM e Campos das Vertentes = AB, SA e SS.....57

Figura 9– Análise de componentes principais a partir dos SNPs encontrados entre as nove populações de *L.pinaster*. Região Norte= GM, DIMa e OD; Região Metropolitana de Belo Horizonte = NLSC, CTRA e SM e Campos das Vertentes = AB, SA e SS.....58

Figura 10 – Análise discriminante de componentes principais a partir dos SNPs encontrados entre as nove populações de *L.pinaster*. Região Norte= GM, DIMa e OD; Região Metropolitana de Belo Horizonte = NLSC, CTRA e SM e Campos das Vertentes= AB, SA e SS.....59

Figura 11 – Atribuição Bayesiana de 127 indivíduos de *L.pinaster* em *clusters* genéticos via STRUCTURE. Números romanos correspondem aos *clusters* formados pelas populações. Região Norte = GM, OD e DIMa; Região Metropolitana de Belo Horizonte = CTRA, NLSC e SM; Campos das Vertentes = AB, SA e SS.....59

Figura 12 – Análise de isolamento por distância via teste de Mantel entre as populações de *L. pinaster*.....61

LISTA DE SIGLAS

ACP- Análise de Componentes Principais

ADCP – Análise Discriminante de Componentes Principais

AHA- Análise Hierárquica de Agrupamento

CC – Coeficiente de correlação

CG-DIC- Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CP- Componente Principal

CTRA- Caeté/Rio Acima

DIMa- Diamantina

ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

GM – Grão Mogol

NLSC- Nova Lima/Serra da Calçada

OD- Olhos D’Água

RMBH – Região Metropolitana de Belo Horizonte

RN – Região Norte

SM- Serra da Moeda

UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

MARQUES, A.P.S. DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Lychnophora pinaster* MART. 2020. 110p. Defesa de Tese (Doutorado) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU

RESUMO – *Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae) é uma espécie de ocorrência restrita ao Estado de Minas Gerais e utilizada pela população local por suas propriedades anti-inflamatória e analgésica. O uso indiscriminado pela população e destruição de seu *habitat* contribuíram para que a espécie entrasse em risco de extinção. Estudos de populações de *L. pinaster* oriundas do sul e do norte do estado de Minas Gerais reportam diferentes composições de seus óleos essenciais e níveis de diversidade genética, sendo necessários estudos de maior abrangência geográfica que permitam sua caracterização em diversas regiões do estado. Diante disso, este estudo objetivou avaliar a composição química dos óleos essenciais e diversidade genética de populações de *Lychnophora pinaster* Mart. coletadas em diferentes regiões de Minas Gerais. As populações avaliadas nos estudos químicos são oriundas de duas regiões: Diamantina (DIMa), Olhos D'Água (OD) e Grão Mogol (GM), da região Norte de Minas Gerais; e três da Região Metropolitana de Belo Horizonte, Caeté/Rio Acima (CTRA), Nova Lima/Serra da Calçada (NLSC) e Serra da Moeda (SM). Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, a composição química analisada por CG-EM e CGxCG-EM e os resultados avaliados por métodos quimiométricos. Análises de solos revelaram diferenças entre os solos das populações. DIMa e SM apresentaram os maiores rendimentos dos óleos essenciais (ambas 0,12%), enquanto o menor foi o de NLSC (0,04%). Não foi detectada diferença de rendimento em função da região. Os óleos essenciais apresentaram divergência na composição química em função da população. Para a região norte, dentre as substâncias majoritárias estão o α -pineno (12%) GM; 14-acetoxi- α -humuleno, (21,9%) para DIMa e 14-hidroxi-4,5-dehidro-cariofileno e esquamulosa (9,13% e 8,30%, respectivamente) para OD. Para a Região Metropolitana de Belo Horizonte as substâncias com maior abundância foram; 1,7-diepi- α -cedrenal (6,46%), (Z)-nerolidol (12,60%) em CTRA. Entre regiões, o 14-hidroxi- α -humuleno também foi majoritário para GM (35,95%), DIMa (13,39%) e NLSC (56,33%). DIMa, OD e NLSC se mostraram próximas quimicamente, apesar de pertencerem a diferentes regiões do estado, distantes em 273km. As populações GM, SM e CTRA não demonstraram similaridade química entre si ou com as demais. Estes resultados, em conjunto com os da literatura, sugerem a ocorrência de quimiotipos em função da região e entre populações. As análises genéticas demonstram que as populações de *L. pinaster* apresentaram déficit de heterozigotos, com exceção de AB, para qual as heterozigosidades esperada e observada foram iguais. As análises de componentes

principais e discriminante resultaram em um agrupamento genético das populações em função da região. A distância geográfica e a endogamia nas populações apresentaram efeito sobre as distâncias genéticas encontradas, contribuindo para seu aumento. As populações não exibiram um padrão de agrupamento em função da região e se mostraram estruturadas, com Campos das Vertentes formando um único grupo e exibindo compartilhamento dos SNPs somente entre si. A região metropolitana de Belo Horizonte não apresentou agrupamento das populações, permanecendo isoladas entre si, enquanto na região norte formaram-se dois grupos, um de GM e OD e outro de DIMa. Os resultados encontrados para as análises genéticas vão ao encontro das características químicas dos óleos essenciais das populações.

Palavras-chave: óleos essenciais, genética de populações, plantas medicinais, metabólitos especializados

MARQUES, A.P.S. GENETIC AND CHEMICAL DIVERSITY OF NATURAL POPULATIONS OF *Lychnophora pinaster* MART. 2020. 110p. Thesis Defense (Doctorate) - BOTUCATU BIOCENCIAS INSTITUTE, UNESP - PAULISTA STATE UNIVERSITY, BOTUCATU

ABSTRACT - *Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae) is a species restricted to the State of Minas Gerais and used by the local population for its anti-inflammatory and analgesic properties. The indiscriminate use by the population and the destruction of its habitat contributed to the species becoming at risk of extinction. Studies of *L. pinaster* populations from the south and north of the state report different compositions of their essential oils and levels of genetic diversity, requiring studies of greater geographic scope that allow their characterization in several regions of the state. Given this scenario, this study aimed to evaluate the chemical composition of essential oils and genetic diversity of populations of *Lychnophora pinaster* Mart. collected in different regions of Minas Gerais. The populations evaluated in the chemical studies come from two regions: Diamantina (DIMa), Olhos D'Água (OD) and Grão Mogol (GM), from the northern region of Minas Gerais; and three from the Metropolitan Region of Belo Horizonte, Caeté/Rio Acima (CTRA), Nova Lima/Serra da Calçada (NLSC) and Serra da Moeda (SM). The essential oils were extracted by hydrodistillation, the chemical composition analyzed by CG-EM and CGxCG-EM and the results evaluated by chemometric methods. Soil analyzes revealed differences between the populations' soils. DIMa and SM showed the highest yields of essential oils (both 0.12%), while the lowest was that of NLSC (0.04%). No difference in yield was detected depending on the region. Essential oils differ in chemical composition depending on the population. For the northern region, major substances include α -pinene (12%) GM; 14-acetoxy- α -humulene, (21.9%) for DIMa and 14-hydroxy-4,5-dehydro-karyophyllene and squamulosone (9.13% and 8.30%, respectively) for OD. For the Metropolitan Region of Belo Horizonte, the most abundant substances were; 1,7-diepi- α -cedrenal (6.46%), (Z)-nerolidol (12.60%) in CTRA. Among regions, 14-hydroxy- α -humulene was also the majority for GM (35.95%), DIMa (13.39%) and NLSC (56.33%). DIMa, OD and NLSC were shown to be chemically close, despite belonging to different regions of the state, 273km apart. The GM, SM and CTRA populations did not show chemical similarity to each other or to the others. These results, together with those in the literature, suggest the occurrence of chemotypes depending on the region and between populations. Genetic analyzes demonstrates that *L. pinaster* populations showed a deficit of heterozygotes, with the exception of AB, for which the expected and observed heterozygosities were equal. The principal component and discriminant analyzes resulted in a genetic grouping of populations according to the region. Geographic distance

and inbreeding in populations had an effect on the genetic distances found, contributing to its increase. The populations did not exhibit a pattern of grouping according to the region and were shown to be structured, with Campos das Vertentes forming a single group and exhibiting SNPs sharing only among themselves. The metropolitan region of Belo Horizonte did not present a group of populations, remaining isolated from each other, while in the northern region two groups were formed, one of GM and OD and the other of DIMa. The results found for the genetic analyzes are in agreement with the chemical characteristics of the essential oils of the populations.

Keywords: essential oils, population genetics, medicinal plants, specialized metabolites

I. INTRODUÇÃO GERAL

O consumo de plantas visando melhoria de saúde e qualidade de vida é intrínseco à história evolutiva da espécie humana e tem sido perpetuado até a atualidade. A utilização de plantas medicinais com fins profiláticos, curativos e paliativos foi reconhecida internacionalmente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1978, ano em que iniciou um trabalho de estímulo de difusão mundial dos conhecimentos acerca do tema e incentivo aos Estados membros para integrar ou inserir a medicina tradicional em seus sistemas de saúde, caso do Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil. No ano de 2006 foi aprovada no Brasil a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS, que incluiu, em caráter complementar, a medicina tradicional chinesa, plantas medicinais e fitoterápicos no sistema de atendimento à saúde (BRASIL, 2006; BRASIL, 2012).

No Brasil, o domínio fitogeográfico do Cerrado cobre uma área de aproximadamente 2 milhões de km², menor somente que a floresta tropical Amazônica (MELO Jr. *et al*, 2012). Muitas espécies vegetais do Cerrado possuem forte importância cultural, econômica e medicinal. Por possuir rica biodiversidade e excepcional quantidade de espécies endêmicas ameaçadas, é um hotspot mundial que merece atenção prioritária para conservação (STRASSBURG *et al*. 2017). Nesse ambiente, suas espécies estão sujeitas à alterações de relevo e a condições edafoclimáticas diversas, como solo e clima secos, variações extremas de temperatura e de oferta de água. A atuação destas forças ambientais pode levar ao surgimento ou manutenção de adaptações e ocorrência de endemismo. Endemismo este que é característico na flora presente em campos rupestres, de forma que a conservação e estudo de suas espécies são prioritários (SEMIR, 1991; GIULIETTI, PIRANO, 1988). Dentre as espécies presentes em campos rupestres se encontram as do gênero *Lychnophora* (Asteraceae), pertencente à tribo Vernonieae, presente nos estados da Bahia, Goiás e Minas Gerais (SEMIR, 2011).

***Lychnophora pinaster* Mart.**

Dentre os gêneros pertencentes à família botânica Asteraceae se encontra o *Lychnophora* (tribo Vernonieae, subtribo Lychnophorinae), nativo do Cerrado brasileiro e que conta com 68 espécies divididas em seis seções: *Lychnophora*, *Lychnophoriopsis*, *Lychnophorioides*, *Lychnocephaliopsis*, *Sphaeranthus* e *Chronopappus*. Ocorre nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (SEMIR, 1991).

Estudos demonstram a atividade anti-inflamatória, antipirética, antitumoral, antinociceptiva, antioxidante, anticonvulsante e antimicrobiana (tripanocida) para várias espécies do gênero, sendo suas partes aéreas e raízes utilizadas na medicina popular em preparados hidroalcoólicos de administração oral ou tópica, por seus efeitos no combate a dores e no tratamento de feridas, hematomas, inflamações e reumatismo (CAPELARI-OLIVEIRA *et al.*, 2011; TALEB-CONTINI *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2014; ABREU *et al.*, 2013). Suas propriedades são atribuídas às lactonas sesquiterpênicas e derivados de ácidos cafeoilquínicos, extraídos a partir de suas folhas e raízes (ABREU *et al.*, 2013). O gênero se destaca pela diversidade estrutural de seus constituintes químicos, dos quais mais de 250 compostos foram isolados (HEBEDA *et al.*, 2011).

Lychnophora pinaster Mart. (Figura 1) é espécie endêmica às fitofisionomias dos campos rupestres e campos de canga de Minas Gerais (SEMIR, 2011) e de grande importância medicinal regional apresentando elevado potencial fitoterápico e aromático. Os campos de cangas são afloramentos rochosos oriundos de intemperismos de rochas ferríferas subjacentes (itabiritos e diamictitos ferruginosos) e posterior enriquecimento de ferro, que formam couraças de dezenas de metros de profundidade em áreas de milhares de hectares, onde habitam dezenas de espécies raras. Estes campos se localizam majoritariamente no estado de Minas Gerais, dentro do Quadrilátero Ferrífero e ao leste da Cadeia do Espinhaço, se distribuindo como ilhas nas porções mais altas do relevo. As vegetações associadas a estes campos costumam ser denominadas como campos ferruginosos, vegetação ou savana metalófila ou vegetação de bancada laterítica, mas não há um consenso sobre sua nomenclatura (CARMO, JACOBI; 2013).



Figura I – Imagens de *L. pinaster*, Minas Gerais, 2019. Marques, 2019. (A) Espécime de *L. pinaster* Mart. da região norte do estado de Minas Gerais, (B) Em detalhe, inflorescência de *L. pinaster*.

Semir (1991), em estudo taxonômico do gênero *Lychnophora*, reportou as seguintes regiões de ocorrência de *L. pinaster*: Barbacena, Belo Horizonte, Belo Vale, Itabirito, Betim, Biribiri, Brumadinho, Cachoeira do Campo, Campos, Caraça, Carrancas, Catas Altas, Chapada Diamantina, Cidade de Minas, Congonhas do Campo, Gandarela, Grão Mogol, Itabira, Itabirito, Itamarandiba, Itumirim, Jardim Nossa Senhora das Graças, Lavras, Lavras Novas, Lavrinha, Mariana, Miguel Burner, Nova Lima, Santa Bárbara, Santa Rita, São Julião, Serra do Ouro Branco, Serra da Caraça, Serra das Carrancas, Serra de Curral d'El Rey, Serra do Curral, Serra d'Itabira do Campo, Serra do Itacolimi, Serra da Lapa, Serra de Lavras Novas, Serra do Mesquita, Serra da Moeda, Serra do Palmital, Serra da Piedade, Serra do Rola Moça e entre Virgem da Lapa, Campo Alegre e Serra do Cipó.

Os indivíduos de *Lychnophora pinaster* se apresentam na forma de subarbustos eretos ramificados, pequenos arbustos ericoides e, mais raramente, como arbustos mais altos, variando entre 0,4 a 2,4m, porém chegando a atingir 3,6 m (Figura 2). Suas folhas podem se apresentar muito imbricadas e ascendentes na parte superior dos ramos e mais patentes até pouco reflexas nas partes inferiores. Suas folhas variam entre as formas: linear, linear oblonga, rosmarinióide e ericóide, sendo ocasionalmente longa e linear em forma de fita. Sua base foliar vai de arredondada a auriculada, ligeiramente atenuada, de ápice obtuso a pouco arredondado ou pouco agudo (raro), margem revoluta, venação broquidódroma, face adaxial intensamente tomentosa canescente, nervura principal subvilosa quando jovem, subglabrescente permanecendo pouco pubérula até totalmente glabra quando velha. A textura de suas folhas pode ser muito rugosa e bulada, às vezes quase lisa. A nervura principal é alargada e vai afinando da base para o ápice. A face abaxial é tomentosa, com tricomas subvilosos e tomentosos cobrindo todas as nervuras, com a principal subquadrática, que é não alada e sulcada (SEMIR, 1991).



Figura II – Imagens de indivíduos de *L. pinaster*, Minas Gerais, 2017. (A) 0,8 m; (B) 2,10 m ;(C) 3,0 m, Minas Gerais, Brasil. Fonte: Santos, D. G. P.O., 2017.

Quanto aos aspectos vegetativos, reprodutivos e dispersão dos frutos, *L. pinaster* apresenta características fenológicas sazonais em função de variações climáticas, com floração entre meses de agosto a outubro e dispersão dos frutos entre dezembro, janeiro e fevereiro (SILVA, 1998), considerada época mais provável para coleta dos frutos. Seus aquênios se encontram em subcapítulos de capítulos com papus internos e externos como estrutura de dispersão (SEMIR, 1991)

Segundo Isobe (2012), *L. pinaster* apresenta caracteres anatômicos foliares xeromórficos como cutícula grossa, folhas hipoestomáticas e alta densidade de tricomas tectores. As folhas jovens e adultas apresentam indumento formado por tricomas tectores ramificados e glandulares capitados em ambas as faces, distribuídos aleatoriamente pela superfície foliar, com maior densidade em folhas jovens. As folhas são hipoestomáticas com estômatos se apresentando acima do nível das demais células. A epiderme é uniestratificada, o mesofilo é compacto dorsiventral e os feixes vasculares são colaterais. Na epiderme da face adaxial, as células são quadrangulares e volumosas, recobertas por cutícula bastante espessa, enquanto na abaxial são achatadas, menos volumosas, com cutícula delgada. Os tricomas glandulares são bisseriados, compostos por 10 células (duas basais, seis no pedúnculo e duas formando a cabeça secretora, apresentando cutícula delgada). Testes histoquímicos confirmaram a natureza lipofílica da secreção, em consonância com as análises químicas do estudo. Tricomas

glandulares diferiram em função da face ou do estágio de desenvolvimento da folha. Na face adaxial em folhas jovens se mostram totalmente desenvolvidos, ativos em secreção, geralmente com a cutícula distendida, enquanto na face abaxial são menores e aparentemente em fases iniciais do desenvolvimento. Os tricomas glandulares na face abaxial de folhas adultas exibem atividade secretora (amplo espaço subcuticular contendo secreção) e os da face adaxial são, em maioria, tricomas com cutícula rompida, indicando término da atividade secretora.

Quanto à propagação da espécie, Haber (2008) avaliou a produção de mudas produzidas vegetativamente, a partir de quatro populações de *L. pinaster* de diferentes localidades de Minas Gerais (Antena, Estrada Real, Estrada Real 1 e Poço Bonito). Na produção das estacas, seus caules foram mantidos por 24 horas em solução de ácido indolbutírico (IBA) a 300mL^{-1} , sem aeração, posteriormente cultivadas em bandeja, apresentando bom enraizamento, e depois transplantadas a campo, contando com 174 mudas da população Antena, 95 da Estrada Real, 92 de Poço Bonito e 89 da Estrada Real 1.

Para a propagação via sementes, Melo (2014) registrou baixos resultados de germinação (máximo de 7,88%) sob diferentes faixas de temperatura, com destaque para os aquênios em estágio maduro, sem papus interno nos aquênios, sob incidência de luz (sementes fotoblásticas positivas preferenciais) submetidos a temperatura entre 20-30°C. Em estudo da morfologia interna das sementes, o autor descreveu que os aquênios considerados “cheios” (cavidade do aquênio totalmente ocupada pela semente) apresentaram maior porcentagem média de germinação e maior massa média (MELO, 2009).

A espécie também foi alvo de estudo de propagação *in vitro*, em estudo realizado por Souza (2007), obtendo sucesso de propagação. A multiplicação dos indivíduos de *L. pinaster* ocorreu com o uso de baixas concentrações de ácido indolbutírico para induzir a formação de múltiplos brotos em aquênios. Para estímulo do enraizamento foi utilizado ácido naftalenacético sobre segmentos nodais das raízes. Quando em ponto de transplante, as mudas que foram plantadas em solo retirado da área natural de ocorrência da espécie apresentaram 100% de sobrevivência, enquanto as transplantadas para substrato comercial não sobreviveram (mortalidade de 100%).

Metabolismo vegetal especializado

Metabólitos especializados, também conhecidos como secundários, são moléculas orgânicas extremamente diversificadas sintetizadas por plantas, algas, fungos, bactérias. São classificados de acordo com a sua origem e a produção destas diferentes classes de substâncias é frequentemente associada a conjuntos de espécies dentro de grupos filogenéticos. Seus compostos, como terpenos (voláteis, carotenóides, glicosídeos cardíacos e esteróis), compostos fenólicos (ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, ligninas, taninos e lignanas) e alcalóides, são reportados como bioativos e estão presentes em diversos medicamentos, corantes, especiarias e alimentos tidos como funcionais (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2012).

Terpenos são compostos formados a partir de unidades precursoras de cinco átomos de carbonos (C5), o difosfato de isopentenila (PP) ou seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP) derivados da via do mevalonato no citosol (MEV) e da via do 2-metileritritol fosfato (MEP) nos plastídeos, respectivamente. A união das unidades precursoras C5 originam o prenil difosfato, difosfato de geranila, difosfato de farnesila e difosfato de geranilgeranila, que são subsequentemente convertidos em monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos pela ação das enzimas terpenos sintases (ZHANG *et al.*, 2019).

Na via do mevalonato, duas moléculas de acetilcoenzima A (acetil-CoA) são condensadas em acetoacetil-CoA pela enzima acetil-CoA acetiltransferase, posteriormente se incorporando uma terceira molécula de acetil-CoA, formando assim 3-hidroximetilglutaril-CoA. Após esta última reação ocorrem a fosforilação e descarboxilação catalisadas pelas enzimas mevalonato quinase, fosfomevalonato quinase e difosfomevalonato descarboxilase. Dessa forma, mevalonato é convertido em IPP, que pode ser então isomerizado em DMAPP pela isopentenil difosfato isomerase. Enzimas terpeno sintases funcionalmente distintas e citocromo P450 monooxigenase são as maiores direcionadoras na formação estrutural e modificações funcionais dos terpenos. As enzimas terpenos sintases são responsáveis pelas vias espécies-específicas dos terpenóides, catalisando cascatas de carbocilação estereo-específicas que transformam substratos comuns IPP em esqueletos essenciais que possibilitam a geração de grupos de terpenos estruturalmente distintos (WANG *et al.*, 2019).

Apesar da produção de metabólitos especializados ser controlada geneticamente e epigeneticamente, os estímulos ambientais (bióticos e abióticos) recebidos pelo vegetal influenciam na quantidade, qualidade e concentração destes. Estas variações se dão por processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

A luz tem efeito promotor da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase, assim como a limitação de luz pode alterar os transcritos desta enzima, como visto em *Arabidopsis thaliana*. A regulação também ocorre em função de ataques herbívoras e fatores abióticos, controlada por uma complexa cascata metabólica, onde o hormônio jasmonato tem importante papel. Outros tipos de modulação na produção de terpenos ocorrem, como em função do nível de atividade da proteína fosfatase A. Compostos do metabolismo vegetal, como os hormônios jasmonato, metil jasmonato e ácido jasmônico favorecem a biossíntese de terpenóides (SINGH, SHARMA; 2015).

Terpenos são utilizados na área farmacêutica e cosmética, nutricional e na agricultura, devido à sua atividade biológica de efeito antimicrobiano, repelente, analgésico, anti-inflamatório, entre outras (MATOS *et al.*, 2019). Ecologicamente, terpenos são responsáveis pela modulação de diversas interações entre o vegetal e o ambiente. Além de contribuir na regulação do crescimento e desenvolvimento, atuar na atração de polinizadores, criar barreiras químicas e físicas contra herbivoria e auxiliar na termotolerância (BUTLER *et al.*, 2018).

A diversidade de produtos das vias de terpenos se deve aos diferentes tipos de enzimas terpenos sintases existentes, que são atualmente classificadas em sete subfamílias (TPS-a, -b, -c, -d, -e/-f, -g e -h). O número de terpenos sintases identificadas por espécie varia em função do genoma analisado: *Arabidopsis* apresentou 32, *Vitis vinifera* apresentou 69, enquanto *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Populus trichocarpa*, *Solanum moellendorffii* e *S. lycopersicum* contaram com 34, 24, 32, 14 e 44 TPSs identificadas, respectivamente (JIANG *et al.*, 2019).

Óleos essenciais de *Lychnophora pinaster* Mart.

A variação intraespecífica nos perfis químicos relacionados ao metabolismo especializado costuma ser quantitativa e sugere que múltiplos fatores regulam estas vias, influenciando especialmente quando no processo de herbivoria, auxiliando na sobrevivência de indivíduos (PADOVAN *et al.*, 2017).

O mapeamento dos perfis químicos dos óleos essenciais de *L. pinaster* foi realizado por Haber (2008) com populações naturais de ocorrência na região sul do estado de Minas Gerais (denominadas: Poço Bonito, Estrada Real, Estrada Real 1 e Antena), onde as populações Poço Bonito, Estrada Real e Estrada Real 1 apresentaram como substância majoritária o (*E*)-cinamato de metila (entre 61% a 82% do óleo essencial) e o cedr-8(15)-en-9-alfa-ol (25,2%) para a população Antena. Em seu estudo, os

mesmos genótipos, obtidos por propagação vegetativa, foram cultivados em Botucatu-SP. Os óleos essenciais das populações cultivadas foram avaliados em três estações do ano: inverno, verão e outono. A composição química dos óleos essenciais para as três populações apresentou o (*E*)-cinamato de metila como substância majoritária. O fato que chamou a atenção foi à alteração da substância majoritária no óleo essencial dos indivíduos da população Antena, haja visto que, no óleo essencial das plantas nativas, o principal componente foi o cedr-8-(15)-en-9-ol, substância pertencente à classe dos terpenos, enquanto que no óleo essencial das plantas cultivadas foi o (*E*)-cinamato de metila, substância pertencente à classe dos fenilpropanóides.

Isobe (2012) e Silva (2013) avaliaram a influência da sazonalidade na composição química dos óleos essenciais de populações naturais de *L. pinaster* de ocorrência na região sul de Minas Gerais (municípios: Lavras, Itumirim, Carrancas e Ingaí). As substâncias mais abundantes nos óleos essenciais para todas as populações foram o (*E*)-cinamato de metila (variando de 57 % a 80%) e (*E*)-cariofileno (3% a 18%), independente da estação do ano. Os óleos essenciais dos indivíduos apresentaram composição química divergente dentro e entre as populações.

De forma similar, Silva (2016), ao analisar os óleos essenciais de duas populações do sul (Carrancas) e uma do sudeste de Minas Gerais (Itabirito), constatou como componente majoritário o (*E*)-cinamato de metila (70% nos óleos essenciais) para as populações do sul e ausência desta substância na população do sudeste, com predomínio de sesquiterpenos para esta população. As populações estudadas pelo autor são pertencentes à duas fitofisionomias distintas, a população da região sudeste cresce sobre campo rupestre ferruginoso e as populações da região sul em campo rupestre. A temperatura (máxima e mínima) e precipitação das duas regiões de coleta foram monitoradas no período de dois meses que antecederam à coleta do material vegetal e efetuada a análise da composição química dos solos. Constatou-se similaridade nas temperaturas entre as duas regiões de origem, maior precipitação para a região sul (229 mm) e menor para a sudeste (59 mm) e significativa divergência do solo da região sudeste em relação ao sul, com maiores teores de matéria orgânica, ferro, manganês, cálcio para a região sudeste. O estudo permitiu inferir que a divergência na composição química dos óleos essenciais pode estar relacionada ao fator ambiental.

Atividades biológicas de *L. pinaster* Mart.

Ferreira (2010) avaliou a atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato de *L. pinaster* coletada em campos rupestres de Nova Lima (MG) e constatou a presença de fenilpropanóides,

flavonóides, antraquinonas, terpenóides e saponinas. No teste farmacológico com camundongos como modelo, observou efeito anti-inflamatório e sedação sem prejuízo motor e sugeriu que, com maiores estudos, o extrato de *L. pinaster* poderá ser uma alternativa de insumo na produção de medicamentos.

A atividade anti-inflamatória do extrato da espécie também foi registrada por Pinheiro (2010), onde preparados de emulgel contendo extrato de *L. pinaster* a 2% e 5% apresentaram maior atividade anti-inflamatória do que o medicamento Cataflam®. A autora sugere que a formulação de 2% de concentração poderia ser produzida em escala industrial, pelo baixo custo e eficiência.

Dos princípios ativos tripanocidas (15-deoxi-goiazensolido, ácido cafeico, ácido isoclorogênico, vitexina, isovitexina, ácido *E*-lichnofórico), antibacteriano (15-deoxi-goiazensolido), anti-inflamatórios (α -amirina, quercetina, estigmasterol, sitosterol, friedelina), analgésico e antipirético (friedelina) descritos na literatura para *L. pinaster* (CHIARI *et al.*, 1991; DUARTE *et al.*, 1993; SILVEIRA *et al.*, 2005; ALCÂNTARA *et al.*, 2005; ABREU *et al.*, 2011; ABREU *et al.*, 2013) e monitorados por Silva (2016) nos extratos etanólicos das duas populações de *L. pinaster* do sul (Carrancas) e do sudeste de Minas Gerais (Itabirito) por meio da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, somente a quercetina e friedelina, foram identificados em comum nos extratos das populações estudadas.

Os óleos essenciais e os extratos de *L. pinaster* avaliados por Silva (2016) não apresentaram atividade antiparasitária *in vitro* equivalente ou superior ao composto de referência, benzidazol (utilizado no tratamento da doença de Chagas), para as formas amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*. Os óleos essenciais e extratos etanólicos apresentaram citotoxicidade para as células hospedeiras (infectadas ou não infectadas).

Em estudo de populações de *L. pinaster* da região de Itumirim (MG), Resende (2013) reportou como componente majoritário o (*E*)-cinamato de metila, (62,1%). Outras substâncias encontradas foram o (*E*)-cariofileno (21,1%), α -humuleno (6,2%), óxido de cariofileno (2,2%) e os monoterpenos α e β -pineno (3,1% e 4,6%, respectivamente). Ao avaliar a atividade biológica do óleo essencial, reportou atividade inibitória contra a bactéria *Salmonella choleraesuis*, atividade fungicida contra *Aspergillus niger*, *A. flavus* e *A. carbonarius* (neste último também registrou uma queda na produção de ocratoxina), além da baixa atividade hemolítica do óleo essencial.

Logo, observa-se que a espécie apresenta potencial para prospecção de medicamentos baseados em seus óleos essenciais e extratos vegetais.

Diversidade genética

Dada à ação humana de destruição e fragmentação de habitats, há um aumento no risco de extinção de espécies ameaçadas, pois estão frequentemente associadas a pequenas populações isoladas. Assim, se faz importante o estudo genético de populações, que pode exercer um papel fundamental na conservação das mesmas (LEE *et al.*, 2018).

Análise de diversidade genética pode ser definida como um conjunto de medidas quantitativas da variabilidade populacional que refletem sobre o equilíbrio entre mutação e a variação de perda genética. A diversidade genética e sua distribuição, dentro ou dentre populações, pode ser determinada por micro-processos como história demográfica das populações, seleção natural e fluxo gênico, e podem ser estimadas por seus índices e estruturação. Marcadores moleculares nos permitem acessar essa variabilidade nos acessos estudados, possibilitando detectar a variação de alelos em características de interesse (CARVALHO *et al.*, 2019).

Haber (2008), em pesquisa de diversidade genética de três populações de *L. pinaster* do sul de Minas Gerais, registrou que as heterozigosidades observadas (H_o) foram menores que as heterozigosidades esperadas (H_E), o que também foi relatado por Vieira (2014) para outras populações. O estudo detectou grande variação genética entre as três populações, sendo que mais de 50% dos locos avaliados não se encontravam no equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando a existência de endogamia nas populações, o que também foi sugerido pelo índice de fixação médio da espécie.

Silva (2016) caracterizou a diversidade genética de seis populações de *L. pinaster* do sul e uma da região sudeste do estado de Minas Gerais (Poço Bonito, Serra do Sofá, Serra da Arnica, Serra do Salto, Serra Branca, Areia Branca e Ouro Branco), reportando que a população de Ouro Branco, a mais distante das demais (cerca de 150 Km), apresentou 07 alelos privados, tendo esta população uma das de menores riquezas alélicas. A diversidade gênica (heterozigosidade esperada - H_e) das populações variou entre 0,647 e 0,484. A heterozigosidade observada (H_o) oscilou entre 0,551 e 0,352. A heterozigosidade média esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg foi maior que a H_o , indicando a ocorrência de endogamia. Segundo o autor, as populações não se mostraram afetadas antropogenicamente de uma mesma forma. Nas populações de Serra da Arnica, Serra Branca e Poço Bonito, nenhum dos locos observados se apresentou no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Marcadores moleculares

Informações sobre as variações genéticas intra e interpopulacionais podem ser úteis na escolha de populações vegetais para uso humano. Evolução, fluxo gênico, sistemas reprodutivos e densidade populacional são fatores importantes para se detectar os níveis e estruturas dessas variações. Nos últimos trinta anos, o mundo testemunhou o crescimento do conhecimento acerca das sequências genômicas vegetais e os papéis fisiológicos e moleculares de vários de seus genes, revolucionando tanto a genética molecular quanto os campos de melhoramento de plantas (NADEEM *et al.*, 2017).

A era da genômica começou com o desenvolvimento de ferramentas genéticas como os marcadores moleculares baseados em DNA que foram amplamente utilizados em vários campos: fisiologia taxonômica, embriologia, engenharia genética, etc. Marcadores são os traços que podem ser usados para distinguir ou diferenciar as populações estudadas e são amplamente divididos em duas categorias principais: marcadores morfológicos e moleculares. Marcadores morfológicos são características fenotípicas, enquanto marcadores moleculares exprimem diferenças a nível molecular (DNA ou proteínas). Um marcador molecular é definido como um segmento particular de DNA que é representante das diferenças na análise genômica (DHUTMAL *et al.*, 2018).

No cultivo de plantas medicinais, técnicas tradicionais de melhoramento e biotecnologia podem ser utilizadas para identificar potenciais melhoramentos genéticos, através do estudo genômico de espécies, permitindo a seleção de gene e sequências associadas de interesse (POURMOHRAMMAD, 2013).

Para esse fim, dentre alguns dos marcadores moleculares utilizados mais conhecidos estão: AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphism DNA*); RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), SSRs (*Microsatellite* ou *Simple Sequence Repeats*) e o marcador SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), este último utilizado neste estudo.

Marcador molecular *Single Nucleotide Polymorphisms* e sequenciamento de nova geração

O SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) é um marcador molecular capaz de expressar a diferença de uma única de base de nucleotídeos entre duas sequências de DNA. Os SNPs fornecem a forma mais simples e definitiva de marcadores moleculares e podem resultar em uma grande densidade do marcador, pois cada base de nucleotídeo é a menor unidade de herança. A probabilidade de

encontrar polimorfismos em um gene alvo é aumentada devido à alta densidade de marcadores SNP, o que proporciona uma enorme vantagem sobre os marcadores anteriores, que estão, na melhor das hipóteses, intimamente ligados a um locus de interesse e não dentro dele. As frequências de SNP estão em um intervalo de um SNP a cada 100 - 300 pb (pares de bases) nas plantas. Os SNPs podem se apresentar em sequências codificantes de genes, regiões não codificantes de genes ou em regiões intergênicas (KUMAR *et al.*, 2018).

Tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) consistem de ferramentas revolucionárias para a área de estudo de genômica, que permitem que uma amostra de genoma humano seja sequenciado em um dia, em contraste com a tecnologia de sequenciamento Sarge, utilizada para decifrar o genoma humano e que necessitou de uma década para execução deste feito. No sequenciamento de nova geração, milhões de pequenos fragmentos de DNA são sequenciados paralelamente e todas essas sequências constroem o mapeamento do genoma. Essa técnica permite uma grande profundidade de leitura (BEHJATI, TARPEY; 2013), possibilitando a detecção das variações nas bases que compõe os fragmentos quando em estudo de genética populacional. NGS é utilizado em espécies modelo ou não-modelo para exploração da sequência genômica e descoberta de SNPs. Devido à sua frequência no genoma, os SNPs se apresentam como marcadores interessantes para o estudo de genômica de populações, sendo peças-chaves para compreender a diversidade entre populações muito próximas geneticamente. Com uso de NGS, o marcador SNP permite a descoberta de SNPs em larga-escala (TAUTZ *et al.*, 2010).

A diversidade genética e química dos óleos essenciais da espécie, anatomia foliar, efeito da sazonalidade sobre a composição química dos óleos essenciais e atividade antimicrobiana de populações de *L. pinaster* foram previamente estudados (HABER, 2008; HABER *et al.*, 2009; ISOBE, 2012; QUEIROZ, 2012; VIEIRA, 2012; SILVA, 2013; VIEIRA *et al.*, 2014; SILVA, 2016). Estes estudos consideraram populações de duas regiões do estado de Minas Gerais: região norte, região metropolitana de Belo Horizonte e Campos das Vertentes (ao sul do estado). Os estudos apontam diferentes vias metabólicas de substâncias dos óleos essenciais entre as populações. As análises genéticas, utilizando marcador molecular microssatélite (SSR), registraram diferentes níveis de diversidade genética intrapopulacional e alta diversidade entre populações. O óleo essencial e extrato das folhas de uma população da região sul de *L. pinaster* apresentaram atividade antimicrobiana contra o *Streptococcus mutans* (QUEIROZ *et al.*, 2018).

O cenário de ameaça da espécie, seu papel terapêutico na medicina popular, bem como a diversidade genética e química de populações de *L. pinaster* amostradas ao norte e ao sul do estado de Minas Gerais, sinalizam a necessidade de um estudo da espécie que apresente maior amplitude geográfica. Este trabalho teve como objetivo auxiliar na construção de panorama mais abrangente de informações sobre *L. pinaster*, ao caracterizar a diversidade genética e química de óleos essenciais de populações de três diferentes regiões do estado. Os resultados aqui encontrados visam contribuir para o delineamento de planos de manejo e conservação da espécie, bem como para seu uso terapêutico seguro.

II. OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar a diversidade genética e composição química de óleos essenciais de populações naturais de *L. pinaster* Mart. a fim de fornecer subsídios para programas de conservação da espécie e uso seguro com propósito medicinal. Para tanto, tem como objetivos específicos:

- Caracterizar a composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de seis populações naturais de *L. pinaster* de ocorrência na região metropolitana de Belo Horizonte e do norte do estado de Minas Gerais;
- Correlacionar diversidade química (óleos essenciais) e diversidade genética das populações de *L. pinaster*.
- Correlacionar a diversidade genética de nove populações de *L. pinaster*, sendo três populações da região Norte, três da região Metropolitana de Belo Horizonte e três populações oriundas da região dos Campos das Vertentes (sul do estado de Minas Gerais) por meio de marcador molecular SNP.
- Correlacionar a composição química dos óleos essenciais das populações de *L. pinaster* com as características físicas e químicas do solo das regiões de ocorrência.

III. CAPITULO I

Diversidade química e genética de populações naturais de *Lychnophora pinaster* Mart. de diferentes ambientes

Manuscrito no formato do periódico **Industrial Crops and Products**
(Qualis CAPES: A1; Fator de Impacto: 4,19)

DIVERSIDADE QUÍMICA E GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Lychnophora pinaster* MART. DE DIFERENTES AMBIENTES

MARQUES, A.P.S.¹; BONFIM, F.P.G.²; SANTOS, D.G.P.O.², LIMA, M.P.³; SEMIR, J.^{4†};
MARTINS, E.R.⁵, ZUCCHI, M.I.⁶, MARQUES, M.O.M.⁷.

¹Departamento de Botânica, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

²Departamento de Horticultura, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

³ Departamento de Produtos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

^{4*}Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas. *In memoriam*.

⁵ Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia.

⁶ Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio, Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico do Centro Sul.

⁷Laboratório de Produtos Naturais, Centro de Recursos Genéticos, Instituto Agronômico.

1. INTRODUÇÃO

Lychnophora pinaster Mart. (arnica-mineira) é endêmica do estado de Minas Gerais e utilizada na medicina popular tradicional em função de seus efeitos antirreumático, anti-inflamatório, analgésico e antiflogístico (REIS et al., 2010). A espécie tem sua ocorrência ao sudeste da Serra do Espinhaço, na região intermediária da Serra do Cipó e alguns pontos do Planalto de Diamantina (SEMIR, 2011). Devido ao seu extrativismo indiscriminado, à destruição do Cerrado e aos incêndios nas áreas de ocorrência, *L. pinaster* encontra-se na lista das espécies ameaçadas da flora do Estado de Minas Gerais (COPAM, 1997; MENDONÇA, LINS, 2000).

Em estudos de diversidade química de óleos essenciais de populações vegetais, um dos desafios é a caracterização dos fatores responsáveis pelo polimorfismo químico, comumente atribuído a fatores ambientais ou genéticos, não obstante estudos recentes reportarem especificamente o solo e fatores climáticos como agentes na variabilidade química e de rendimento de óleos essenciais. Neste sentido, a caracterização da diversidade e estrutura genética das populações, assim como das características edafoclimáticas das regiões de ocorrência das espécies, é necessária para aprofundar nossa compreensão dos fatores que determinam as características dos óleos essenciais (MARTÍNEZ-NATARÉN et al., 2014).

A diversidade genética e sua distribuição, dentro ou dentre populações, pode ser determinada por micro-processos como história demográfica das populações, seleção natural e fluxo gênico, e podem ser estimadas por seus índices e estruturação. Uma forma de acessar a variabilidade genética de populações é o uso de marcadores moleculares, pois permitem detectar a variação de alelos em características de interesse, exprimindo diferenças a nível molecular (DNA ou proteínas). Um marcador molecular é definido como um segmento particular de DNA que é representante das diferenças na análise genômica. Dentre os diferentes marcadores moleculares utilizados atualmente está o marcador SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), capaz de detectar a variação de um único nucleotídeo nas sequências de DNA dos materiais genéticos analisados (DHUTMAL *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2019).

A ameaça de extrativismo da espécie, seu papel terapêutico, bem como a diversidade genética e química de populações de *L. pinaster* observada em estudos anteriores a este, sinalizam a necessidade de um estudo da espécie que apresente maior amplitude geográfica. Este trabalho teve como objetivo auxiliar na construção de panorama mais abrangente de informações sobre *L. pinaster*, ao caracterizar a diversidade genética e química de óleos essenciais de populações de diferentes regiões.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Neste estudo foram trabalhadas amostras de populações naturais de *L. pinaster* de diferentes regiões do estado de Minas Gerais. Nove populações foram utilizadas para os estudos genéticos, enquanto das mesmas, seis foram amostradas para os estudos químicos de composição e rendimento de óleos essenciais. A coleta e análise dos recursos genéticos acessados foram autorizadas pelo Ministério do Meio Ambiente (ICMBio nº: 22772-6; SisGen/MMA: A01F803) e pelo Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais, Brasil (IEF- Autorização nº005/2017).

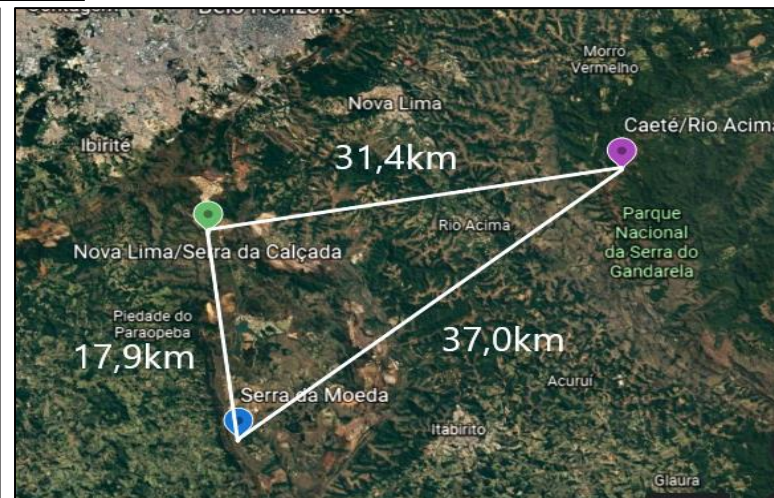
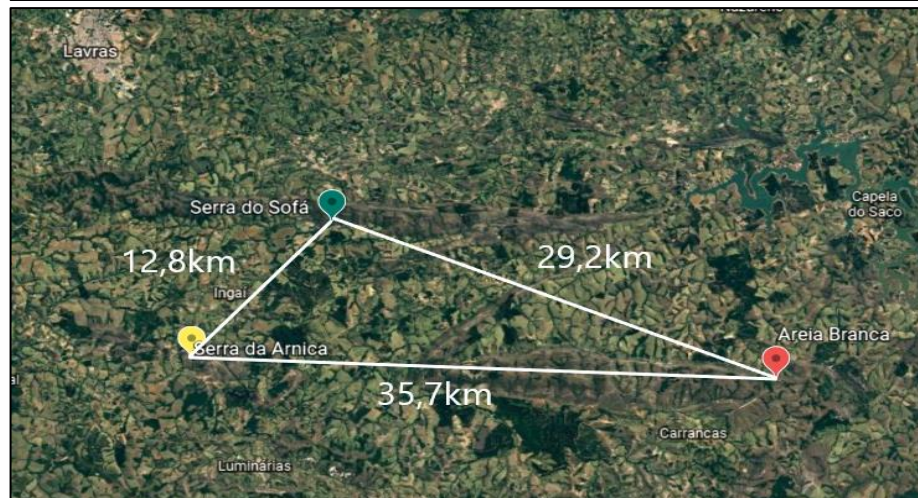
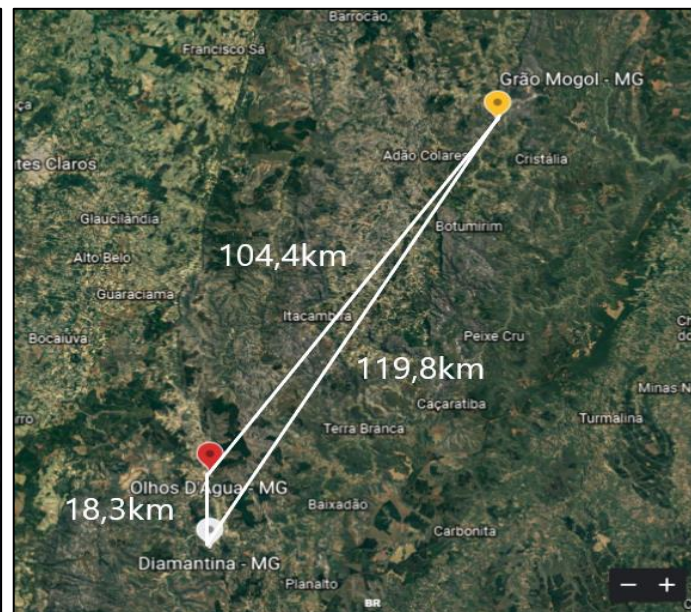
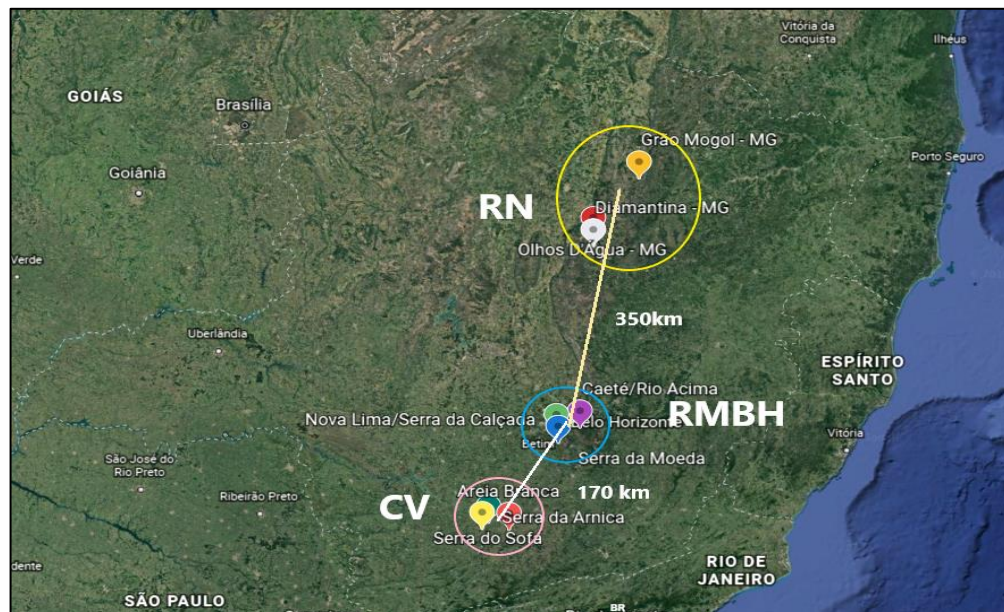
Em julho de 2017, foram coletadas partes aéreas de seis populações de *L. pinaster*: três do Norte (nos municípios de Grão Mogol, Olhos D'Água e na BR367, entre Olhos D'Água e Diamantina, esta última denominada como Diamantina) e três na Região Metropolitana de Belo Horizonte (nas regiões da Serra da Moeda, Nova Lima/Serra da Calçada e Caeté/Rio Acima). Para cada população foi coletado material botânico fértil para a confecção das exsiccatas. A identificação botânica foi

efetuada pelo Prof. Dr. João Semir do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), e as exsiccatas foram depositadas no Herbário UEC da UNICAMP (vouchers UEC nº 208026, 208028, 208030, 208032, 208036, 208038). As populações coletadas neste ano foram submetidas aos estudos fitoquímicos.

O número de indivíduos por população variou em função de seu tamanho. As plantas amostradas nas coletas foram marcadas com etiquetas plásticas e tiveram suas coordenadas geográficas anotadas por indivíduo (altitude, latitude e longitude) por meio de GPS (Global Positioning System) (e-trex, Garmin®).

Para as análises de genética de populações, além daquelas coletadas em 2017, foram utilizadas três populações coletadas anteriormente, no ano de 2011, pertencentes à região de Campos das Vertentes (Sul do Estado de Minas Gerais) (Tabela 1).

A figura 1 traz as coordenadas de georeferenciamento das populações amostradas.



RN = Região Norte; RMBH = Região Metropolitana de Belo Horizonte; CV = Campos das Vertentes

Figura 1 - (A) Locais de coleta das populações naturais de *L.pinaster* Mart, no estado de Minas Gerais, Brasil, no ano de 2017. (B) Distâncias entre os pontos de coleta na região norte (GM, DIMa e OD). (C) Distâncias entre os pontos de coleta na região metropolitana de Belo Horizonte (CTRA, NLSC e SM). (D) Distâncias entre os pontos de coleta na região de Campos das Vertentes (AB, SA e SS).

Tabela 1. Locais de coleta, código das populações, coordenadas geográficas e estudos realizados com as populações naturais *Lychnophora pinaster*, Minas Gerais, Brasil.

População	Código	Região	Altitude	Nº indivíduos avaliados		Coordenadas geográficas	Estudo realizado	
				Genética	Química		Latitude e longitude	Genética
Grão Mogol	GM	Norte	859	16	17	Lat: 16°38'39.5"S, Long: 042°57'17,1"W	x	x
Olhos D'Água	OD	Norte	704	20	14	Lat: 17°24'39.9"S, Long: 043°31'15.1"W	x	x
Diamantina	DIMa	Norte	796	20	18	Lat: 17°34'34.2"S, Long: 043°31'17.2"W	x	x
Caeté/Rio Acima	CTRA	Metropolitana de Belo Horizonte	1497	25	22	Lat: 20°02'56.6"S, Long: 043°41'11.2"W	x	x
Nova Lima/Serra da Calçada	NLSC	Metropolitana de Belo Horizonte	1450	25	23	Lat: 20°05'53.8"S, Long: 043°58'59.7"W	x	x
Serra da Moeda	SM	Metropolitana de Belo Horizonte	1366	19	17	Lat: 20°15'31.6"S; Long: 043°57'41.8"W	x	x
Serra da Arnica	SA	Campos das Vertentes	1055	14	-	Lat: 21°26'40.56"S; Long: 044°56'29.90"W	x	-

População	Código	Região	Altitude	Nº indivíduos avaliados		Coordenadas geográficas	Estudo realizado	
				Genética	Química		Latidade e longitude	Genética
Serra do Sofá	SS	Campos das Vertentes	940	13	-	Lat: 21°21'30.40"S; Long: 044°51'31.40"W	x	-
Areia Branca	AB	Campos das Vertentes	1143	17	-	Lat: 21°27'26.00"S; Long: 044°35'48.85"W	x	-

2.2. Condições edafoclimáticas dos locais de coleta das populações

As temperaturas diárias do período nos locais de coletadas foram levantadas na base Agritempo (Sistema de Monitoramento Agrometeorológico – Embrapa Informática/CEPANAGRI – Meteorologia Unicamp).

As análises químicas de macro e micronutrientes dos solos dos locais (Santos, 2017) foram realizadas mediante coleta de amostras compostas dos solos das áreas de origem das populações. Para cada local, as amostras foram preparadas a partir do solo coletado a 20 cm de profundidade em 10 pontos da área. Após seu processamento, as mesmas foram encaminhadas para o Laboratório de Solos da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu/SP. Os dados são aqui considerados nas análises que buscam caracterizar os ambientes das populações e possíveis relações entre os solos e a composição química dos óleos essenciais.

2.3. Caracterização da diversidade genética

De cada população foram coletadas folhas jovens para a avaliação da diversidade genética, as quais foram identificadas, armazenadas em tubos tipo falcon com sílica e armazenadas em caixa de isopor contendo gelo durante as atividades em campo. No laboratório as amostras foram liofilizadas (à -55°C e 500 mmHg de pressão) e conservadas em freezer a -80°C até o momento da extração de DNA.

O processo de extração de DNA e preparo das bibliotecas genômicas para sequenciamento ocorreu no Laboratório de Melhoramento Genético e Diversidade, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo. Os estudos genéticos foram realizados com a colaboração da pesquisadora Dra. Maria Imaculada Zucchi.

As extrações de DNA do tecido foliar foram realizadas através da trituração do material vegetal em aparelho *Blender Bullet*, posteriormente seguida pela execução do protocolo de extração com Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) de Doyle & Doyle (1990), com modificações.

A quantificação do DNA foi realizada mediante observação de eletroforese em gel com SYBER[™] *Safe DNA Gel Stain* (Thermo Fisher Scientific), visualizada em transluminador ultravioleta, através da comparação com *Lambda* de concentração conhecida (25, 30, 50 e 100 ng/μL). Para obtenção das

amostras na concentração necessária (30 ng/ μ L) e qualidade exigidos pela metodologia, certas populações precisaram ter seu DNA purificado com uso de Kit QIAquick PCR Purification da Qiagen® e concentrado pela eliminação do tampão em centrífuga à vácuo.

Após a extração e normalização do DNA foram produzidas as bibliotecas genômicas para Genotipagem por Sequenciamento (*Genotyping-by-Sequencing*, GBS) na plataforma Illumina (POLLAND *et al.*, 2012). O Sequenciamento de Nova Geração (*Next-Generation Sequencing*, NGS) Illumina foi realizado e os dados oriundos do sequenciamento foram processados em servidor. Após o término do processamento dos dados brutos, análises foram realizadas para a descoberta de SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*).

Para a de multiplexagem, genotipagem de SNPs, e estratégias de filtragem, as sequências brutas oriundas da plataforma de sequenciamento (*reads*) foram separadas e distribuídas em diferentes arquivos individualizados (*.fastq*) referentes aos indivíduos sequenciados, de acordo as sequências de *barcode* (6-8 nucleotídeos) presente nos adaptadores. Durante a preparação das bibliotecas utilizou-se de índices distintos presentes nos adaptadores ligados as sequências de DNA das amostras e posteriormente as amostras foram misturadas em uma única biblioteca (*pool*) para separação em função de suas sequências. Esse processo é chamado de *demultiplexing* e foi implementado pela pipeline STACKS 2.41 usando o programa *process-radtags*. Devido a uma pequena perda de qualidade no final das sequências durante a checagem de qualidade do sequenciamento, as mesmas foram cortadas a 90 pb (pares de base). Essa abordagem garante uma melhor retenção de sequências e melhor genotipagem ao longo da pipeline. Sequências sem o sítio de corte da enzima, com bases não sequenciadas ou com sequências de baixa qualidade foram eliminadas nesta etapa do processo (-r, -c, e -q). Em seguida, abordagem *de novo* foi selecionada para a aquisição dos SNPs, devido à ausência de um genoma de referência para a espécie. Iniciando-se pelo módulo *ustacks*, que cataloga os SNPs presente em cada amostra, foram selecionados parâmetros padrões do programa para a distância máxima permitidas em stacks ($M=2$) e distância máxima permitida para alinhamentos secundários ($N=4$, $M+2$). A cobertura mínima foi de três sequências de profundidade para que um *locus* RAD fosse considerado ($m=3$). Na etapa consecutiva no módulo *cstacks*, em que um catálogo comum para todas as amostras é criado, não se permitiu que o número de diferenças por loci entre amostras fosse superior a dois para ser considerado um mesmo loci. Para todos os outros módulos da pipeline foram usados os parâmetros padrões do programa. Para se chegar ao *set* final usado nas análises, os SNPs tinham que estar presentes em no mínimo 60% das

amostras totais ($r = 0.6$). A frequência mínima foi restrita a 5% enquanto a heterozigotidade observada foi limitada a um máximo de 75%.

No Stacks 2.41, foram calculados os níveis de diversidade genética dentro e entre populações, que foram descritos pelos seguintes parâmetros: frequência alélica; número total de alelos; número médio de alelos por população; alelos privados; alelos raros; heterozigotidade observada; heterozigotidade esperada; coeficiente de endogamia; taxa de cruzamento aparente e riqueza alélica. Na plataforma RStudio, foram realizadas a análise de componentes principais (ACP) e a análise discriminante de componentes principais (ADCP) em função dos SNPs encontrados. A relação entre distância geográfica e distância genética foi analisada pelo índice de isolamento por distância via teste de Mantel. A análise de estruturação da população se deu por análise bayesiana via STRUCTURE.

2.4. Óleos essenciais

2.4.1. Extração e rendimento dos óleos essenciais

Após a coleta das partes aéreas, as folhas de cada indivíduo foram separadas manualmente, acondicionadas em sacos plásticos até extração por hidrodestilação em aparato Clevenger por duas horas, sendo o óleo essencial resultante armazenado em flaconetes de cor âmbar com batoque e tampa de rosca e mantido em freezer doméstico (-20°C). O rendimento de óleo essencial por indivíduo foi calculado com base na massa seca da amostra. A umidade relativa das folhas foi obtida a partir de 3g de material vegetal, por indivíduo, seco em estufa de circulação de ar à 40°C até peso constante.

2.4.2. Análise da composição química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa unidimensional (CG)

As análises por cromatografia gasosa unidimensional foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais do Setor de Fitoquímica do Departamento de Recursos Genéticos do Instituto Agrônomo (IAC) em Campinas-SP.

A análise qualitativa da composição química dos óleos essenciais foi conduzida em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando por impacto de elétrons (70 eV), equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm),

hélio como gás de arraste ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$), injetor a 220°C , interface a 230°C e o seguinte programa de temperatura: 60°C - 280°C , 3°C/min , modo de injeção split (1/20) e vazão de 1 mL/min . A identificação dos constituintes químicos foi realizada através da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62.lib) e índice de retenção linear das substâncias (ADAMS, 2007; ADAMS 2017). Os índices de retenção linear foram obtidos por meio da injeção de uma mistura padrão de *n*-alcanos (C9-C40), aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL, KRATZ; 1963). A análise quantitativa dos óleos essenciais foi realizada em cromatógrafo à gás com detector de ionização de chama (CG-DIC (Shimadzu, GC-2010/AOC-20i), empregando-se o método de normalização de área, nas mesmas condições cromatográficas do GC-EM.

Os óleos essenciais foram diluídos ($1 \mu\text{L}$ de óleo essencial) em 1 mL de acetato de etila (grau cromatográfico) e injetado $1 \mu\text{L}$ da solução no CG-DIC e CG-EM. Os resultados da composição química dos óleos essenciais das populações foram submetidos à análise quimiométrica por meio do programa estatístico livre MetaboAnalyst (4.0), que funciona em linguagem R. As análises quimiométricas consistiram de análises de componentes principais (*Principal Components Analysis* – PCA), *Heatmap* em função da distância euclidiana calculada pelo método de Ward e análise de correlação.

2.5. Identificação de substâncias por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

(RMN^1H) e Carbono-13 (RMN^{13}C)

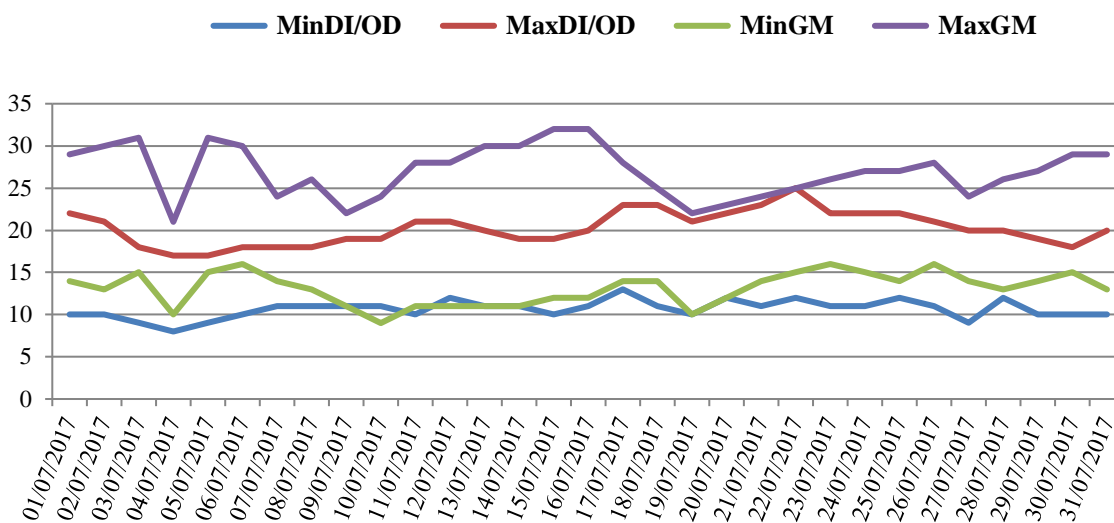
Nos casos em que a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, uni (CG-EM) e bidimensional abrangente (CG×CG-EM) não permitiu a identificação das substâncias, foi utilizada a técnica auxiliar a Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN^1H) e Carbono-13 (RMN^{13}C) uni-(1D) e bidimensional (2D). Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , unidimensional (1D), foram obtidos em espectrômetro Bruker Inova 500 (1H:500 MHz; 13C:125 MHz), utilizando CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. Os espectros 2D (HMQC: correlação Heteronuclear múltipla Quantum; HMBC: correlação Heteronuclear múltipla-Bond) foram obtidos em espectrômetro Bruker FOURIER 300, utilizando como solvente CDCl_3 . Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN^1H , RMN^{13}C) foram obtidos no laboratório da Divisão Química de Produtos Naturais do Departamento de Produtos Naturais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, em colaboração com a Prof^ª Dr^ª Maria da Paz Lima.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Condições edafoclimáticas dos locais de coletas das regiões norte, metropolitana de Belo Horizonte e Campos das Vertentes

3.1.1. Temperatura no período de coleta

As temperaturas dos locais de origem das populações nativas de *L. pinaster* são apresentadas na figura 2. Devido à proximidade entre os locais de coleta Olhos D'Água (OD) e Diamantina (DIMa) as temperaturas de ambos foram consideradas as mesmas, sendo coletadas da mesma unidade de monitoramento meteorológico.



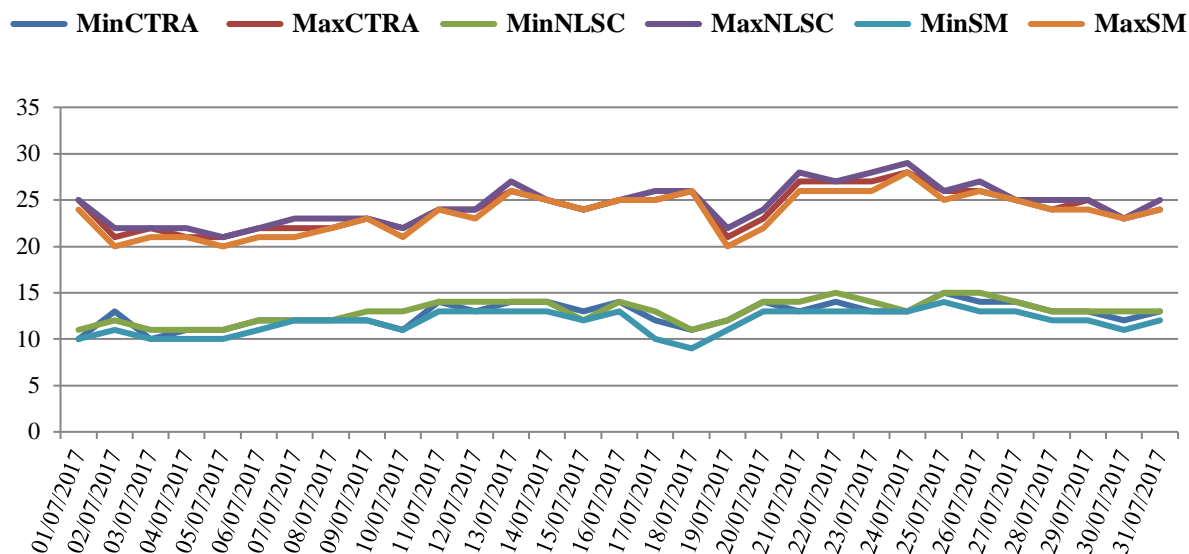


Figura 2 – Temperaturas máximas e mínimas dos locais de coleta das populações de *L. Mart.*, Minas Gerais, Brasil, 2017. (A) Dados de Grão Mogol e Diamantina/Olhos D’Água, região norte do estado. (B) Dados de Nova Lima, Moeda e Rio Acima, região metropolitana de Belo Horizonte.

As temperaturas apresentaram maior variação entre os locais de coleta das populações na região norte, enquanto que as mínimas e máximas para as populações da região metropolitana de Belo Horizonte foram muito similares, se sobrepondo em alguns momentos.

Grão Mogol teve a maior média de temperatura diária (20°C), com mínima de 9°C e máxima de 32°C. DI/OD tiveram a temperatura mínima de 8°C e máxima de 25°C, com média diária de 15°C.

Para as populações da região metropolitana de Belo Horizonte, as médias de temperatura foram semelhantes, com mínimas de entre 13°C e 14°C, máximas entre 24°C e 25°C e médias diárias entre 18°C e 19°C.

3.1.2. Características dos solos das populações

A análise química (macro e micronutrientes) e física dos solos dos locais de coleta de *L. pinaster* Mart. (Apêndices 1 e 2) demonstram que há diferenças entre os solos das populações.

Macro e micronutrientes constituem moléculas essenciais à sobrevivência dos vegetais em habitats naturais e cultivados. Cu, Zn, Fe e Mn, são micronutrientes presentes no solo e que se absorvidos em excesso podem competir durante a absorção com outros nutrientes essenciais ou se acumular nos tecidos após sua absorção, causando toxicidade e alterando o crescimento e o metabolismo vegetal (ROUT, SAHOO; 2015).

Nova Lima (NLSC) apresentou o solo mais ácido dentre os locais de coleta (3,5), o que pode ser explicado pela decomposição do alto teor de matéria orgânica do solo, que contribui para a formação de ácidos orgânicos que diminuem o pH. A matéria orgânica serve como reserva de nutrientes, promove a agregação do solo, reduz a compactação e aumenta a infiltração de água no solo (USDA, 2014; ADELEKE *et al.*; 2017). O solo desta população também apresentou o maior teor de enxofre entre os locais analisados. O enxofre pode ser absorvido via solo ou atmosfera e é pouco redistribuído na planta (JAMAL *et al.*, 2010).

O fósforo (P), analisado na forma de P_{resina} , teve seu maior teor encontrado na população Serra da Moeda (12 mg/md³). Este macronutriente se apresenta no solo na forma orgânica e mineral, sendo a proporção de P orgânico determinada pela quantidade de matéria orgânica no solo (COSTA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017).

O maior pH registrado dentre os locais foi em CTRA (6,0), o que pode se dever a sua maior quantidade de cálcio, que tem papel corretor no solo contribuindo para um pH mais básico. Além de Ca^{2+} , CTRA apresentou maiores conteúdos de magnésio (Mg), sendo que no processo de absorção competem entre si e com o potássio (K) (YAN, HOU; 2018).

NLSC e SM registraram os maiores conteúdos do micronutriente boro (B) entre as populações (0,42 md/dm³ e 0,56 md/dm³, respectivamente), que pode advir de seus teores de matéria orgânica (SINGH *et al.*, 2019; FAQUIN, 2005).

SM e NLSC, da região metropolitana de Belo Horizonte, são as populações com maior conteúdo de ferro (Fe), com 204 md/dm³ e 338 md/dm³, respectivamente. Isso se deve ao fato das populações desta região estarem compreendidas dentro do território do quadrilátero ferrífero do estado de Minas Gérias, região de estruturas geológicas pré-cambriana onde estão concentradas as jazidas de ferro do centro do estado e que sofre intensa atividade de mineração levando a supressão da vegetação (AZEVEDO *et al.*, 2012). O Fe, abundante no solo dessa região, é absorvido e transportado no xilema em função da corrente transpiratória, sendo pouco redistribuído entre os tecidos vegetais (FAQUIN, 2005; ROOUT, SAHOO; 2015).

Dentre as populações, SM apresentou altos teores de zinco (Zn), ferro (Fe) e manganês (Mn), porém este último pode inibir a absorção de Fe e vice-versa, além de se apresentar mais disponível em solos ácidos do que em solos alcalinos (pH de SM= 4,1) (MILLALEO *et al.*, 2010; MOUSAVI *et al.*, 2011).

NLSC e GM apresentaram maiores teores de alumínio (Al^{3+}) (16 mmol/dm³ e 10 mmol/dm³, respectivamente), o que contribuiu para a maior acidez registrada. Este elemento também causa a diminuição de disponibilidade de fósforo no solo. O alumínio compete no processo de absorção com o potássio, o magnésio e o cálcio, além de se mostrar fitotóxico alterando a proliferação celular (BURNHAM *et al.*, 2017; HORBOWICZ *et al.*, 2011).

OD apresentou o maior teor de cobre (Cu = 1,0 md/dm³) entre os solos analisados, enquanto para o potássio os locais de coleta com maiores teores foram NLSC e SM (1,8 mmol/dm³ e 2,9 mmol/dm³, respectivamente).

As populações da região metropolitana de Belo Horizonte apresentaram solos mais ricos em areia grossa do que as da região norte. Em contrapartida, OD e DIMa (norte) apresentaram maiores teores de silte. GM apresentou solo com mais areia fina e NLSC registrou maior teor de argila.

A partir dos dados físicos e químicos dos solos, foi executada uma análise de componentes principais a fim de verificar as diferenças entre os mesmos (Figura 4).

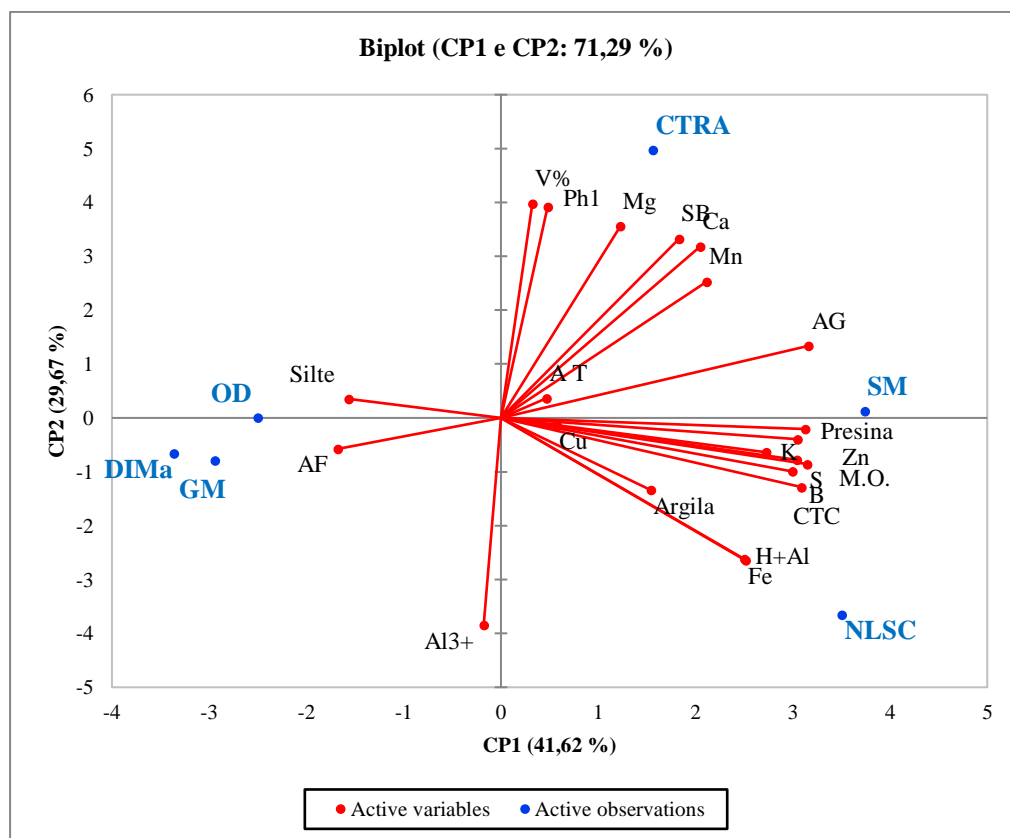


Figura 3 – Análise de componentes principais das variáveis químicas, macro e micronutrientes, e físicas dos solos das áreas de coleta das populações de *L. pinaster* Mart.

As duas componentes principais comportaram 71,29% da variação dos dados químicos entre as populações.

Em função da primeira componente principal, é perceptível a separação das populações das duas regiões. Para a CP1, as populações do norte apresentando valores de *scores* negativos e as populações da região metropolitana de Belo Horizonte valores positivos. É possível observar que a maioria das variáveis químicas do solo formaram vetores que levaram a valores positivos para a CP1, com exceção do Al^{3+} .

Algumas variáveis foram determinantes na diferenciação dos solos das populações (Apêndices 3 e 4 – Tabela de *scores* e tabela valores de quadrados dos cossenos das variáveis). Dentre as características químicas e físicas dos solos, determinadas variáveis contribuíram mais do que outras na diferenciação. As amostras de solos das populações da região metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) apresentaram diversos micro e macronutrientes como variáveis com *loadings* significativos. O isolamento de CTRA das demais populações, no quadrante superior direito do gráfico, se deveu à

influência das forças dos *loadings* de características químicas do solo como Mg, Ca, Mn, SB e V%. SM teve seu posicionamento determinado pelos *loadings* de Zn, Mg, K, B e P_{resina}, enquanto os solos de NLSC foram diferenciados dos demais em função dos altos valores de matéria orgânica, Al³⁺, Al+H, CTC, S, Fe e de argila.

Não ocorreu agrupamento entre as populações da região metropolitana de Belo Horizonte em função das características físicas e químicas de seus solos, ao contrário das pertencentes à região norte, que se mostraram mais próximas, se posicionando negativamente em relação à CP1 (*scores* entre -3,36 e -2,50) e próximas à origem para a CP2 (*scores* entre 0 e 0,79).

Os *loadings* para variáveis físicas do solo, como os teores de silte e areia fina, foram determinantes para o posicionamento das populações da região norte (OD, DIMa e GM), levando a um agrupamento das mesmas de forma distante das populações da região metropolitana de Belo Horizonte.

O cobre foi a única variável química que não foi significativa para nenhuma população em ambas as componentes principais.

Quanto às características físicas, a variável areia grossa se mostrou determinante para posicionar todas as populações da região metropolitana de Belo Horizonte na parte negativa da CP1, devido ao alto valor de *loading* (0,84). A variável de areia total não se mostrou informativa (baixos valores de *loading*, não contribuindo para separar ou agregar as populações).

3.2. Rendimento do óleo essencial das populações

As populações revelaram variação intra e interpopulacional quanto ao rendimento dos óleos essenciais (Apêndice 5).

O rendimento de óleo essencial variou intrapopulacionalmente. DIMa apresentou tanto o menor quanto o maior valor de rendimento entre todas as populações estudadas (0,019% e 0,432%, respectivamente).

A análise de variância (Apêndice 6) demonstrou que as médias de rendimento difeririam em função da população, não sendo detectadas diferenças de rendimento devido à região de origem. Os rendimentos médios (Tabela 2) demonstram que as populações com maiores produções de óleo essencial foram Diamantina, Serra da Moeda, CTRA e OD. As populações de menores rendimentos foram NLSC e GM.

Tabela 2 - Rendimento médio de óleo essencial das populações de *L. pinaster*, Minas Gerais, Brasil, 2017.

População	Rendimento (%)
DIMa	0,12a ± 0,09
SM	0,12a ± 0,04
CTRA	0,10ab ± 0,05
OD	0,08ab ± 0,04
NLSC	0,04c ± 0,02
GM	0,05bc ± 0,01
Média	0,08 ± 0,04
C.V(%)	6,46

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-knott a 5% de probabilidade. CV= Coeficiente de variação. DIMa = Diamantina, SM = Serra da Moeda, CTRA = Caeté/Rio Acima, OD = Olhos D'Água, NLSC = Nova Lima/Serra da Calçada, GM = Grão Mogol.

SM, umas das populações com maior conteúdo de óleo essencial, apresentou o maior teor de potássio (K) entre as populações estudadas, o que pode ter influenciado o rendimento. NurzyĔska-Wierdak e Borowski (2013) registraram aumento no conteúdo de óleo essencial de manjeriçao para os maiores teores de potássio testados. Outro mineral relevante nos solos de SM foi o fósforo, para o qual é registrado o aumento de produção de óleo essencial para espécies como o gerânio (*Pelargonium graveolens* L.) e o manjeriçao (*O. basilicum* L.) (RAMEZANI *et al.*, 2009; ALIZADEH *et al.*, 2010).

O fósforo pode estar diretamente ligado à maior produção de óleo essencial por SM, dado que este faz parte da estrutura química dos precursores de terpenos, o isopentenil difosfato e dimetilalil pirofosfato (IPP e DMAPP) (ORMEÑO, FERNANDEZ; 2012) e a população apresentou o maior teor do mineral em seu solo. Embora possa ter contribuindo para o aumento do rendimento, o P isoladamente parece não determinar o teor de óleos essenciais nas populações, pois DIMa e CTRA alcançaram rendimento estatisticamente igual ao de SM e não apresentaram teores similares de fósforo em seus solos.

O boro, cujo maior teor foi apresentado pelo solo de SM, pode levar ao aumento na produção de óleos essenciais, como registrado por Sugier (2017), onde a aplicação de boro nas folhas acarretou maior rendimento de óleo essencial e produção (Kg/ha) em relação ao grupo controle, tanto para *Arnica montana* L. como para *Arnica chamissonis* Less.

A baixa produção de óleo essencial de Nova Lima/Serra da Calçada (NLSC) pode estar relacionada ao alto teor de ferro em seu solo, que foi o maior dentre todas as populações. A influência

do ferro sobre o decréscimo de rendimento de óleo essencial foi previamente registrada para o tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (JABBARI *et al.*, 2011). Esta população também apresentou os maiores teores de matéria orgânica (M.O.) e a areia fina, o que pode influenciar negativamente a produção de óleo essencial, como visto por Elbali (2018) no estudo de efeitos ambientais sobre o marroio-branco (*Marrubium vulgare* L.), que registrou coeficiente de correlação negativo para essas variáveis do solo e seu rendimento de óleo essencial.

CTRA apresentou um dos maiores conteúdos de óleos essenciais, talvez influenciado pelo teor de cálcio em seu solo. O aumento de rendimento de óleo essencial em função de calcário foi previamente registrado para segurelha-dos-jardins (*Satureja hortensis* L.) (MUMIVAND *et al.*, 2011).

O enxofre, por sua vez, pode ter influenciado o rendimento dos óleos essenciais das populações da região metropolitana de Belo Horizonte. Oliveira e colaboradores (2014), ao testarem soluções com diferentes diluições de enxofre (S) no cultivo de manjerição, registraram melhores rendimentos de óleo essencial para os tratamentos com valores intermediários e a queda de rendimento para as diluições mais concentradas de S. Em nosso estudo, dentre as populações da região de Belo Horizonte, SM e CTRA apresentaram valores intermediários de enxofre, enquanto NLSC foi a que apresentou maior concentração deste mineral em seu solo e o menor rendimento de óleo essencial para essa região.

Sobre as características físicas dos solos, estudos demonstram que podem não afetar o rendimento, como visto por Hendawy (2017) ao testar diferentes tipos de solo sobre o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.).

Os teores encontrados foram menores que os reportados previamente para populações de Campos das Vertentes, do sul de Minas Gerais, para as quais Silva (2016) encontrou rendimentos médios de até 0,5%. Fatores edafoclimáticos como a precipitação, altitude e temperatura podem ter contribuído para os diferentes rendimentos entre populações de mesma região (SHAMS, 2016).

3.3. Caracterização dos óleos essenciais de *L. pinaster*

Os óleos essenciais apresentaram diferentes perfis químicos (Apêndices 7 a 12). A tabela 3 apresenta a composição química média dos óleos essenciais das populações das regiões norte e metropolitana de Belo Horizonte (composição de todos os indivíduos nos Apêndices 13 a 18)

Tabela 3 – Composição química média (%) dos óleos essenciais de populações de *L. pinaster*, Minas Gerais, Brasil, 2017.

Substância/Classe	Região Norte			Região Metropolitana de Belo Horizonte			IRc	
	GM	DIMa	OD	CTRA	NLSC	SM		
	Monoterpenos							
1.	α -tujeno	-	-	-	-	-	0,29	930
2.	α -pineno	12,45	3,62	-	1,51	0,27	0,75	939
3.	sabineno	-	-	-	-	-	0,7	975
4.	β -pineno	5,06	1,16	-	9,08	2,08	1,32	979
5.	mirceno	-	0,08	-	-	-	-	990
6.	ρ -cimeno	-	-	-	-	-	1,65	1024
7.	1,8-cineol	-	0,17	-	-	-	-	1026
8.	limoneno	-	0,28	0,99	-	-	0,5	1029
9.	γ -terpineno	-	-	-	-	-	0,42	1059
10.	terpinoleno	-	-	-	-	-	0,19	1088
11.	linalol	3,5	1,09	4,77	-	-	0,41	1095
12.	(Z)-pinocarveol	5,54	1,94	-	-	0,32	0,42	1139
13.	(Z)- β -terpineol	-	-	-	-	0,31	-	1163
14.	terpinen-4-ol	3,3	0,99	-	-	-	3,03	1177
15.	α -terpineol	1,23	-	-	-	-	0,11	1188
16.	mirtenol	-	0,27	-	-	0,28	-	1195
17.	mirtenal	1,1	-	-	-	-	0,17	1195
18.	aldeído perfílico	-	-	0,56	-	-	-	1271
19.	acetato de geranila	-	-	-	-	0,98	-	1381
Sesquiterpenos								

20.	α -cipereno	-	-	-	-	-	2,6	1398
21.	(Z)-cariofileno	3,48	-	-	-	-	-	1408
22.	(E)-cariofileno	-	-	-	1,54	-	0,77	1419
23.	α -humuleno	0,18	1,98	2,51	-	2,74	-	1454
24.	γ - amorfeno	-	-	2,53	-	-	-	1495
25.	isodauceno	-	-	-	-	-	0,01	1500
26.	sesquiterpeno 1	-	1,73	-	16,12	0,24	35,16	1504
27.	sesquiterpeno 2	-	-	-	13,94	-	-	1506
28.	(Z)-nerolidol	-	-	-	12,64	-	-	1532
29.	α -copaen-11-ol	1,38	-	-	-	-	-	1541
30.	sesquiterpeno 3	-	2,71	3,43	-	1,12	-	1545
31.	<i>epi</i> -longipinanol	-	-	0,21	-	-	-	1563
32.	espatulenol	4,4	-	-	-	-	-	1578
33.	óxido de cariofileno	-	0,19	-	2,19	-	-	1583
34.	β -coapen-4- α -ol	-	-	-	-	-	0,58	1590
35.	sesquiterpeno 4	-	4,75	6,26	0,27	5,37	-	1599
36.	sesquiterpeno 5	-	0,42	-	-	-	-	1620
37.	sesquiterpeno 6	-	0,76	1,22	-	-	-	1637
38.	<i>epi</i> - α -cadinol	-	0,29	-	-	-	-	1640
39.	1,7-diepi- α -cedrenal	-	-	-	6,46	-	-	1641
40.	<i>allo</i> -epoxido de aromadendreno	1,41	-	-	-	-	-	1641
41.	cedr-8(15)-en-10-ol	-	-	-	4,42	-	-	1652

42.	14-hidroxi-(Z)-cariofileno	-	-	-	2,27	-	-	1667
43.	14-hidroxi-9-epi-E-cariofileno	-	0,69	-	-	-	2,45	1669
44.	germacrona	-	8,56	2,51	0,25	3,44	-	1693
45.	14-hidroxi-4,5-dehidro-cariofileno	-	0,55	9,13	-	-	-	1706
46.	14-hidroxi- α -humuleno	35,95	13,39	-	0,47	3,18	-	1714
47.	curcumenol	-	-	0,11	-	-	-	1734
48.	esquamulosa	-	-	8,3	-	-	-	1771
49.	sesquiterpeno 7	-	-	-	-	-	8,13	1777
50.	14-acetoxi- α -humuleno	-	21,09	-	2,06	56,33	-	1803
51.	sesquiterpeno 8	-	-	38,46	-	-	-	1807

Outras classes

52.	etil-3-metil pentanoato	-	-	-	-	-	0,19	949
53.	tridecanal	-	-	-	-	3,45	-	1100
54.	lebaicona	-	-	-	-	-	0,13	1120
55.	<i>n</i> -decanal	0,41	-	-	-	-	-	1201
56.	<i>n</i> -nonanal	0,28	0,15	-	-	0,56	-	1510
57.	longicanfenilona	-	-	0,53	-	-	-	1552
58.	benzoato de benzila	-	2,11	-	-	-	-	1759

Total (%)	79,67	68,97	81,5	73,2	80,68	59,97
------------------	--------------	--------------	-------------	-------------	--------------	--------------

Classes de substâncias

Monoterpenos	32,18	9,6	6,32	10,59	4,24	9,96
Sesquiterpenos	46,8	57,11	74,67	62,63	72,42	49,7
Outras classes	0,69	2,26	0,53	-	4,01	0,32

GM = Grão Mogol, DIMa = Diamantina, OD = Olhos D'Água, CTRA = Caeté/Rio Acima; NLSC = Nova Lima/Serra da Calçada e SM = Serra da Moeda
IRc= índice de retenção linear calculado
- = substância não detectada para a população

No total, 58 substâncias foram detectadas nos óleos essenciais, com maior abundância dos monoterpenos e sesquiterpenos nas seis populações amostradas, sendo a última classe a mais abundante. Houve divergência na composição química dos óleos essenciais entre as seis populações, independente da região de ocorrência no Estado de Minas Gerais.

Para a região norte, os compostos majoritários para a população de Grão Mogol (GM) foi o α -pineno (12,45%) e 14-hidroxi- α -humuleno (35,95%). Esta última substância foi detectada em DIMa, com 13,39%, juntamente ao 14-acetoxi- α -humuleno (21,09%). Para a identificação da substância 14-acetoxi- α -humuleno (C₁₇H₂₆O₂), foi necessário o auxílio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Carbono 13 (RMN ¹³C) unidimensional (1D) e bidimensional (2D) de correlação homonuclear (¹H-¹H-COSY) e heteronuclear (HSQC; HMBC). Para tanto, o óleo essencial de uma amostra contendo 70% desta substância foi utilizada para a obtenção dos referidos espectros. Os dados obtidos foram comparados com o estudo realizado por Bolhmann *et al.* (1982) com *Lychonophora columnaris* onde foram identificados derivados de α -humuleno, dentre estes o 14-acetoxi- α -humuleno. De acordo com levantamento bibliográfico o 14-acetoxi- α -humuleno foi identificado nos óleos essenciais de *Betula pubenses* Roth. e *Betula pendula* Roth., com índice de retenção linear de 1800, valor próximo ao obtido no presente estudo (IRL 1803) (ISIDOROV *et al.*, 2004).

Para a população Olhos D'Água (OD), as substâncias mais abundantes dos óleos essenciais foram o 14-hidroxi-4,5-dehidro-cariofileno (9,13%), esquamulosa (8,30%) e o sesquiterpeno 8 (38,46%) como substância majoritária, cujo espectro de massas é condizente com o padrão de fragmentação de sesquiterpeno oxigenado.

Já para a região Metropolitana de Belo Horizonte, SM apresentou dois sesquiterpenos (1 e 7) com índices de retenção 1504 (35,16%) e 1777 (8,13%) como substâncias majoritárias de seus óleos essenciais, o último exclusivo nesta população. A análise dos espectros de massas e os índices de retenção linear não permitiram a identificação destas substâncias. O sesquiterpeno 1 também foi detectado na população CTRA como o mais abundante (16,12%). Os compostos 1,7-diepi- α -cedrenal (6,46%), (Z)-nerolidol (12,64%), sesquiterpeno 2 (13,94%) e cedr-8(15)-en-10-ol (4,42%), foram detectadas somente nesta população. O 14-acetoxi- α -humuleno foi a substância majoritária em NLSC, com 56,33%.

Alguns sesquiterpenos estiveram presentes em mais de uma população: germacrona, 14-hidroxi- α -humuleno, óxido de cariofileno e 14-acetoxi- α -humuleno. Os compostos majoritários variaram em função da população e não foram comuns entre todas as populações de uma mesma região.

SM apresentou substâncias não detectadas nas demais, além do sesquiterpeno 7 (8,13%), ρ -cimeno (1,65%), α -cipereno (2,60%) e outras sete substâncias, que estiveram presentes em teores $\leq 0,70\%$.

A substância 14-hidroxi- α -humuleno foi detectada em considerável proporção relativa em duas das três populações coletadas na região Norte (GM, DIMa), porém não foi observada na população OD, apesar da mesma estar a 16 km de distância de DIMa e em condições climáticas próximas. Similarmente, na região metropolitana de Belo Horizonte, este composto foi observado em CTRA e NLSC, em baixas proporções relativas, mas não detectado em SM.

A composição química dos óleos essenciais das populações amostradas no presente estudo nas regiões norte e metropolitana de Belo Horizonte demonstraram significativa divergência com os resultados de estudos prévios realizados com as populações de *L. pinaster* da região sul do estado de Minas Gerais (Campos das Vertentes), onde o constituinte mais abundante foi o (*E*)-cinamato de metila (HABER, 2009; REIS *et al.*, 2010; ISOBE, 2012; SILVA, 2013; RESENDE, 2013). Estes trabalhos reportam compostos da classe dos fenilpropanóides como majoritários, enquanto para as populações utilizadas neste estudo a classe química predominante dos compostos dos óleos essenciais foi a dos sesquiterpenos, demonstrando a divergência das rotas na produção de óleos essenciais das populações de diferentes regiões. Para Isobe, o (*E*)-cinamato de metila variou de 61,27% (população de Carrancas-MG) no inverno a 80,86% (população de Lavras-MG) no verão, variando em função das estações do ano. Haber detectou 82% da substância em uma população de Poço Bonito (Lavras-MG). Resende (2013) identificou o (*E*)-cinamato de metila (62,1%) e (*E*)-cariofileno (21,1%) como compostos mais abundantes no óleo essencial de *L. pinaster*. Reis *et al.* (2010) detectou a proporção de 93% de (*E*)-cinamato de metila no óleo essencial da espécie em coleta realizada no verão.

Silva (2013) analisou a variação na composição de óleo essencial de *L. pinaster* entre populações durante as estações do ano e reportou o (*E*)-cinamato de metila e o (*E*)-cariofileno como compostos majoritários, com proporção relativa variando entre 56,03 a 80,18% e 9,81 a 23,10%, respectivamente. As divergências químicas encontradas entre as populações das diferentes regiões sugerem a ocorrência de diferentes quimiotipos para o óleo essencial de *L. pinaster*.

3.4. Composição química intrapopulacional dos óleos essenciais de *L. pinaster*

Ao analisarmos a composição do óleo essencial dos indivíduos de *L. pinaster* dentro das populações, observa-se uma variação no perfil químico dos óleos essenciais entre os indivíduos de uma mesma população (Apêndices 19 a 24).

A população de Diamantina apresentou variação fenotípica, em especial, para os indivíduos DIMa 07, DIMa 14, DIMa 16 e DISI03, onde as proporções relativas do 14-acetoxi- α -humuleno foram menores e maiores para 14-hidroxi- α -humuleno em DIMa 07, DIMa 16 e DISI03 e de germacrona em DIMa14.

Na população Olhos D'Água os indivíduos OD04, OD09 e OD16 apresentam composição química contrastante com os demais. Os três indivíduos distinguem-se, principalmente pela baixa proporção relativa do sesquiterpeno 8 ($\% \leq 0,20$), substância majoritária nos demais indivíduos variando de 29,99 a 64,92%).

Assim como nas demais populações, os indivíduos da população de Grão Mogol (GM) demonstraram variação nas proporções relativas das substâncias dos óleos essenciais, com destaque para os para os indivíduos GM03, GM06, GM08 e GM22. A população GM apresentou variação intrapopulacional no perfil químico de seus indivíduos, com diferentes teores de α -pineno, que foi detectado como traço (0,1%) em GM20 mas alcançou 38,25% em GM03; e de seu isômero β -pineno, com proporção relativa que variou entre 0,1%(traço) e 13,45%. Sua substância majoritária, o 14-hidróxi- α -humuleno, teve sua proporção relativa entre 11,05% (GM03) e 51,62% (GM08).

Na população de Serra da Moeda, foram registradas variações, principalmente, nos percentuais do sesquiterpeno 1(16,59 em SM01 e 56,47% em SM24) e 7 (não detectado em SM22, mas alcançando 12,67% para SM12).

Na população de Caeté/Rio Acima (CTRA), alguns indivíduos mostraram comportamentos fenotípicos contrastantes. CTRA01 e 17 apresentaram maiores teores de cedr-8(15)-en-10-ol que as demais amostras, com 10,03% e 26,50%, respectivamente. Os indivíduos CTRA 17 e 22 apresentaram altas proporções relativas de β -pineno (30,37% e 33,34%), enquanto que CTRA12 exibiu menor número de compostos, apresentado 8 das 12 substâncias identificadas.

Os óleos essenciais dos indivíduos da população Nova Lima/Serra da Calçada (NLSC) apresentaram menores diferenças no fenótipo químico entre os indivíduos, exceto NLSC14, que divergiu dos demais dada à alta proporção relativa de tridecanal (37,41%) e baixo percentual de 14-acetoxi- α -humuleno (abaixo de 1%).

Algumas populações mostraram menor diferença química entre os indivíduos e podem apresentar potencial para trabalhos de melhoramento genético visando estabilidade química na produção de óleo essencial para fitomedicamentos.

3.5. Características dos solos *versus* composição química dos óleos essenciais

Diversos fatores influenciam qualitativamente e quantitativamente a composição química de óleos essenciais: genótipo, parte da planta, localização geográfica do vegetal, período de coleta, secagem e armazenamento do material vegetal, métodos de extração, fatores ambientais e condições edáficas, dentre elas o tipo do solo (EL ALAM *et al.*, 2019). Populações de *L. pinaster* ocorrem em fitofisionomias dos campos represtes e campos de canga de Minas Gerais cujas regiões apresentam características edafoclimáticas distintas. Diante disso, uma análise discriminante (Figura 4) foi realizada em função das características físicas e químicas dos solos das regiões de coleta e as substâncias detectadas nos óleos essenciais das populações estudadas. Esta análise demonstra como as variáveis em conjunto caracterizam as populações, demonstrando quais destes fatores foram diferenciais entre elas. Os fatores comportaram 62,97% da variação dos dados.

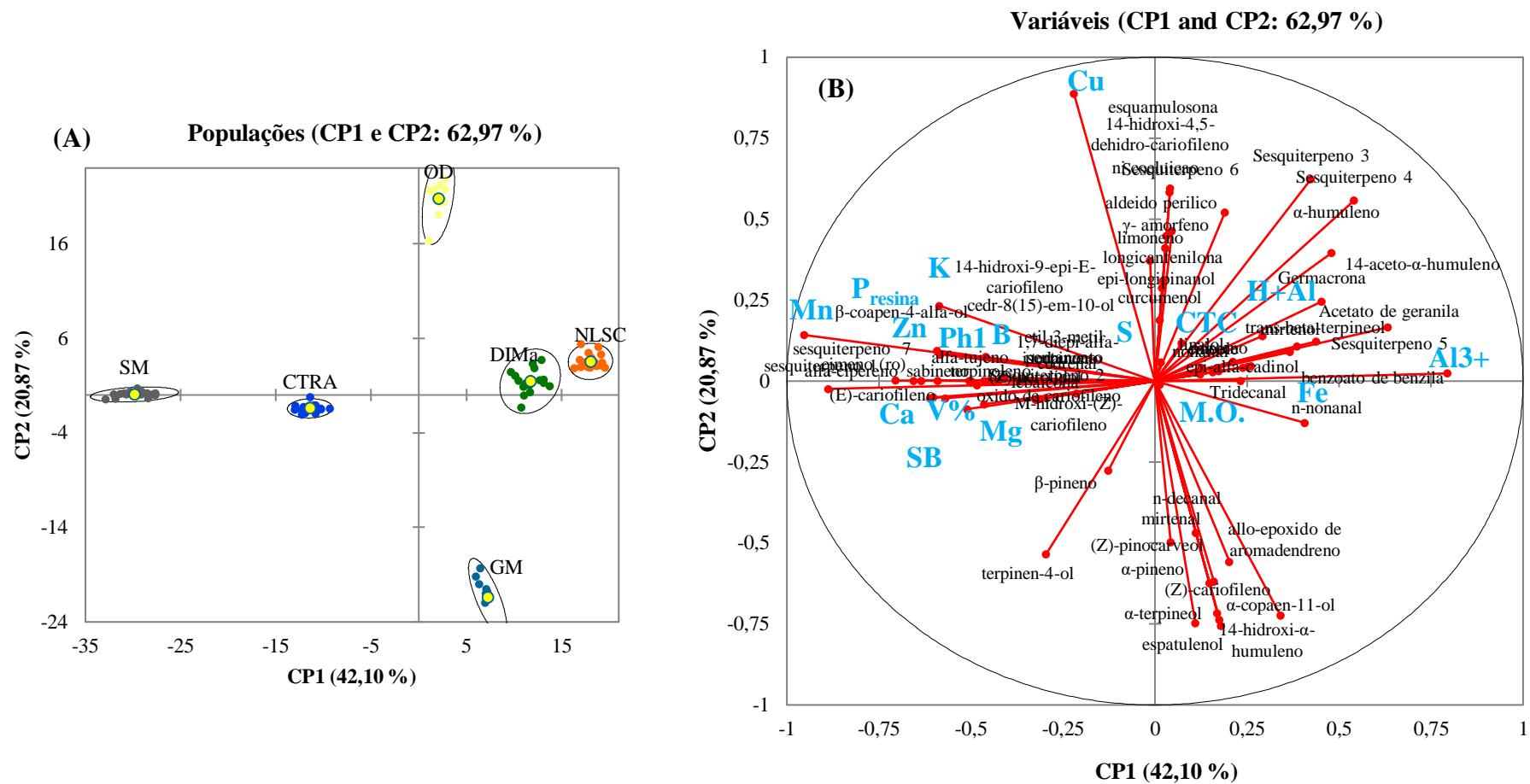


Figura 4 - Gráfico de *scores* (A) e de variáveis (B) da análise discriminante de populações de *L. pinaster* Mart. em função da composição de óleo essencial e das características químicas e físicas dos solos. Detalhe em amarelo, o centróide de cada população e sua elipse de confiança. Ph1=pH; K=potássio, P_{resina}= fósforo, Mn= manganês, Mg = magnésio, Cu = cobre, Ca = cálcio, B= boro, Fe = ferro, Zn = zinco, S = enxofre, Al³⁺ = teores de alumínio (acidez trocável), H+Al = acidez potencial, M.O. = matéria orgânica, V% = saturação com bases, CTC = capacidade de trocas catiônicas, SB = soma de bases trocáveis.

Ao utilizarmos as características físicas e químicas do solo, juntamente aos dados de composição química dos óleos essenciais na análise discriminante, algumas variáveis dos solos contribuíram conjuntamente à determinadas substâncias dos óleos essenciais na diferenciação das populações (Figura 4 – (B) – gráfico de *loadings*).

A figura 4 mostra como as variáveis influenciaram no posicionamento final das populações no gráfico de *scores*, que juntamente com a tabela do teste unidimensional de igualdade de médias (Apêndice 25), demonstram que ocorreram diferenças nas características dos solos em conjunto com as características químicas dos óleos essenciais. O gráfico de *scores* apresenta um agrupamento das populações DIMa e NLSC, enquanto as demais se mantiveram isoladas entre si.

Como demonstrado na caracterização química e física do solo, determinados micro e macronutrientes foram significativos para as diferenciações das populações, como o ferro e o enxofre para NLSC e o manganês e o potássio para SM. A análise discriminante nos permite verificar suas contribuições, juntamente aos compostos dos óleos essenciais, na separação das populações. Estes nutrientes do solo podem influenciar o direcionamento metabólico de produção de compostos especializados, favorecendo uma produção diferencial de certos compostos ou de certas classes destes.

O pH foi uma variável significativa para a população CTRA (mais básico entre os solos analisados, $\text{pH}=6,0 \text{ CaCl}_2$) e isso pode se dever ao cálcio presente em seu solo (que foi uma variável significativa para esta população). O cálcio exerce influência em mais de 30 processos metabólicos, sinalizando processos relativos aos hormônios, luz e patogênese, além de inibir a atividade de certas enzimas, como na síntese de ATP. Estudos indicam que o Ca^{2+} age como mensageiro secundário em processos fisiológicos relativos ao desenvolvimento, crescimento, fotossíntese e situações de estresse, inclusive em função da deficiência de outros nutrientes no solo. Em relação ao metabolismo de defesa dos vegetais, nota-se uma correlação entre o alto suprimento de Ca^{2+} e a expressão de genes de defesa, (HOCHMAL *et al.*, 2015; THOR, 2019; JIN *et al.*, 2018).

O posicionamento de CTRA foi influenciado pelo magnésio (Mg). Tanto Mg quanto Ca^{2+} levam a uma menor absorção de potássio (K) de seu solo, o que pode impactar fisiologicamente pelo fato de K ser um ativador enzimático. O Mg é um componente da molécula da clorofila sendo peça-chave no processo de transferência de energia. Tem forte papel de ativação enzimática e é essencial na ativação de mais de 300 enzimas. O magnésio possui papel central na estabilização da estrutura conformacional de macromoléculas como ácidos nucleicos, proteína, membranas e paredes celulares;

contribui para a homeostase de espécies reativas de oxigênio; é cofator de enzimas fosforilativas e parte importante para as reações das ATPases e de síntese protéica (YAN, HOU; 2018; CHEN *et al.*, 2018; GUO *et al.*, 2016). Este nutriente é componente ou cofator de uma série de enzimas, geralmente envolvidas em reações de oxi-redução, como do citocromo nas reações de transporte de elétrons da fotossíntese e respiração, síntese de DNA e de hormônios vegetais como o etileno e ácido abscísico.

O alumínio (Al^{3+}) apresentou maiores teores em NLSC e GM ($Al^{3+}=16 \text{ mmol/dm}^3$ e 10 mmol/dm^3 , respectivamente), o que contribuiu para a maior acidez registrada em ambas. Este elemento também causa a diminuição de disponibilidade de fósforo (P) no solo, o que pode impactar diretamente o metabolismo de terpenóides dado que o P é base do IPP, unidade básica na construção das moléculas de terpenos. O alumínio compete no processo de absorção com o potássio, o magnésio e o cálcio, além de se mostrar fitotóxico alterando a proliferação celular. Em contrapartida, esse elemento pode levar ao aumento da defesa contra herbivoria e prevenir a toxicidade por ferro (FAQUIN, 2005; PILON-SMITS *et al.*, 2009; HORBOWICZ1, KOWALCZYK; 2011), o que pode ser benéfico para a população NLSC, dado que se encontra na região do Quadrilátero Ferrífero.

A população SM demonstrou diferenciação de vários nutrientes de seu solo em relação às demais (Zn, B, Mn, K e P) e isso se deu juntamente a certos compostos, como n-nonanal, tridecanal e benzoato de benzila, assim as diferenças químicas encontradas no óleo essencial da população podem ter relação com esses fatores nutricionais. SM apresentou o maior teor de zinco (Zn) entre as populações ($Zn = 5,6 \text{ md/dm}^3$). Esse nutriente tem reconhecido papel ativador e de componente enzimático em certas desidrogenases, sintetases, carboxilases e isomerasas, regulando a síntese protéica e polimerização de DNA e RNA, tendo função importante na resposta vegetal contra doenças e pragas. Esse elemento é básico para a atividade da proteína D1 de reparo aos danos causados pela luz no fotossistema II, auxiliando na manutenção do aparato fotossintético, além de participar no metabolismo de auxinas. A ele também são associados redução de efeitos adversos em períodos quentes curtos e estresse salino (SADEGHZAEDH, 2013; CABOT *et al.*, 2019; TSONEV, LIDON; 2012). Seu papel de ativador pode ter levado à maior produção de certos compostos, em detrimento de outros, como demonstrado por Ghorbanpour *et al.* (2016). Ao testar a ação de diferentes níveis de Zn e cobre (Cu) sobre o rendimento e composição do óleo essencial do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), o autor encontrou o aumento da classe de monoterpenos oxigenados e decaimento na proporção de sesquiterpenos oxigenados. Com maiores níveis de Zn, os teores de substâncias como metil chavicol, *E*-citral aumentaram, enquanto do β -elemeno, germacreno D e óxido de humuleno diminuíram. No mesmo estudo, com o aumento dos níveis de cobre (Cu), que no presente estudo com

L. pinaster se mostrou significativo para a população de Olhos D'Água, ocorreu a diminuição de substâncias como sabineno, cis-ocimono, eugenol e o aumento na proporção relativa de linalol. Os compostos t-muuroleno e 1,8 cineol aumentaram nos maiores níveis de Zn e de Cu, enquanto os teores de *E*-citral e *trans*- α -bergamoteno se elevaram com aumento de Zn e diminuíram com o aumento de Cu.

Boro também foi um mineral pelo qual cujo teor se destacou o solo da população SM ($B = 0,56 \text{ md/dm}^3$), sendo que sua influência sobre a composição de óleos essenciais foi registrada para *Arnica montana* L. e *Arnica chamissonis* Less (SUGIER *et al.*, 2017). O aumento de Boro acarretou um aumento da proporção relativa de óxido de cariofileno, (*E*)-cariofileno, germacreno D, dodecanal, cumeno e α -amorfenol, enquanto levou ao decréscimo nos teores de outras substâncias para *A. montana*. Para *A. chamissonis*, boro levou a aumento significativo de α -pineno (atingindo mais que o dobro em relação ao controle), e acarretou maior teores de germacreno D, óxido de cariofileno, *n*-heptadecano e α -cadinol, com queda de produção somente para o *p*-cimeno. Para *A. chamissonis*, as maiores doses de Boro levaram a um aumento na produção de monoterpenos e queda na produção de aldeídos alifáticos (SM foi a população com menor proporção relativa de aldeídos alifáticos). O Boro é importante na atividade meristemática, divisão celular e desenvolvimento radicular; no transporte transmembrana de açúcares e na respiração. Também atua no metabolismo de carboidratos, do RNA e de hormônios vegetais; além de estar envolvido na síntese de uracila, base nitrogenada componente do DNA (HÄNSCH, MENDEL, 2009; SINGH *et al.*, 2019).

O fósforo, outro mineral para o qual SM apresentou o maior teor dentre as populações ($P_{\text{resina}} = 12 \text{ mg/dm}^3$), pode influenciar a composição do óleo essencial. Bajalan (2018) estudou a influência de fatores ambientais, como os nutrientes do solo, sobre o óleo essencial de sete populações de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e encontrou alto índice de correlação ($CC=0,71$) entre o mineral e a cânfora presente nos óleos essenciais de duas populações, com variação entre 21,41% e 25,32% de proporção relativa para as mesmas, assim como de acetato de bornila com CaCO_3 ($CC= 0,49$). Estudos indicam que a concentração de P no vacúolo se relaciona com atividades de enzimas de diferentes vias metabólicas, inclusive no armazenamento molecular de energia e subsequente transferência nas vias metabólicas na forma de ATP (MAATHUIS, 2009).

O potássio (K), significativo para SM ($K = 2,9 \text{ mmol/dm}^3$), teve sua influência sobre a composição de óleo essencial de *Salvia desoleana* Atzei & Picci registrada por Rapposelli e colaboradores (2015) através de experimentos testando diferentes tipos de solo. Foi registrada

correlação significativa ($P < 0,05$) para vários compostos: coeficientes positivos para α -tujeno e terpinoleno (detectados somente em SM), além de germacreno D e biciclogermacreno; e coeficientes negativos para β -careno, acetato de linalila, acetato de terpinila e esclareol. Quanto às classes de terpenos, K mostrou correlação negativa com monoterpenos e diterpenos, porém positiva para sesquiterpenos. Este nutriente é facilmente absorvido dado sua facilidade de atravessar a membrana plasmática, sendo transportado no floema e no xilema e redistribuído facilmente dos tecidos em senescência para os mais novos. Este elemento atua na ativação enzimática de diversas vias como as quinases, transferases e sintetases, auxiliando nas variações conformacionais das mesmas e otimização de seu grau de hidratação, pois auxilia na regulação osmótica vegetal. Além disso, está relacionado com a produção das proteínas em si, sendo que sua limitação pode gerar menor produção das mesmas e acúmulo de compostos nitrogenados solúveis como aminoácidos, amidas e nitratos. O potássio auxilia na abertura estomática, através da promoção de absorção de água pelas células-guardas, o que impacta diretamente na fotossíntese pela abertura possibilitar a captação de CO_2 (FAQUIN, 2005; MCCAULEY *et al.*, 2011).

O enxofre (S) pode influenciar a composição química de óleos essenciais, como o do capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. (ZHELJAZKOV *et al.*, 2011), para o qual levou a uma maior concentração de neral em seu óleo essencial. No presente estudo, Nova Lima/Serra da Calçada (NLSC) registrou o maior teor de enxofre entre os locais analisados ($S = 19 \text{ md/dm}^3$). Esse nutriente é peça-chave na fotossíntese e na síntese de aminoácidos e proteínas e incorporado a estruturas da cisteína, metionina e coenzimas, inclusive sendo parte estrutural de coenzimas que atuam na descarboxilação do piruvato com formação da acetil-CoA, molécula essencial na formação de isoprenos para produção de terpenos. O enxofre também é parte integrante de proteínas fitoquelationas, baseadas em glutatona, que auxiliam na desintoxicação vegetal devido à sua ação de neutralização de espécies reativas de oxigênio e grande afinidade por metais pesados (MAATHUIS, 2009; KHALID *et al.*, 2011; DAVIDIAN, KOPRIVA; 2010).

A população Olhos D'Água (OD) apresentou o maior teor de cobre ($\text{Cu} = 1,0 \text{ md/dm}^3$) entre os solos analisados. Este micronutriente é complexado comumente em compostos orgânicos como aminoácidos, compostos fenólicos e outros quelantes. É importante como ativador ou componente de enzimas de oxi-redução, como o complexo de oxidase do citocromo. É essencial na fotossíntese e respiração mitocondrial para o metabolismo de C e N, para proteção de estresse oxidativo e requerido na síntese da parede celular. Sua deficiência leva a uma diminuição da atividade fotossintética (HÄNSCH, MENDEL, 2009; FAQUIN, 2005).

O ferro (Fe), com maior teor registrado para NLSC ($\text{Fe} = 338\text{mg/dm}^3$) pode ser potencialmente tóxico em altas concentrações, pois sua propriedade de receber e doar elétrons pode catalisar a conversão de peróxido de hidrogênio em radicais livres (MOUSAVI *et al.*, 2011; FAQUIN, 2005; ROOUT, SAHOO; 2015). Este micronutriente também atua sobre as reações de ATP com as fosfoquinases e fosfotransferases, além das descarboxilases e desidrogenases do ciclo de Krebs. Sua limitação no vegetal afeta o fluxo de elétrons do processo de fotossíntese. Tem papel ativador em certas enzimas, embora possa ser substituído pelo Mg (FAQUIN, 2005).

Além do solo, a regulação metabólica da produção de terpenos também é influenciada por estímulos ambientais. Em caso de exposição à microorganismos, o cloroplasto produz diversas moléculas de espécies reativas de oxigênio que alteram o fluxo redox e levam a expressão de genes de defesa. Nestas situações, o cloroplasto também faz a regulação no sentido contrário, regulando o nível desta expressão gênica através do acúmulo da enzima metileritritol ciclodifosfato, intermediária da via MEP de produção de precursores de terpenos e carotenóides. Além disso, essa organela produz uma variedade de compostos orgânicos voláteis (COVs), produtos das vias dos terpenóides, carotenóides, aldeídos e álcoois que podem atuar como sinalizadores na própria planta ou entre vegetais em situações de estresse, infecção ou predação, levando a respostas de defesa, como por exemplo, a emissão de voláteis para atrair predadores de seus inimigos naturais (FERNANDEZ, BURCH-SMITH; 2019; DICKE, 2016).

3.6. Análises quimiométricas dos óleos essenciais

3.6.1. Análises de correlação

A figura 5 apresenta um mapa de calor (*Heatmap*) gerado em função dos coeficientes de correlação das substâncias dos óleos essenciais com as populações de *L. pinaster*.

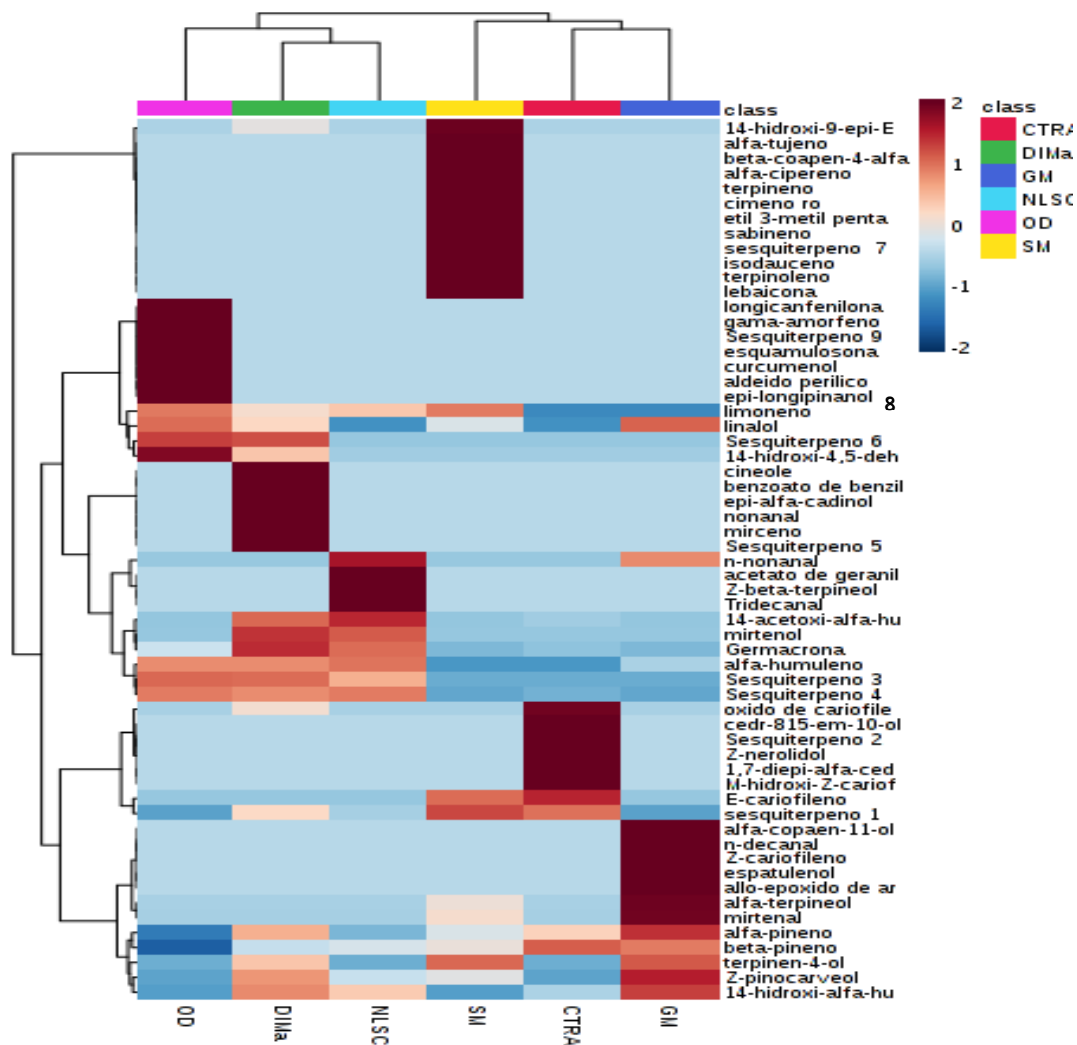


Figura 5 – Heatmap dos compostos dos óleos essenciais em função das populações de *L. pinaster*. OD = Olhos D’Água, DIM^a = Dimantina, NLSC = Nova Lima/Serra da Calçada, SM = Serra da Moeda, CTRA = Caeté/Rio Acima, GM = Grão Mogol.

Os maiores coeficientes de correlação se apresentam em tons escuros, sendo encontrados altos níveis de correlações de alguns compostos por população.

Não foi encontrado padrão em função da região. Entre as populações da Região Norte, as substâncias se destacam na população GM, como mirtenal, (*Z*)-cariofileno, espatulenol, *allo*-epóxido de aromadendreno, não foram significativa para as populações OD e DIMa. Enquanto que entre as oriundas da Região Metropolitana de Belo Horizonte, compostos como o 14-hidroxi-9-epi-(*E*)-cariofileno, lebaicono, terpinoleno, sabineno, isodauceno e sesquiterpeno 7 foram altamente significativos para Serra da Moeda (SM), mas não para CTRA e NLSC. Cada população apresentou um grupo de substâncias diferenciadas que não foram compartilhadas com as demais.

Embora alguns dos compostos significativos sejam os majoritários nas populações, como 14-hidroxi- α -humuleno para Grão Mogol (35,95%), população com maior proporção relativa, isso não foi uma regra pois o n-decanal apresentou média de 0,41% para a população, sendo minoritário. Na análise ele foi significativo porque não foi detectado nas demais. A análise por *heatmap* dos compostos entre si é apresentada na Figura 6.

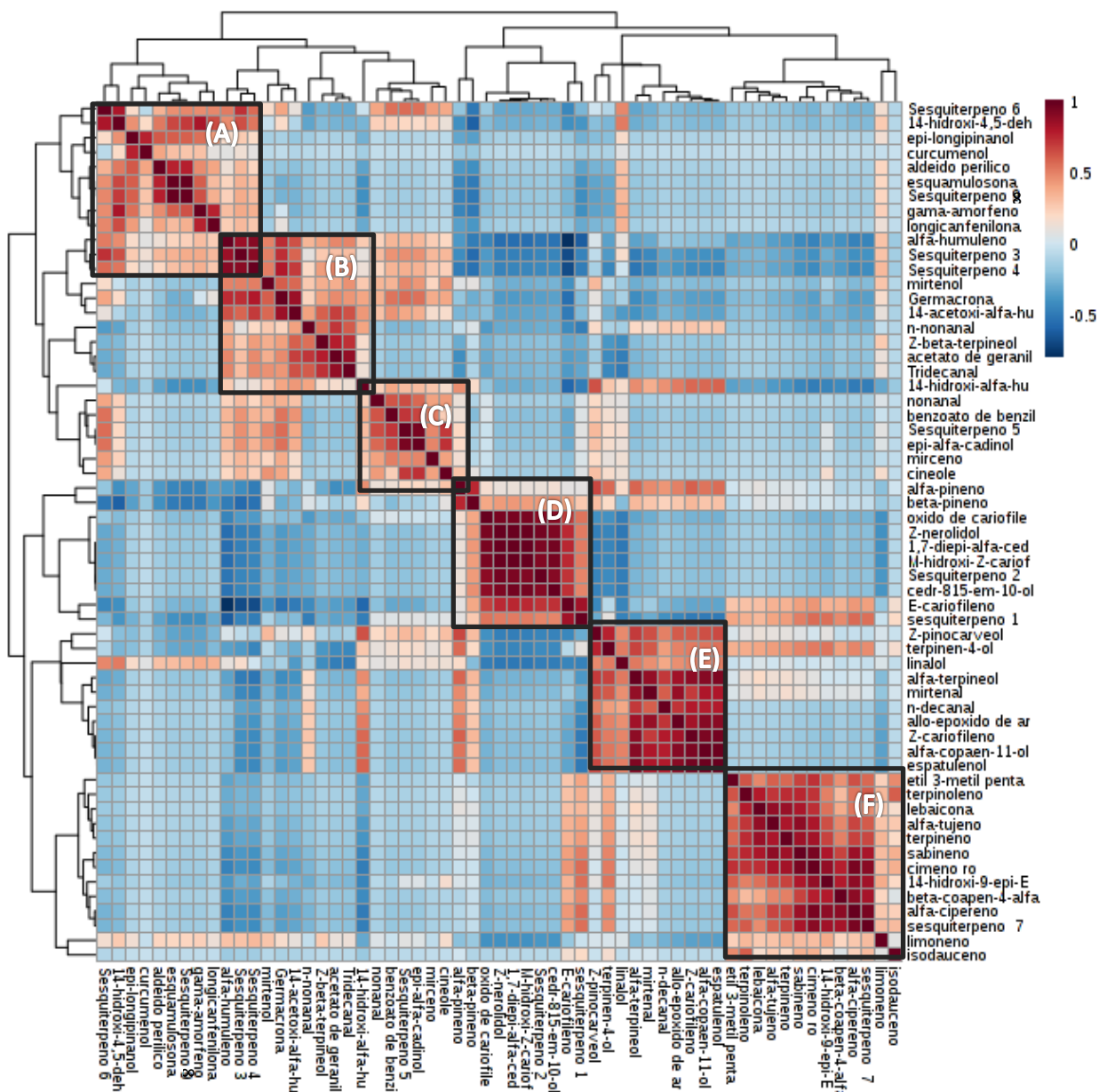


Figura 6 – *Heatmap* resultante da análise de correlação dos compostos presentes no óleo essencial das populações de *L. pinaster*.

O mapa de calor nos traz os níveis de correlação entre as variáveis químicas populações de *L. pinaster*, avaliando par-a-par a relação entre as substâncias e demonstrando como uma variável se comporta em relação à outra. Uma correlação positiva demonstra que os teores das substâncias variam (aumentam ou diminuem) de forma conjunta, enquanto a negativa informa que se o teor um composto aumenta, o do outro tende a diminuir. Nele, observam-se grupos de substâncias correlacionados positivamente (tons de vermelho) e negativamente (tons de azul). Quanto maior o coeficiente de correlação (CC) (em módulo), mais intensa é a cor. No gráfico, a cor é suave indica que o coeficiente de correlação tende a zero (correlação difusa), não se detectando uma correlação entre os compostos analisados.

Ao observarmos os níveis de correlação entre os compostos no mapa (Figura 6), encontramos 6 blocos de compostos que foram altamente correlacionados entre si (grupos de A a F), onde cada grupo correspondeu aos compostos característicos de uma população, indicando que dentre seus perfis quimicamente diversos há a correlação entre compostos por eles apresentados. Ao cruzarmos as informações dos mapas de calor (Figura 5 e 6), podemos inferir como os compostos se relacionam entre si e dentro das populações.

O bloco (A) demonstrou alta correlação positiva entre sesquiterpeno 6 e 14-hidroxi-4,5-dehidro-cariofileno (CC=0,81) (cujos maiores teores observados foram para OD); e para compostos presentes somente nesta população, como sesquiterpeno 8 e esquamulosa (CC=0,99) e entre longicanfenilona e gama-amorfeno (CC=0,77). Em contrapartida, foram detectadas correlações negativas entre compostos, como entre o sesquiterpeno 6 e (*E*)-cariofileno (CC= -0,42). Estes compostos mostraram maiores coeficientes de correlação com a população OD.

Para (B), foram encontradas altas correlações positivas entre: α -humuleno, sesquiterpeno 3, sesquiterpeno 4 e mirtenol (CC entre 0,50 e 0,91); germacrona e 14-acetoxi- α -humuleno (CC= 0,85); tridecanal e acetato de geranila (CC=0,87) Para correlação negativa, temos linalol com (*Z*)- β -terpineno, acetato de geranila e tridecanal (CC entre -0,40 e -0,47). Já estes compostos apresentaram maiores correlações com a população NLSC.

Em (C) foram observadas correlações positivas entre 1,8-cineol, benzoato de benzila, sesquiterpeno 5, mirceno, α -pineno e epi- α -cadinol. Estas substâncias, por sua vez, apresentaram coeficientes de correlação importantes para com a população DIMa.

Em (D) os compostos correlacionados entre si foram: α e β -pineno; óxido de cariofileno; (*Z*)-nerolidol; 1,7-diepi- α -cedrenal; 14-hidroxi-(*Z*)-cariofileno; sesquiterpeno 2; cedr-8,15-en-10-ol; (*E*)-cariofileno e sesquiterpeno 1. Correlações negativas foram encontradas entre (*Z*)-pinocarveol, linalol e e terpine-4-ol; α -humuleno, sesquiterpeno 3 e sesquiterpeno 4. Estas variáveis tiveram coeficientes de correlação mais significativos para a população CTRA.

Para o bloco (E) foram encontradas correlações positivas entre α -terpineol, mirtenal, n-decanal, *allo*-epóxido de aromadendreno, (*Z*)-cariofileno, α -copaen-11-ol e espatulenol. Além destes, (*Z*)-pinocaveol se mostrou correlacionado com terpinen-4-ol, α -terpineol e mirtenal. As substâncias citadas mostraram correlação intensa com a população GM.

No bloco (F), os compostos correlacionados entre si foram etil-3-metil-pentanoato; terpinoleno; lebaicona; α -tujeno; terpineno; sabineno; o-cimeno; 14-hidroxi-9-epi-(*E*)-cariofileno; β -copaen-4- α -ol; α -cipereno e sesquiterpeno 7. Este último bloco traz substâncias com demonstradas correlação com a população SM.

Quimicamente além das diferenças entre as populações, encontramos também altos níveis de correlação de certos compostos para cada uma delas, o que nos possibilita a caracterização do perfil químico populacional em função deles.

3.6.2. Análise de componentes principais

Buscando compreender melhor a dissimilaridade entre as populações e regiões, bem como as substâncias que contribuem para a diferenciação, realizamos já análise de componentes principais. A análise de componentes principais 3D (Figuras 7) demonstrou a formação de quatro grupos entre as populações, em função do grau de similaridade química entre elas, considerando as três primeiras componentes principais e comportando 55,1% da variação dos dados.

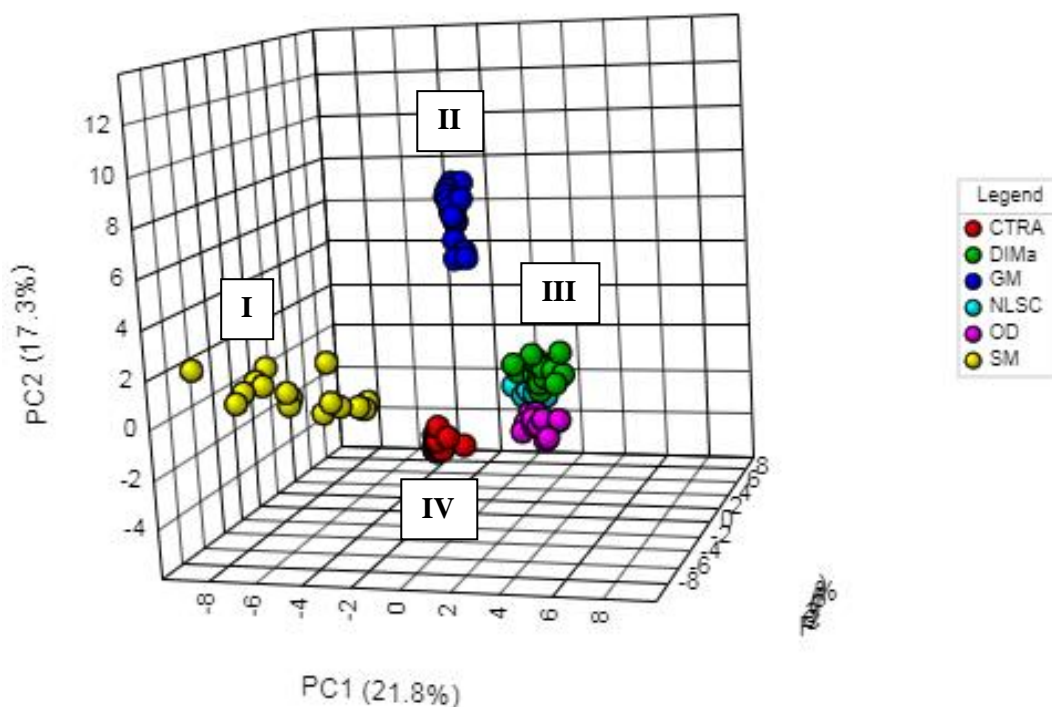


Figura 7 – Scores das amostras de óleos essenciais das populações de *L. pinaster* de diferentes regiões do estado de Minas Gerais, Brasil, 2017.

Na análise foram formados quatro grupos, sendo possível observar quais substâncias foram determinantes para a formação dos grupos na ACP através da observação dos *loadings* no gráfico e de sua tabela de valores para as variáveis (Apêndices 26 e 27). Novamente, as populações GM, SM e CTRA não participaram de nenhum agrupamento e cada uma se dispersou em direção contrária as demais, devido aos vetores resultantes.

As populações DIMa e OD, da região norte, se agruparam com NLSC, da região metropolitana de Belo Horizonte. Isso demonstra que, de acordo com a variação dos dados comportada por CPs 1 e 2, OD, DIMa e NLSC apresentaram similaridade química, gerando uma disposição próxima de suas amostras, apesar de pertencerem a diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, com 273 km de distância entre elas. NLSC não se mostrou quimicamente próxima a SM e CTRA, apesar das três pertencerem a mesma região de Minas Gerais (região metropolitana de Belo Horizonte), enquanto que GM se mostrou diferente das demais populações do norte do estado de Minas Gerais.

No agrupamento das populações, determinados compostos contribuíram para a alocação final de cada uma delas. Os *loadings* demonstram que substâncias detectadas somente em uma dada

população contribuíram significativamente no posicionamento da mesma no espaço dimensional dos dados. Por exemplo, na população Grão Mogol (GM), o α -terpineol, mirtenal, espatulenol, α -copaen-11-ol; *allo*-epóxido de aromadendreno levaram ao isolamento desta população em relação as demais devido a seus valores quase nulos na CP1, porém positivos nas CP2 e CP3.

O agrupamento de CTRA se deveu ao óxido de cariofileno; sesquiterpeno 2 e cedr-8,15-en-10-ol, não detectados nas demais populações, com *loadings* negativos para CP1 e CP2 e valores positivos para CP3. SM, por sua vez, teve seu agrupamento determinado por: ρ -cimeno; 14-hidroxi-9-epi-(*E*)-cariofileno; sabineno; α -cipereno; β -copaen-4- α -ol; terpineno; lebaicono; terpinoleno; etil-3-metil-pentanoato e α -tujeno, com valores de *loadings* negativos para CP1 e CP3, sendo quase nulos para CP2.

Além dos compostos presentes em somente em uma população, outras substâncias comuns a mais de uma população influenciaram o posicionamento final dos *scores*, como o (*E*)-cariofileno para SM e CTRA, ambas da Região Metropolitana de Belo Horizonte, que com seus valores de *loadings* negativos para as três componentes principais contribuiu no posicionamento na parte inferior esquerda do gráfico.

As populações de Nova Lima/Serra da Calçada (NLSC), Diamantina (DIMa) e Olhos D'Água (OD) se agruparam estreitamente, porém não houve mistura entre suas amostras no gráfico de *scores* (Figura 16). Substâncias como 14-hidroxi-4,5-dehidro-cariofileno; sesquiterpeno 6; acetato de geranila; (*Z*)- β -terpineol; benzoato de benzila; sesquiterpeno 5; germacrona; α -humuleno; sesquiterpeno 3; sesquiterpeno 4, tiveram valores positivos para a CP1 ($\geq 0,099$) e negativos para as demais CPs, com vetores que projetam as amostras das três populações para o canto direito inferior.

Alguns compostos tiveram valores quase nulos ($\geq |0,098|$) para as três componentes principais como curcumenol; epi-longipinanol; longicanfenilona; aldeído perílico; esquamulosa; sesquiterpeno 8; γ -amorfenol; nonanal; mirceno.

3.7. Análises genéticas de populações de *L.pinaster* Mart. oriundas de diferentes regiões do estado de Minas Gerais

Para as análises genéticas foram consideradas nove populações naturais de *L. pinaster* distribuídas entre três regiões do estado de Minas Gerais: seis populações coletadas no ano de 2017 (GM, OD e DIMa da região norte e SM, CTRA e NLSC da região metropolitana de Minas Gerais) e três da região do Campos das Vertentes, que ficam ao sul do estado.

O DNA dos indivíduos de *L. pinaster* foi extraído e processado para obtenção do padrão de pureza e normalização necessários na produção de biblioteca para o sequenciamento de nova geração. Em função do tempo de armazenamento e tipo de processamento das amostras após sua coleta, a extração resultou em números diferentes de indivíduos com DNA obtido entre as populações (Tabela 4). As amostras das regiões norte e metropolitana de Belo Horizonte foram coletadas em 2017, enquanto as do Campo das Vertentes foram coletadas em 2011. Após o sequenciamento, foram retidas amostras de DNA de 147 indivíduos de *L. pinaster* para realização das análises genéticas.

Tabela 4 – Número de amostras de DNA de indivíduos de *Lychnophora pinaster* Mart de diferentes regiões do estado de Minas Gerais sequenciadas e selecionadas após filtragem.

População	Campos das Vertentes			Região Metropolitana de Belo Horizonte			Região Norte		
	AB	SA	SS	CTRA	NLSC	SM	GM	OD	DIMa
Sequenciados (n)	9	14	13	16	16	25	16	15	23
Selecionados (n)	6	10	11	16	14	25	7	15	23

Após o sequenciamento do DNA, os dados genéticos foram processados para filtragem e seleção dos SNPs, resultando em um total de 127 indivíduos selecionados para análises genéticas de populações. Dentre os dados dos indivíduos foram selecionados 3.441 SNPs.

Os números de indivíduos de AB (n=6) e GM (n=7) foram menores se comparados com as demais populações, porém isso não limita a qualidade dessas amostras no uso para estudo de genética de populações baseados em SNPs. Nazareno (2017), ao estudar populações da espécie amazônica *Amphirrhox longifolia*, testou o uso de diferentes números de indivíduos em análises de diversidade genética com uso de SNPs, registrando a influência do *n* amostral sobre os índices de diversidade genética. O autor constatou que se utilizados a partir de 1500 SNPs é possível obter um índice F_{ST} acurado mesmo com utilização de somente dois indivíduos por população (n=2) em função da profundidade de leitura que a técnica permite. Como contamos com 3441 SNPs, o tamanho amostral

das populações AB e GM se mostrou suficiente para que as mesmas fossem consideradas em nossas análises genéticas.

3.7.1. Diversidade e estrutura genômica das populações

Os índices de diversidade genética (Tabela 5) demonstram que heterozigosidade média observada ($H_O=0,0502$) foi menor que a esperada ($H_E=0,0599$), indicando que a população não se encontra em estado de equilíbrio de Hardy-Weinberg e apresenta um déficit de heterozigotos nas populações. AB apresentou os menores índices de heterozigosidades observada e esperada ($H_O=0,0308$ e $H_E=0,0304$), enquanto os maiores índices foram observados em CTRA ($H_O=0,07893$ e $H_E=0,0980$). Dentre as populações, AB foi a única para qual $H_O=H_E$.

Tabela 5 – Estimativa dos índices de diversidade genética obtidos para as nove populações de *L.pinaster*. Em negrito, estão os valores extremos, menores e maiores.

Local de coleta	Sigla	Região	H_O	H_E	F_{IS}	A_P	S_p	L_p
Grão Mogol	GM	RN	0,03347	0,04272	0,115309	3,11554	3,15153	3,24818
Olhos D'Água	OD	RN	0,05396	0,06506	0,128803	5,41126	11,24938	4,90094
Diamantina	DIMa	RN	0,06944	0,0784	0,096061	7,40144	20,01941	6,61743
Caeté	CTRA	RMBH	0,07893	0,09809	0,14083	5,90614	11,76261	5,83993
Nova Lima	NLSC	RMBH	0,0476	0,06099	0,159512	5,6899	8,94687	5,66465
Serra da Moeda	SM	RMBH	0,06358	0,07088	0,086765	6,29853	22,34163	5,85686
Areia Branca	AB	CV	0,03084	0,0304	-0,03084	1,22497	4,10429	1,18863
Serra da Arnica	SA	CV	0,03591	0,04236	0,104147	2,25777	8,16544	2,15578
Serra do Sofá	SS	CV	0,03661	0,0432	0,10416	3,15348	7,86944	3,02803
Média			0,0502	0,0599	0,1632	1,22497	10,8456	4,277

H_O = heterozigosidade observada; H_E = heterozigosidade esperada e F_{IS} = coeficiente de endogamia, A_P =alelos privados, S_P =sítios polimórficos, L_P =Loci polimórficos.

Os resultados encontrados para as heterozigosidades esperada e observada vão ao encontro dos registrados em estudos anteriores de genética de populações de *L. pinaster* via marcadores microssatélites. Haber (2008), ao caracterizar a diversidade genética de três populações de *L. pinaster* do sul de Minas Gerais (Campos das Vertentes), registrou que as heterozigosidades observadas (H_o) foram menores que as heterozigosidades esperadas (H_E), o que também foi relatado por Vieira (2014) para outras populações. Viera não encontrou grande variação genética entre as três populações e mais de 50% dos locos avaliados não se encontravam no equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando a existência de endogamia nas populações.

A população com maior número de alelos privados foi Diamantina (7,40). As médias de alelos privados foram diferentes em função da região: $A_P=5,96$ para a região metropolitana de Belo Horizonte (maior média); $A_P=5,30$ para a região norte e $A_P=2,12$ para Campos das Vertentes (menor média).

Silva (2016) caracterizou a diversidade genética de seis populações de *L. pinaster*, cinco da região de Campos das Vertentes e uma da região Metropolitana de Belo Horizonte (Poço Bonito, Serra do Sofá, Serra da Arnica, Serra do Salto, Serra Branca, Areia Branca e Ouro Branco), reportando que a população de Ouro Branco, mais distante das demais (cerca de 150 Km), apresentava 07 alelos privados. A heterozigosidade esperada (H_E) das populações variou entre 0,484 e 0,647. A heterozigosidade observada (H_o) oscilou entre 0,352 e 0,551. A heterozigosidade média observada (H_o) foi menor que a esperada (H_E), novamente indicando endogamia populacional. Segundo o autor, as populações não se mostraram afetadas antropogenicamente de uma mesma forma. Nas populações de Serra da Arnica, Serra Branca e Poço Bonito, nenhum dos locos observados se apresentou no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O alto valor médio do coeficiente de endogamia total ($F_{IT}= 0,76435$) indica que há grande número de locos em homozigose nas populações de *L. pinaster*, tanto pela média do coeficiente de endogamia intrapopulacional, que é significativamente maior que 0 ($F_{IS}=0,1632$), mas principalmente pelo alto valor médio do coeficiente de endogamia devido à subdivisão das populações ($F_{ST}=0,7203$). Estes índices foram congruentes com os encontrados em estudos genéticos de populações naturais de *L. pinaster* utilizando marcadores moleculares microssatélites (HABER, 2008; VIEIRA, 2014; SILVA et al., 2016). Em relação ao sistema reprodutivo, a taxa de cruzamento aparente ($T_a= 0,7279$) aponta que para a espécie é misto, como registrado anteriormente por Silva (2016) em estudo com marcadores microssatélites.

Quanto à subdivisão, as populações de uma mesma região apresentaram menor diferenciação genética com valores menores de F_{ST} par-a-par (Figura 8). Em função de seus valores, o dendrograma gerado traz as populações agrupadas em três clados, não ocorrendo mistura entre populações de diferentes regiões.

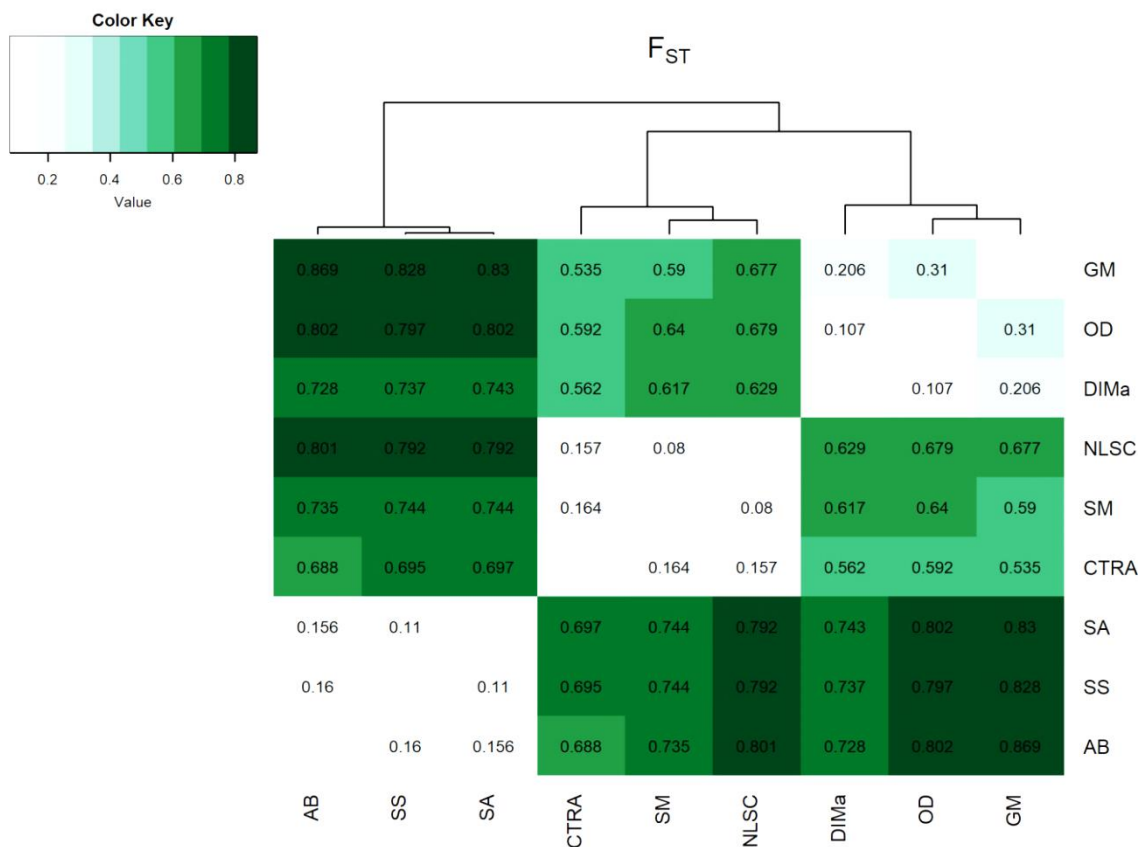


Figura 8– Heatmap e dendrograma em função dos valores de F_{ST} par-a-par entre as populações de *L. pinaster*. Região Norte= GM, DIMa e OD; Região Metropolitana de Belo Horizonte = NLSC, CTRA e SM e Campos das Vertentes = AB, SA e SS.

O maior valor de F_{ST} par-a-par encontrado (0,869) foi entre GM (região norte) e AB (Campo das Vertentes), revelando maior diferenciação genética entre essas populações, enquanto o menor valor (0,08) foi entre SM e NLSC, ambas da região metropolitana de Belo Horizonte. Valores de $F_{ST} > 0,20$ são considerados altos, sendo que acima de $F_{ST} > 0,5$ podem indicar que os indivíduos pertencem a unidades evolutivas distintas no caso de populações panmíticas.

Em relação à estruturação genética das populações, a análise de componentes principais resultou em um agrupamento das populações em função da região, formando três grupos (Figura 9).

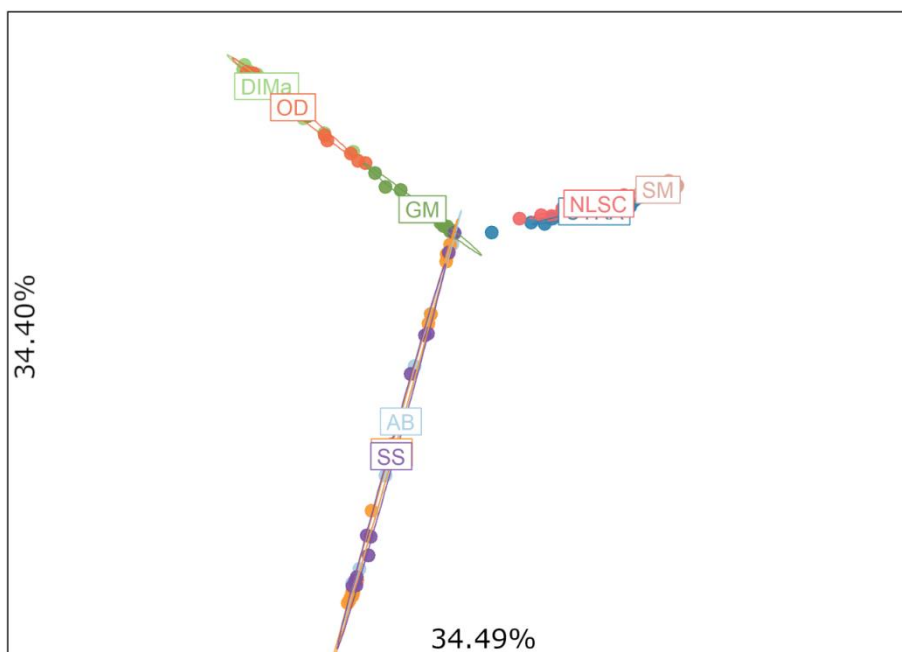


Figura 9– Análise de componentes principais a partir dos SNPs encontrados entre as nove populações de *L. pinaster*. Região Norte= GM, DIMa e OD; Região Metropolitana de Belo Horizonte = NLSC, CTRA e SM e Campos das Vertentes = AB, SA e SS.

As CPs 1 e 2 comportaram 68,89% da variação dos dados e em função das variáveis genéticas (SNPs) e as populações se agruparam em vetores ficando agrupadas por região.

A análise discriminante de componentes principais (ADCP) maximiza as diferenças comportando as amostras em classes distintas. Novamente a distribuição das populações se deu em função da região (Figura 10). Dado o gradiente nos valores de F_{ST} par-a-par e os resultados da ACP e da ADCP percebe-se que as populações se apresentam mais similares dentro de uma mesma região.

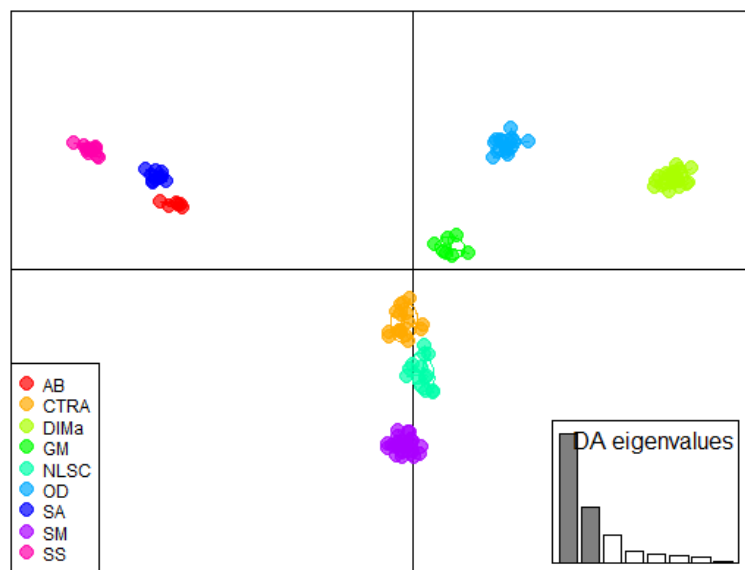


Figura 10 – Análise discriminante de componentes principais a partir dos SNPs encontrados entre as nove populações de *L. pinaster*. Região Norte= GM, DIMa e OD; Região Metropolitana de Belo Horizonte = NLSC, CTRA e SM e Campos das Vertentes= AB, SA e SS.

A análise bayesiana (Figura 11) resultou na formação de seis grupos entre as populações), que não exibiram um padrão de agrupamento por região: as do norte formaram dois grupos (um para GM e OD e outro para DIMa); as da região metropolitana de Belo Horizonte não se agruparam, se mostrando diferentes entre si; enquanto as populações de Campos das Vertentes (Sul) formaram um único grupo.

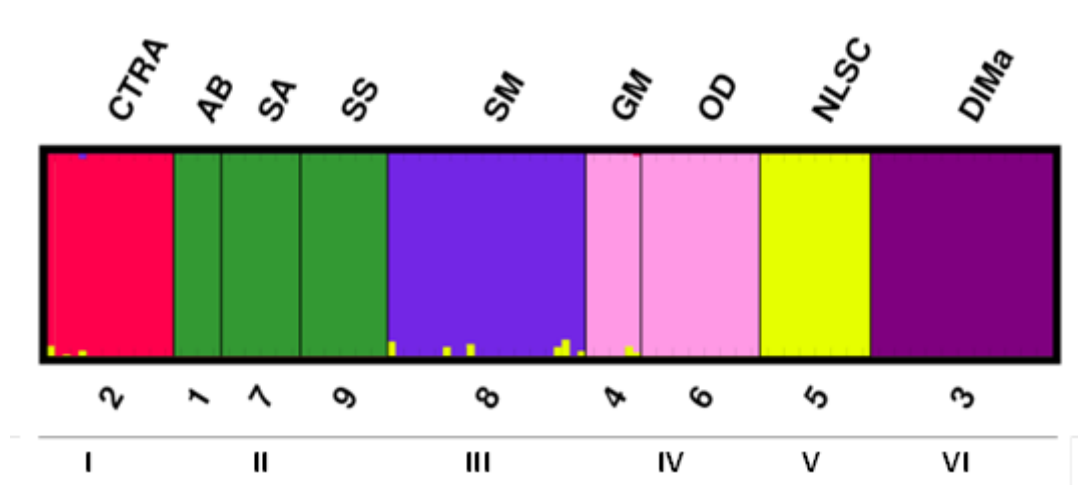


Figura 11 – Atribuição Bayesiana de 127 indivíduos de *L. pinaster* em *clusters* genéticos via STRUCTURE. Números romanos correspondem aos *clusters* formados pelas populações. Região

Norte = GM, OD e DIMa; Região Metropolitana de Belo Horizonte = CTRA, NLSC e SM; Campos das Vertentes = AB, SA e SS.

Observa-se que há pouco compartilhamento de alelos de SNPs entre as populações de diferentes regiões, ocorrendo mínimo compartilhamento entre as populações pertencentes à região metropolitana de Belo Horizonte entre si e a população GM (região norte).

O agrupamento isolado das populações de Campos das Vertentes (CV) corrobora com os dados encontrados por Haber (2008) e Silva (2016) através de marcadores microsatélites. Haber encontrou o compartilhamento de alelos para três populações de CV e Silva, por sua vez, avaliou a estruturação de 5 populações da mesma região e uma da região metropolitana de Belo Horizonte e registrou a formação de dois *pools* gênicos, sem haver mistura entre as populações das diferentes regiões.

As populações de Campos das Vertentes se encontram em área de relevo mais ameno e com as menores distâncias médias entre as populações (25,9km), o que pode ter contribuído para a formação de um único grupo. O agrupamento evidencia maior fluxo gênico entre as populações e pode ter contribuído para seu menor número médio de alelos privados quando comparado às demais regiões ($A_P=2,12$). A região metropolitana de Belo Horizonte, que não exibiu agrupamento entre suas populações, apresentou maior número médio de alelos privados ($A_P=5,96$), o que evidencia menor fluxo gênico entre elas e com as demais.

A estrutura geográfica de habitats afeta a frequência alélica no espaço e conseqüentemente as proporções de diferentes genótipos nas populações locais, o que leva ao efeito Wahlund, definido como excesso de homozigotos ou déficit de heterozigotos em uma vasta amostragem de indivíduos em populações estruturadas e que pode levar a subestruturação de populações e desequilíbrio de ligação entre os locos (GARNIER-GÉRÉ, CHIKHI; 2013). As populações da região metropolitana de Belo Horizonte se encontram em área mais acidentada, com grandes formações de altitudes em seus locais de coleta (de 1366m a 1497m). Além disso, a região é muito populosa e as áreas de vegetação nativa sofrem pressão antrópica tanto para habitação quanto para exploração de recursos naturais, como os minérios. A ação mineradora é bem intensa na região, o que levou à alteração da paisagem, causando impactos ambientais, entre eles o desmatamento. A fragmentação de áreas de vegetação em decorrência da ação humana ou de processos geológicos causa diminuição da área de

habitat de populações, favorecendo sua subdivisão em populações menores, o que pode levar a uma perda direcional da diversidade genética, deriva genética e diminuição ou ausência de fluxo gênico, gerando maior diferenciação entre as mesmas, redução do tamanho populacional e aumento da endogamia. Em situações como essa, as populações vegetais podem apresentar perda de *fitness* e viabilidade (LU *et al.*, 2019).

A análise de isolamento por distância via teste de Mantel (Figura 12) revelou correlação positiva entre a distância geográfica e a distância genética ($r=0,7063$; $p=0,0055$), demonstrando que há a estruturação genética em função da distância.

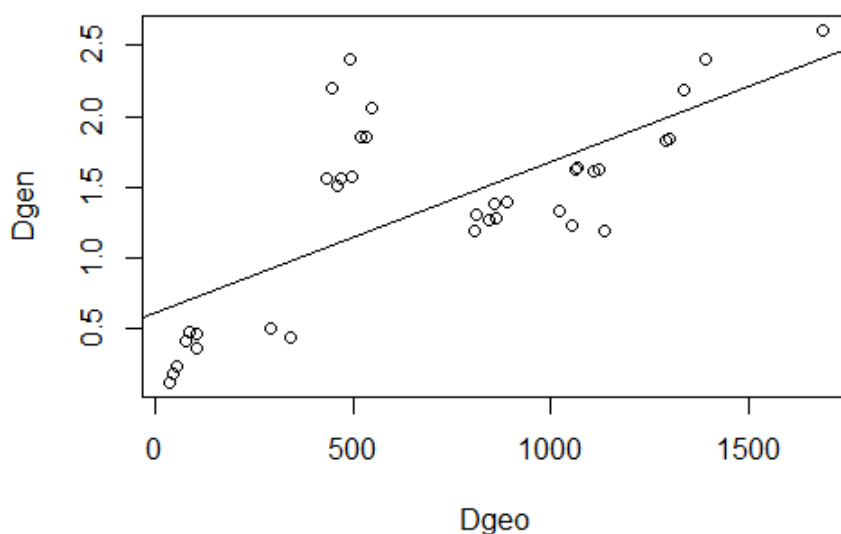


Figura 12 – Análise de isolamento por distância via teste de Mantel entre as populações de *L. pinaster*.

Além do relevo a ausência de polinizadores nas regiões pode influenciar o fluxo gênico. Campos (2014) realizou o levantamento dos polinizadores em populações nativas de *L. pinaster* na região de Carrancas e Itumirim e registrou a atividade polinizadora de abelhas *Bombus morio* (Swederus) e *Xylocopa frontalis* (Olivier), além de mais dez insetos com comportamento potencialmente polinizador. Os locais de amostragem de Campos são da região de Campos das Vertentes, de onde são oriundas as populações SS, SA e AB, onde o compartilhamento de SNPs gerou um único agrupamento para a região na análise STRUCTURE. Estudos futuros de levantamento de polinizadores nas demais regiões estudadas podem auxiliar na compreensão da dinâmica de fluxo gênico entre suas populações.

A destruição de ambientes naturais e o aumento do uso de terras aceleraram em 500 vezes o desaparecimento mundial de espécies vegetais, comparando-se a taxa de extinção em condições ambientais isoladas, sendo as áreas de grande biodiversidade e população em crescimento como o Brasil, Madagascar, Índia e África do Sul as regiões com maior risco de extinção de espécies. A fragmentação, degradação e perda de habitats são os principais fatores da extinção e neste cenário, muitas espécies sobrevivem em densidade populacional muito baixa, sendo consideradas ecologicamente ou funcionalmente extintas (LEFORD, 2019; VALIENTE-BANUET *et al.*, 2015). Em época de rápida perda de *habitat* e mudanças climáticas, estudos de diversidade genética são de extrema importância para caracterização das populações para fins conservacionistas, assim como para auxiliar na compreensão das forças ambientais responsáveis pela modulação da diversidade genética. Informações sobre níveis e distribuição da variação genética não estão disponíveis para espécies raras ou ameaçadas e essa deficiência dificulta o estabelecimento de planos efetivos para conservação e seleção de estratégias de manejo para proteger e manter suas populações ou incrementar sua diversidade genética (SZCZECIŃSKA *et al.*, 2016), como no caso de *L. pinaster*.

A compreensão e caracterização acurada de recursos genéticos, assim como a utilização destes em estudos de melhoramento da espécie, são limitadas em função da abundância de recurso disponível. Uma seleção eficiente dos recursos genéticos pode ser alcançada utilizando o conceito de coleção *core*, que promove o uso de grupos de genótipos para representar toda uma coleção com o mínimo de repetitividade (BASAK *et al.*, 2019). Nesse sentido, considerando os resultados químicos e genéticos, as populações do presente estudo despontam como interessantes fontes de recursos genéticos para futuros estudos de seleção de fenótipos e pré-melhoramento da espécie, dadas as variações encontradas entre si e entre regiões.

3.7.2. Diversidade da composição química dos óleos essenciais *versus* diversidade genética das populações de *Lychnophora pinaster* Mart. das diferentes regiões

Ao confrontarmos os resultados dos estudos químicos e genéticos das populações das diferentes regiões do estado de Minas Gerais, encontramos uma convergência entre os resultados. Os estudos químicos prévios dos óleos essenciais das populações de *L. pinaster* da região de Campos das Vertentes (ao sul de Minas Gerais) registraram a predominância de compostos da classe dos fenilpropanóides e o (*E*)-cinamato de metila como substância majoritária, o que não foi observado

nas demais regiões aqui estudadas. Da mesma forma, suas populações se agruparam estreitamente nas análises genéticas em função dos SNPs encontrados neste estudo, formando um único grupo e não apresentando compartilhamento de SNPs com as demais regiões. A divergência química em relação às demais populações pode se dever, dentre outros fatores, às diferenças genéticas detectadas neste estudo.

Similarmente, os resultados da composição química dos óleos essenciais e genéticos das populações da região metropolitana de Belo Horizonte demonstram a dissimilaridade entre as mesmas, pois não ocorreram agrupamentos entre as populações em ambos os estudos, demonstrando alto grau de diversidade genética e entre seus óleos essenciais na região. Ocorreu mínimo compartilhamento de SNPs entre as populações desta região e a população GM, da região norte.

As populações da região norte sofreram diferentes agrupamentos em função dos estudos. GM e OD agruparam-se em função dos SNPs encontrados nas análises genéticas, enquanto as análises dos óleos essenciais resultaram no agrupamento de DIMa e OD com NLSC, da região metropolitana de Belo Horizonte.

Os SNPs aqui levantados serão utilizados em esforços futuros na busca de funções biológicas já descritas em bancos de sequências genéticas (*Blast2go*), o que contribuirá no aprofundamento da análise genética das populações e na caracterização do compartilhamento das sequências genéticas com função biológica já descrita.

Estudos futuros são necessários para elucidar a relação entre as diversas sequências levantadas via marcador molecular SNP neste estudo e a diversidade química encontrada para os óleos essenciais das populações das diferentes regiões. Os resultados aqui encontrados demonstram que a espécie apresenta potencial para futuro melhoramento vegetal visando a produção de óleos essenciais com diferentes quimiotipos para fins terapêuticos. Em relação à diversidade genética, se faz necessário o estabelecimento de um banco de recursos genéticos da *L. pinaster*, dados seu endemismo, pressão antrópica de desmatamento e de extrativismo sofrida em decorrência ao seu uso popular medicinal e ao déficit de heterozigotos nas populações, o que pode levar à perda de *fitness*, colaborando para o declínio populacional e ameaça à sobrevivência da espécie.

4. CONCLUSÕES

A composição química e rendimento dos óleos essenciais de populações de *L. pinaster* Mart. de ocorrência nas regiões norte e metropolitana de Belo Horizonte, apresentaram divergências, intrapopulacional e enterpopulacional.

Os resultados deste estudo, em conjunto com os de estudos prévios descritos na literatura, sugerem a ocorrência de diferentes quimiotipos para o óleo essencial de populações de *L. pinaster*. As diferenças químicas entre os perfis dos óleos essenciais das populações revelam que não ocorreu padrão de fenótipo químico em função da região de origem

Os solos dos locais de coleta exibiram diferenças químicas e físicas entre si. Na análise conjunta das características dos solos e da composição dos óleos essenciais, determinados nutrientes e substâncias dos óleos essenciais se mostraram concomitantemente significativos na diferenciação das populações.

As populações exibiram diferentes níveis de diversidade genética, porém a maioria apresentou déficit de heterozigotos. A região com maior diferenciação genética entre as populações foi a região metropolitana de Belo Horizonte, as quais se mostraram altamente estruturadas, com mínimo compartilhamento de SNPs.

Foram encontradas diferenças genéticas em função das regiões e entre as de uma mesma região, sendo que a distância geográfica entre as populações e a endogamia contribuíram para a distância genética entre elas. Os dados genéticos foram ao encontro dos dados químicos, onde os agrupamentos resultantes das análises genéticas foram similares aos encontrados no estudo da composição química dos óleos essenciais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAH GHASEMI PIRBALOUTI; LYLE E. CRAKER. Diversity in chemical compositions of essential oil of myrtle leaves from various natural habitats in south and southwest Iran. **Journal Forest Research**, vol.26 (4), p.971–981, 2015.

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**, 13, 270, 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, jul./ago. 2011.

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

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 804 p., 2017.

ADELEKE, R.; NWANGBURUKA, C.; OBOIRIEN, B. Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review. **South African Journal of Botany**, vol.108, p.393-406, 2017.

AGOSTINI-COSTA, T.S.; VIEIRA, R.F.; BIZZO, H.R.; SILVEIRA, D.; GIMENES, M.A. Secondary Metabolites. **Chromatography and its applications**.

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**, São Paulo, SP. v 30, n 3, p 37-45. 2005.

ALIZADEH A., KHOSHKHUI M., JAVIDNIA K., FIRUZI O., TAFAZOLI E., KHALIGHI A. Effects of fertilizer on yield, essential oil composition, total phenolic content and antioxidant activity in *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) cultivated in Iran. **J. Med. Plants Res.**, v.4, n.1, p.33-40, 2010.

ASTANI, A.; SCHNITZLER, P. Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro. **Uranian Journal of Microbiology**, v.6, n.3, p.149-155, jun.2014.

AZEVEDO, U.R.; MACHADO, M.M.M., CASTRO, P.T.A.; RENGER, F.E.; TREVISOL, A.; BEATO, D.A.C. Geoparque Quadrilátero Ferrífero (MG) – proposta. In: SCHOBENHAUS, C.; SILVA, C.R. **Geoparques do Brasil: propostas**. CPRM, 2012.

BASAK,M.; UZUN,B.; YO, E. Genetic diversity and population structure of the Mediterranean sesame core collection with use of genome-wide SNPs developed by double digest RAD-Seq. **PlosOne**, p.1-15, out. 2019.

BEHJATI, S.; TARPEY, S.T. What is next generation sequencing? **Arch Dis Child Educ Pract Ed**, v.98, p.236-238, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>

BO YAN, YING HOU. Effect of Soil Magnesium on Plants: a Review. IOP Conf. Series: **Earth and Environmental Science**, vol. 170, 2018.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H., KING, R. M. α -Humulene derivatives including a sesquiterpene acid with a rearranged carbon skeleton from *Lychnophora columnaris*. **Phytochemistry**, v.21, n.3, p. 685-689, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2012

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BURNHAM, M.B.; CUMMING, J.R.; ADAMS, M.B.; PETERJOHN, .W.T. Soluble soil aluminium alters the relative uptake of mineral nitrogen forms by six mature temperate broadleaf tree species: possible implications for watershed nitrate retention. **Oecologia**, n.185, p.327-337, 2017.

BUTLER, J.B; FREEMAN, J.S.; POTTS, B.M.; VAILLANCOURT, R.E.; GRATTAPAGLIA, D.; SILVA-JUNIOR, O.B.; SIMMONS, B.A.; HEALEY, A.L.; SCHMUTZ, J.; BARRY, K.W.; LEE, D.J.; HENRY, R.J.; KING, G.J.; BATEN, A.; SHEPHERD, M. Annotation of the *Corymbia* terpene synthase gene family shows broad conservation but dynamic evolution of physical clusters relative to Eucalyptus. **Heredity**, v.121, p.87–104, 2018.

CABOT, C.; MARTOS, S.; LLUGANY, M; GALLEGO, B.; TOLRÀ, R.; POSCHENRIEDER, C. A role for zinc in plant defense against pathogens and herbivores. **Frontiers in Plant Science**, vol.10, oct. 2019.

CAMPOS, C.C.F. **Ecologia reprodutiva de *Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae)**. UFLA, Lavras, 2014.

CAPELARI-OLIVEIRA, P.; PAULA, C.A.; REZENDE, S.A.; CAMPOS, F.T.; GRABE-GUIMARÃES, A.; LOMBARDI, J.A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian “Arnica”). **Journal of Ethnopharmacology** , n.135, p.393–398, 2011.

CARMO, F.F.; JACOBI, C.M. A vegetação de canga no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais: caracterização e contexto fitogeográfico. **Rodriguésia**, vol.64, n.3, Rio de Janeiro, 2013.

CARVALHO, Y.G.S.; VITORINO, L.C.; DE SOUZA, U.J.B.; BESSA, L.A. Recent Trends in Research on the Genetic Diversity of Plants: Implications for Conservation. **Diversity**, 11, 62, 2019.

CHENA, Z.C.; PENG, W.T.; LI, J.; LIAO, H. Functional dissection and transport mechanism of magnesium in plants. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, vol.74, p.142–152, 2018.

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

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 jun. 2011

COSTA; A.R.; SILVA JÚNIOR, M.L.; KERN, D.C.; RUIVO, M.L.P.; MARICHAL, R. Forms of soil organic phosphorus at black earth sites in the Eastern Amazon. **Revista Ciência Agronômica**, vol.48, n.1, p.1-12, jan-mar 2017.

DAVIDIAN, J.C.; KOPRIVA, S. Regulation of Sulfate Uptake and Assimilation—the Same or Not the Same? **Molecular Plant**, vol.3, n.2, p.314–325, mar. 2010.

DHUTMAL, R.R.; MUNDHE, A.G.; MORE, A.W. Molecular Marker Techniques: A Review. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, Special Issue – 6, p.816-825, 2018.

DICKE, M. Plant phenotypic plasticity in the phytobiome: a volatile issue. **Current Opinion in Plant Biology**, n.32, p.17–23, 2016.

DO AMARAL, J.F.; SILVA, M.I.G.; AQUINO NETO, M.R.; TEIXEIRA NETO, P.F.; MOURA, B.A.; DE MELO, C.T.V.; ARAUJO, F.L.O.; SOUZA, D.P.; VASCONCELOS, P.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUZA, F.C.F. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-Limonene in mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v.30, n.7., p.1217-1220, 2007.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, n.19, p.11–15, 1987.

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

DUARTE, D.S. Estudo químico-biológico de *Lychnophora pinaster* Mart. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 99 p, 1993.

EI HADRI, A.; DEL RÍO, A.G.; SANZ, J.; COLOMA, A.G.; IDAOMAR, M.; OZONAS, B.R.; GONZÁLES, J.B.; REUS, M.I.S. Cytotoxic activity of α -humulene and transcaryo-phyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. **An. R.Acad. Nac.Farm.**, v.76, n.3., p.343-356, 2010.

ELBALI, W.; DJOUAHRI, A.; DJERRAD, Z.; SAKA, B.; ABERRANE, S.; SABAOU, N.; BAALIOUAMER, A.; BOUDARENE, L. Chemical variability and biological activities of *Marrubium vulgare* L. essential oil, depending on geographic variation and environmental factors. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 30, n. 6, 470–487, 2018.

FAQUIN, V. Nutrição mineral de plantas. **UFLA / FAEPE**, Lavras, 2005.

FERNANDEZ, J.C.; BURCH-SMITH, T.M. Chloroplasts as mediators of plant biotic interactions over short and long distances. **Current Opinion in Plant Biology**, vol.50, p.148–155, 2019.

FERREIRA, S.A. Avaliação da toxicidade e das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* (arnica). UFOP, Ouro Preto, 2010.

FERREIRA, S.A.; GUIMARÃES, A. G.; FERRARIA, F.C.; CARNEIRO, C.M; PAIVA, N.C.N.; GUIMARÃES, D.A.S. Assessment of acute toxicity of the ethanolic extract of *Lychnophora pinaster* (Brazilian arnica). **Rev Bras Farmacogn**, n.24, 553-560, 2014.

GARNIER-GÉRÉ, P.; CHIKHI, L. **Population Subdivision, Hardy–Weinberg Equilibrium and the Wahlund Effect**. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), 2013.

GHORBANPOUR M, ASGARI LAJAYER H, HADIAN J. Influence of Copper and Zinc on Growth, Metal Accumulation and Chemical Composition of Essential Oils in Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Medicinal Plantas**, Volume 15, No. 59, Summer 2016.

GIERTHA, M.; MÄSERB, P. Minireview. Potassium transporters in plants – Involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. **FEBS Letters**, vol.581, p.2348–2356, 2007.

GIULIETTI, A.M.; PIRANI, J.R. Patterns of geographic distribution of some species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. **Academia Brasileira de Ciências**, p.39-69, 1988.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.

HABER, L. L.; CAVALLARI, M. M. ; GIMENES, M. A. ;ZUCCHI, M. I.. Development and characterization of microsatellites markers for *Lychnophora pinaster* : a study for conservation of a native medicinal plant. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 811-814, 2009.

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

HÄNSCH R.; MENDEL, R.R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Curr. Opin. Plant. Biol.**, v.12, n.3, p.259-66, jun. 2009.

HEBEDA, C.B.; BOLONHEIS, S.M.; NAKASATO, A.; BELINATI, K.; SOUZA, P.D.; GOUVEA, D.R.; LOPES, N.P.; FARSKY, S.H. Effects of chlorogenic acid on neutrophil locomotion functions in response to inflammatory stimulus. **J Ethnopharmacol.**, v.17, n.135(2), p.261-9, mai. 2011.

HENDAWY, S.F.; HUSSEIN, M.S.; AMER, H.M.; EL-GOHARY, A.E.; SOLIMAN, W.S. Effect of soil type on growth, productivity, and essential oil constituents of rosemary, *Rosmarinus officinalis*. **Asian J Agri & Biol.**; v.5, n.4, p.303-311, 2017.

HIM, A.; OZBEK, H.; TUREL, I.; ONER, A.C. Antinociceptive activity of alpha-pinene and fenchone. **Pharmacologyonline**, v.3, p.363-369, 2008.

HOCHMAL, A.K.; SCHULZE, S.; TROMPELT, K.; HIPPLER, M. Calcium-dependent regulation of photosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, n.1847, p.993–1003, 2015.

HORBOWICZ, M.; KOWALCZYK, W.; GRZESIUK, A.; MITRUS, J. Uptake of aluminium and basic elements, and accumulation of anthocyanins in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) as a result increased level of aluminium in nutrient solution. **Ecological Chemistry and Engineering**, vol. 18, n. 4, 2011.

IMAN BAJALAN, RAZIEH ROUZBAHANI, ABDOLLAH GHASEMI PIRBALOUTI & FILIPPO MAGGI. Quali-quantitative variation of essential oil from Iranian rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) accessions according to environmental factors. **Journal of Essential Oil Research**, v.30, n.1, p.16–24, 2018.

ISIDOROV, V.A.; KRAJEWSKA, U.; VINOGOROVA, V.T.; VETCHINNIKOVA, L.V.; FUKSMAN, I.L.; BAL, K. Gas chromatographic analysis of essential oil from buds of different

birch species with preliminary partition of components, **Biochem. Syst. Ecol.**, v.32, n.1, p.1-13, 2004.

ISOBE, M.T.C. **Anatomia foliar e influência da sazonalidade no óleo essencial de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.** 93p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.

JABBARI, A.R.; DEHAGHI, M.A.; SANAVI, A.M.M.; AGAHI, K. Nitrogen and iron fertilization methods affecting essential oil and chemical composition of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) medical plant. **Advances in Environmental Biology**, v.5, n.2, p.433-438, 2011.

JAMAL, A.; MOON, Y.; ABDIN, M.Z. Sulphur- a general overview and interaction with nitrogen. **Australian Journal of Crop Science**, v.4, n.7., p.523-529, 2010.

JIANG, S.Y.; JIN, J.; SAROJAM, R.; RAMACHANDRAN, S. A Comprehensive Survey on the Terpene Synthase Gene Family Provides New Insight into Its Evolutionary Patterns. **Genome Biol. Evol.**, vol.11, n.8, p.2078–2098, 2019.

JIN, W.; LONG, Y.; FU, C.; ZHANG, L.; XIANG, J.; WANG, B.; LI, M. Ca²⁺ imaging and gene expression profiling of *Lonicera confusa* in response to calcium-rich environment. **Scientific Reports**, 2018.

KABERA, J.N.; SEMANA, E.; MUSSA, A.R.; HE, X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p 377-392, 2014.

KHALEEL, C.; TABANCA, N.; BUCHBAUER, G. α -terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. **Open. Chem.**, v.16, p.349-361, 2018.

KHALID, R.; KHAN, K.S.; AKRAM, Z.; QURESHI, R.; GULFRAZ, M. Relationship of plant available sulphur with soil characteristics, rainfall and yield levels of oilseed crops in pothwar pakistan. **Pak. J. Bot.**, vol.43, n.6, p.2929-2935, 2011.

KUMAR, M.; CHAUDHARY, V.; SHARMA, V.R.; SIROHI, U.; SINGH, J. Advances in biochemical and molecular marker techniques and their applications in genetic studies of orchid: A review. **International Journal of Chemical Studies**, n.6, v.6, p.806-822, 2018.

LEE, S.; CHOI, J.; LEE, B.; YU, J.; LIM, C.E. Genetic diversity and structure of an endangered medicinal herb: implications for conservation. **AOB Plants**, mar., 2018.

LEFORD, H. World's largest plant survey reveals alarming extinction rate. **Nature**, jun.2019.

LEWIS, P. O., AND ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data.** Version 1.0 (d16c), 2001. Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.

MAATHUIS, F.J.M. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, vol.12, p.250–258, 2009.

MARTINEZ-NATARÉN, D.A.; PARRA-TABLA, V.; FERRER-ORTEGA, M.M.; CALVO-IRABIÉN, L.M. Genetic diversity and genetic structure in wild populations of Mexican oregano

(*Lippia graveolens* H.B.K.) and its relationship with the chemical composition of the essential oil. **Plant Syst Evol**, v.300, p.535–547, 2014.

MCCAULE, A.; JONES, C.; JACOBSEN, J. Nutrient Management Module N° 09. Plant Nutrient Functions and Deficiency and Toxicity Symptoms. **Montana State University – Extension**, n.4449-9, jun. 2011.

MEDEIROS, R.; PASSOS, G.F.; VITOR, C.E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T.L.; PIANOWSKI, L.F.. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v.151, pp. 618-627, 2007.

MELO JR., A. F.; CARVALHO, D. F.; VIEIRAC, F.; OLIVEIRA, D. A. Spatial genetic structure in natural populations of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) in the North of Minas Gerais, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p., 205-209, 2012

MELO, P.R.B., OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; PEREIRA, C.E.; PINTO, J.E.B.P. Germinação em aquênios de *Lychnophora pinaster* em função do estágio de maturação, temperatura e luz. **Científica**, Jaboticabal, v.42, n.4, p.404-410, 2014.

MELO, P.R.B.; OLIVEIRA, J.A.; CARVALHO, M.L.M.; GUIMARÃES, R.M.; CARVALHO, B.O. Aplicação do teste de raios x no estudo da morfologia interna e da qualidade fisiológica de aquênios de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.146-154, 2009.

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

MILLALEO, R.; REYES-DÍAZ, M.; IVANOV, A.G.; MORA, M.L.; ALBERDI, M. Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. **J. Soil Sci. Plant Nutr.**, vol.10, n.4, p.476 - 494 , 2010.

MOUSAVI, S.R.; SHAHSAVARI M.; REZAEI, M. A General Overview On Manganese (Mn) Importance For Crops Production. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, vol.5, n.9, p.1799-1803, 2011.

MUMIVAND H., BABALAR M., HADIAN J., FAKHR-TABATABAEI M. Plant growth and essential oil content and composition of *Satureja hortensis* L. cv. Saturn in response to calcium carbonate and nitrogen application rates. **J. Med. Plants Res.** 5(10), 1859–1866, 2011.

NADEEM, M.A.; NAWAZ, M.A.; SHAHID, M.Q.; DOGAN, Y.; COMERTPAY, G.; YILDIZ, M.; HATIPO, R.; AHMADG, F.; ALSALEHH, A.; LABHANEI, N.; OZKAN, H.; CHUNG, G.; BALOCH, F.S. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, n.32, v.2, p.261-285, nov.2017.

NAZARENO, A.L.; BEMMELS, J.B.; DICK, C.W.; LOHMANN, L.G. Minimum samples sizes for populations genomics: an empirical study from an Amazonian plant species. **Molecular Ecology Resources**, v.17, p.1136-1147, 2017.

NURZYŃSKA-WIERDAK, R.; BOROWSKI, B.; DZIDA, K.; ZAWIŚLAK, G.; KOWALSKI, R. Essential oil composition of sweet basil cultivars as affected by nitrogen and potassium fertilization. **Turk J Agric For**, n.37, p.427-436, 2013.

OLIVEIRA, M.; MOURA, G.M.; ZARDETTO, G.; CARDOSO, B.K.; ALVES, A.A.R.; TSUKUI, A.; REZENDE, C.M.; CORTEZ, L.E.R.; CORTEZ, D.A.G.; PIAU JUNIOR, R.; ALBERTON, O.; GAZIM, Z.C. Effect of sulphur on yield and chemical composition of essential oil of *Ocimum basilicum* L. **African Journal of Agricultural Research**, v.9, n.7, p.688-694, fev.2014.

ORMEÑO, E.; FERNANDEZ, C. Effect of soil nutrient on production and diversity of volatile terpenoids from plants. **Current Bioactive Compounds**, n.8, p.71-79, 2012.

PADOVAN, A.; KESZEI, A.; HASSAN, Y.; KRAUSE, S.T.; KÖLLNER, T.G.; DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W.J. Four terpene synthases contribute to the generation of chemotypes in tea tree (*Melaleuca alternifolia*). **BMC Plant Biology**, vol.17, n.160, 2017.

PASSOS, F.F.B.; LOPES, E.M.; ARAUJO, J.M.; SOUZA, D.P.; VERAS, L.M.C.; LEITE, J.R.S.A.; ALMEIDA, F.R.C. Involvement of cholinergic and opioid system in γ -terpiene-mediated antinociception. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

PASSOS, G. F., FERNANDES, E.S., DA CUNHA, F.M., FERREIRA, J., PIANOWSKI, L.F., CAMPOS, M.M., CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **J. Ethnopharmacol.**; v.110, p.323–333, 2007.

PEREIRA, F.G.; MARQUETE, R.; DOMINGOS, L.T.; ROCHA, M.E.N.; FERREIRA-PEREIRA, A.; MANSUR, E.; MOREIRA, D.L. Antifungal activities of essential oil and its fractions rich in sesquiterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.89, n.4, p.2817-2824, 2017.

PILON-SMITS, E.A.H.; QUINN, C.F.; TAPKEN, W.; MALAGOLI, M.; SCHIAVON, M. Physiological functions of beneficial elements. **Current Opinion in Plant Biology**, vol.12. p.267–274, 2009.

PINHEIRO, P.T.S.G. **Avaliação da atividade anti-inflamatória de formulações de uso tópico contendo extratos de *Lychnophora pinaster* e *Symphytum officinale***. UFOP, Ouro Preto, 2010.

POLAND, J.; BROWN, P.J.; SORRELLS, M.E.; JANNINK, J.C. Development of high-density genetic maps for Barley and Wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. **PLoS One**, vol.7(2), e32253, 2012.

POURMOHAMMAD, A. Application of molecular markers in medicinal plant studies. **Acta Universitatis Sapientiae Agriculture and Environment**, v.5, p.80-90, 2013.

QUEIROZ, V.S. **Avaliação *in vitro* do efeito dose-resposta da nanoemulsão do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* sobre células planctônicas e biofilme de *Streptococcus mutans* e sobre a desmineralização do esmalte dental ao redor de braquetes ortodônticos**, 183p. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 2012.

QUEIROZ, V.S.; MARQUES, M.O.M.; HABER, L.L.; SCHREIBER, A.Z. Nanoemulção de *Lychnophora pinaster* e seu uso, BR10201200991951. Depósito: 24/04/2012; Concessão: 15/05/2018.

RAMEZANI S., REZAEI M.R., SOTOUDEHNIA P. Improved growth, yield and essential oil content of basil grown under different levels of phosphorus sprays in the field. **J. Appl. Biol. Sci.** 3(2), 96–101, 2009.

RAPPOSELLI, E.; MELITO, S.; BARMINA, G.G.; FODDAI, M.; AZARA, E.; SCARPA, G.M. Relationship Between Soil and Essential Oil Profiles in *Salvia desoleana* Populations: Preliminary Results. **Natural Products Communications**, v.10, n.9, p. 1615-1618, 2015.

REIS, É.S.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R.M.; PAULA, J.R.; ANDRADE, S.T.; FERRI, P.H. Seasonal variation in essential oils of *Lychnophora pinaster* Mart. **Journal of Essential Oil Research**, Vol. 22, March/April 2010.

RESENDE, J.M.V. **Óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.: caracterização química, atividade antibacteriana, antifúngica, antiocrotóxigênica e hemolítica**. UFL, Lavras, 2013.

ROGERIO, A.P.; ANDRADE, E.L.; LEITE, D.F.; FIGUEIREDO, C.P.; CALIXTO, J.B. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene alpha-humulene in experimental airways allergic inflammation. **Br J Pharmacol**, v.158, n.4, p.1074–1087, 2009.

ROUT, G.R.; SAHOO, S. Role of iron in plant growth and metabolism. **Reviews in Agricultural Science**, n.3, p.1-24, 2015.

SADEGHZADEH, B. A review of zinc nutrition and plant breeding. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, vol.13, n.4, p.905-927, 2013.

SANTOS, M.R.V.; MOREIRA, F.V.; FRAGA, B.Y.P.; DE SOUSA, D. P.; BONJARDIM, L.R.; QUINTANS-JUNIOR, L.J. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.4., p.764-771, jul-ago. 2011.

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

SEMIR, J.; MONGE, M.; REZENDE, A.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 Preto: Editora UFOP, 2011. 212 p.

SHAMS, M.; RAMEZANI, M.; ESFAHAN, S.Z.; ESFAHAN, E.Z.; DURSUN, A.; YILDIRIM, E. Effects of climatic factors on the quantify of essential oil and dry matter yield of Coriander (*Coriandrum sativum* L.). **Indian Journal of Science and Tecnology**, v.9; n.6, 2016.

SILVA, P. S. S. **Caracterização da composição química dos óleos essenciais de *Lychnophora pinaster* Mart. em função da sazonalidade**. 167p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.

SILVA, P. S. S. **Caracterização da diversidade genética e química de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.** 184 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2016.

SILVA, S. M. P. Arnica de campos rupestres *Lychnophora pinaster* Mart. Asteraceae - aspectos da fenologia e da germinação de aquênios. MING, L. C. In: **Plantas medicinais aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica.** São Paulo: UNESP. 1998. v.2. p.1-18

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, 2005.

SINGH, B.; SHARMA, R.A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **Biotech**, n.5, p.129–151, 2015.

SINGH, M.V.; GOSWAMI, V.; WANJAR, R.H. Evaluation of Right Source of Boron and Sulphur for Enhancing Yield and Quality of Crops. **Better Crops -South Asia**, vol.11, n.1., 2019.

SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORREA, R.M.; COSTA, L.C.B.; DYER, W.E. In vitro propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): A threatened endemic medicinal plant. **Hortscience**, n.42, v.7, p.1665–1669, 2007.

STRASSBURG, B.B.N.; BROOKS, T.; FELTRAN-BARBIERI, R.; IRIBARREM, A.; CROUZEILLES, R.; LOYOLA, R.; LATAWIEC, A.E.; OLIVEIRA FILHO, F.J.B.; SCARAMUZZA, C.A.M.; SCARANO, F.R.; SOARES-FILHO, B.; BALMFORD, A. Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology & Evolution**, vol.1, p.1-3, 2017.

SUGIER, D.; SUGIERB, P.; KOWALSKIC, R.; KOŁODZIEJA, B.; OLESÍŃSKA, K. Foliar boron fertilization as factor affecting the essential oil content and yield of oil components from flower heads of *Arnica montana* L. and *Arnica chamissonis* Less. cultivated for industry. **Industrial Crops & Products**, v.109, p.587–597, 2017.

SZCZECIŃSKA, M.; SRAMKO, G.; WOŁOSZ, K.; SAWICKI, J. Genetic Diversity and Population Structure of the Rare and Endangered Plant Species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe. **PlosOne**, v.11, n.3. mar.2016.

TALEB-CONTINI, S.H.; SANTOS, W.F.; MORTARI, M.R.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Neuropharmacological effects in mice of *Lychnophora* species (Vernoieae, Asteraceae) and anticonvulsant activity of 4,5-di-O-[E]-caffeoylquinic acid isolated from stem of *L. rupestris* and *L. staavioides*. **Nordic Pharmacological Society, Basic & Clinic Pharmacology & Toxicology**, n. 102, p. 281-286, 2008.

TAUTZ, D.; ELLEGREN, H.; WEIGEL, D. Next Generation Molecular Ecology. **Molecular Ecology**, Suppl. 1, 2010.

THOR, K. Calcium – Nutrient and Messenger. **Frontiers in Plant Science**, vol. 10, abr 2019.

TSONEV, T.; LIDON, F.J.C. Zinc in plants - An overview. **Emir. J. Food Agric**, vol.24, n.4, p.322-333, 2012.

USDA. **Soil Organic Matter**. In: Soil Health for Educators. United States Department of Agriculture, 2014.

VALIENTE-BANUET, A.; AIZEN, M.A.; ALCANTARA, J.M.; ARROYO, J.; COCUCCI, A.; GALETTI, M.; GARCIA, M.B.; GARCIA, D.; GOMEZ, J.M.; JORDANO, P.; MEDEL, R.; NAVARRO, L.; OBESO, J.R.; OVIEDO, R.; RAMIREZ, N.; REY, P.J.; TRAVESET, A.; VERDU, M.; ZAMORA, R. **Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. Functional Ecology**. Hoboken: Wiley-blackwell, v. 29, n. 3, p. 299-307, 2015.

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

VIEIRA, M.A.R., **Estrutura genética de populações e constituição química dos óleos essenciais de espécies do gênero *Lychnophora***. 118p. Tese (Doutorado em Agronomia – Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas/Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

VIEIRA, M.A.R.; MARQUES, M.O.M.; HABER, L.L.; VIGNA, B.B.Z.; BAJAY, M.M.; PINHEIRO, J.B.; SOUZA, A.P.; SEMIR, J.; ZUCCHI, M.I. New loci of *Lychnophora pinaster* and transferability to *Lychnophora pinaster*, endangered medicinal species from Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.13, n.4, p. 10878-10882, 2014.

WANG, Q.; QUAN, S.; XIAO, H. Towards efficient terpenoid biosynthesis: manipulating IPP and DMAPP supply. **Bioresour. Bioprocess.**, vol.6, n.6, 2019.

YANG, S.; HUANG, T; KUO, H.; CHIOU, T. Role of vacuoles in phosphorus storage and remobilization. **Journal of Experimental Botany**, vol. 68, n.12, p. 3045–3055, 2017.

ZHANG,X.; NIU, M.; SILVA, J.A.T.; ZHANG, Y.; YUAN, Y.; JIA, Y.; XIAO, Y.; LI, Y.; FANG, L.; ZENG, S.; MA, G. Identification and functional characterization of three new terpene synthase genes involved in chemical defense and abiotic stresses in *Santalum album*. **BCM Plant Biology**, p.19-115, 2019.

ZHELJAZKOV, V. D. Lemongrass productivity, oil content, and composition as a function of nitrogen, sulfur, and harvest time. **Agronomy Journal**, v. 103, n. 3, p. 805–812, 2011

6. APÊNDICES

APÊNDICE 1. Composição de macro e micronutrientes dos solos das áreas de coleta das populações de *L. pinaster*, Minas Gerais, Brasil, 2017.

População	pH1	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 -----								-----md/dm ³ -----					
SM	4,1	49	12	4	106	2,9	31	6	40	145	27	12	0,56	0,6	204	51,2	5,6
CTRA	6,0	49	5	0	26	1,1	60	31	91	117	78	11	0,26	0,4	74	39,3	1,4
NLSC	3,5	74	7	16	233	1,8	17	2	21	254	8	19	0,42	0,5	338	3,4	2,9
DIMa	4,0	16	2	9	25	0,7	6	1	7	32	22	4	0,21	0,3	68	0,3	0,1
OD	4,1	25	2	7	27	1,4	8	1	10	37	27	3	0,22	1,0	66	16,0	0,2
GM	3,8	33	1	10	32	0,9	9	1	11	43	25	4	0,23	0,2	124	0,4	0,1

Região Metropolitana de Belo Horizonte: SM= Serra da Moeda, CTRA=Caeté/Rio Acima, NLSC = Nova Lima/Serra da Calçada.

Região Norte: DIMa=Diamantina, OD=Olhos D'Água e GM= Grão Mogol.

APÊNDICE 2. Análises das características físicas dos solos das áreas de *L. pinaster*. Brasil, Minas Gerais, 2017.

População	Argila	Silte	Areia Total	Areia Grossa	Areia Fina
SM	15,1	25,8	59,1	40,3	18,8
NLSC	33,3	26,8	39,9	34,4	5,5
CTRA	20,1	32,7	47,2	40,7	6,5
OD	12,2	46,1	41,7	20,6	21,1
DIMa	24,6	56,6	18,8	7,7	11
GM	7,9	16,1	76	6,5	69,5

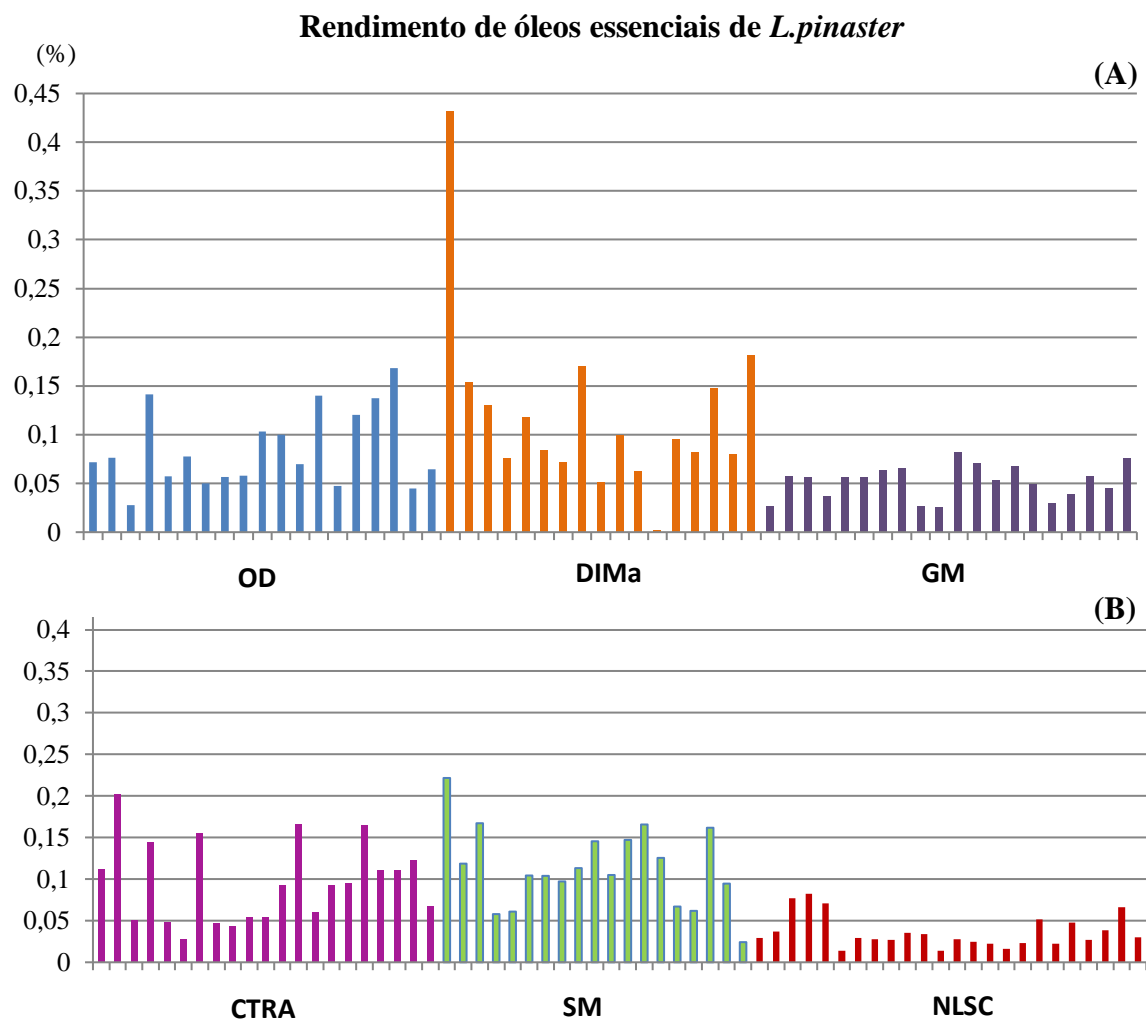
APÊNDICE 3. Scores das amostras de solos dos locais de coletas das populações de *L.pinaster* em função das características físicas e de macro e micronutrientes.

Populações	F1	F2
SM	3,738	0,130
NLSC	3,507	-3,652
CTRA	1,562	4,975
OD	-2,504	0,001
DIMa	-3,364	-0,663
GM	-2,939	-0,791

APÊNDICE 4. Valores dos quadrados dos cossenos das variáveis físicas e químicas dos solos dos locais de coleta de *L.pinaster*.

Variável	F1	F2
Ph1	0,019	0,920
M.O.	0,777	0,036
Presina	0,823	0,003
Al3+	0,003	0,888
H+Al	0,527	0,412
K	0,626	0,024
Ca	0,353	0,608
Mg	0,127	0,759
SB	0,282	0,663
CTC	0,802	0,099
V%	0,009	0,949
S	0,832	0,044
B	0,756	0,059
Cu	0,028	0,001
Fe	0,533	0,421
Mn	0,375	0,382
Zn	0,781	0,009
Argila	0,200	0,108
Silte	0,207	0,007
A T	0,019	0,008
AG	0,840	0,107
AF	0,237	0,020

APÊNDICE 5. Rendimento (%) dos óleos essenciais, por indivíduo, das populações nativas de *L.pinaster* Mart. do estado de Minas Gerais, 2017.

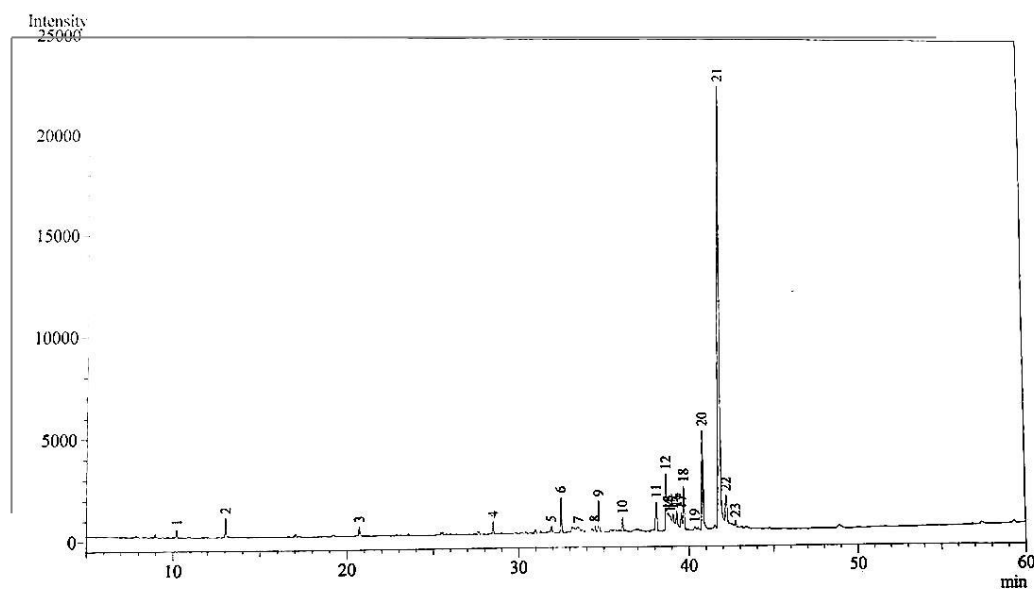


(A) Região Norte: Olhos D'Água (OD), Diamantina (DIMa) e Grão Mogol (GM). (B) Região Metropolitana de Belo Horizonte: Caeté/Rio Acima (CTRA), Serra da Moeda (SM) e Nova Lima/Serra da Calçada (NLSC).

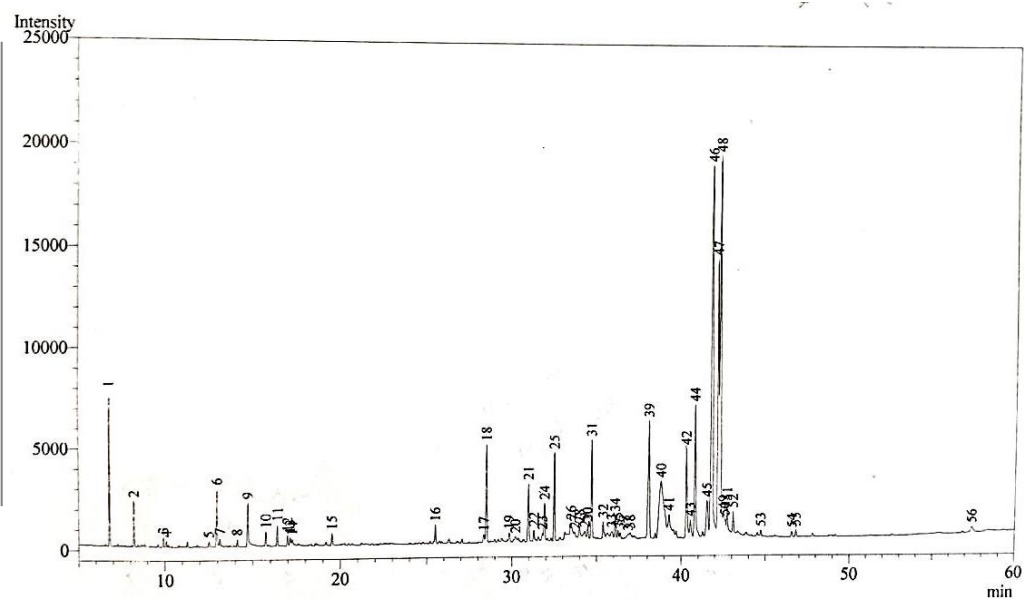
APÊNDICE 6. Análise de variância dos rendimentos de óleos essenciais entre as populações de *L. pinaster* Mart., Minas Gerais, Brasil, 2017.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
População	5	0.358138	0.071628	10.389	0.0000
Regiao	1	0.001470	0.001470	0.213	0.6453
Erro	95	0.654958	0.006894		
Total corrigido	101	1.014566			

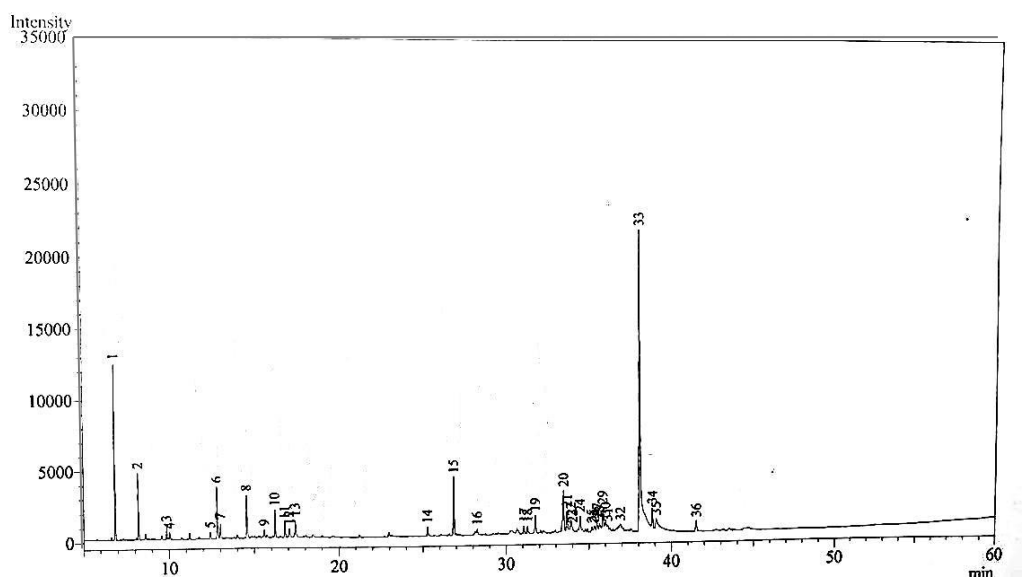
APÊNDICE 7. Cromatograma de íons totais do óleo essencial da população Olhos D'Água (OD) de *L. pinaster*, da região norte de Minas Gerais, analisada em CG/DIC.



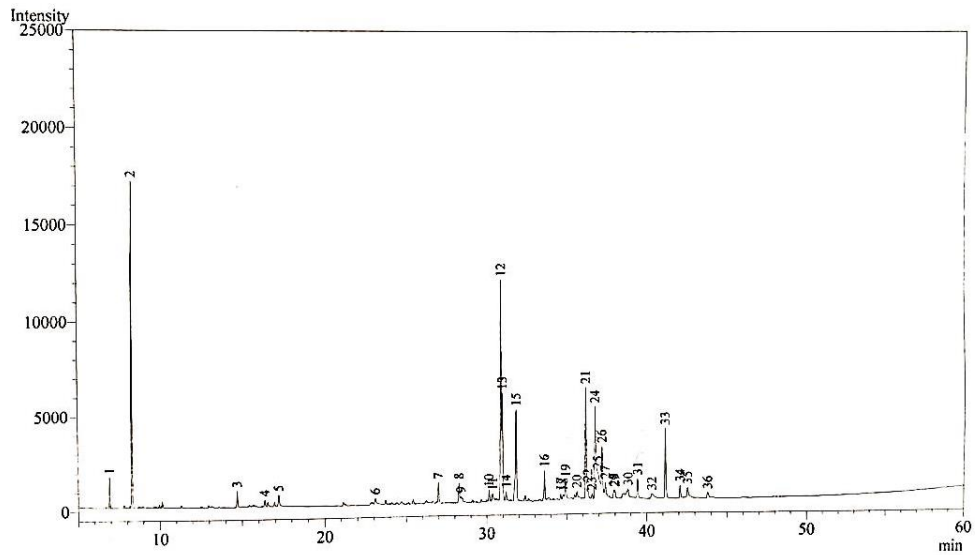
APÊNDICE 8. Cromatograma de íons totais do óleo essencial da população Diamantina (DIMa) de *L. pinaster*, da região norte de Minas Gerais, analisada em CG/DIC.



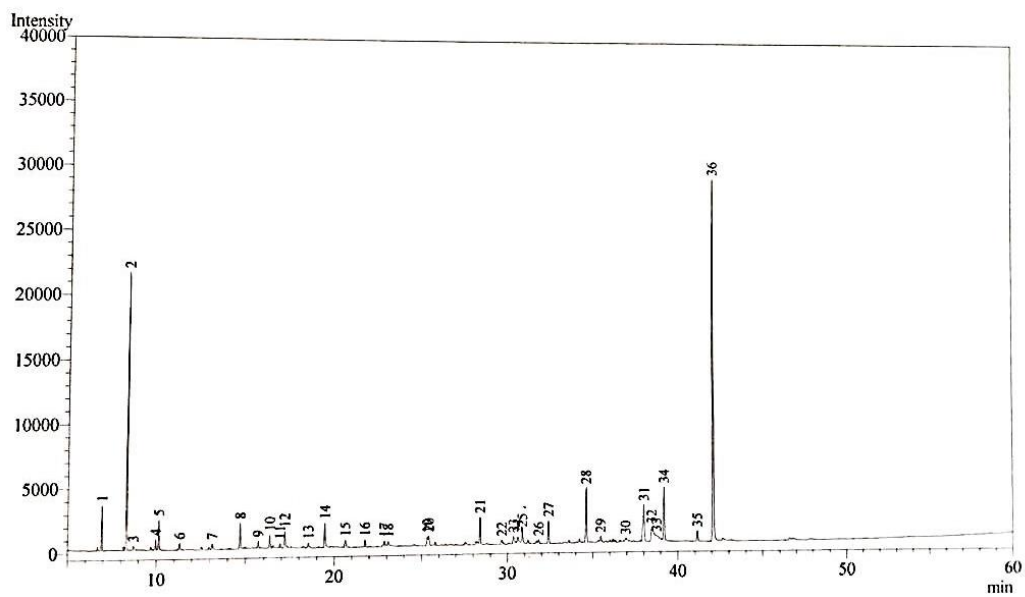
APÊNDICE 9. Cromatograma de íons totais de amostra óleo essencial da população Grão Mogol (GM) de *L. pinaster*, da região norte de Minas Gerais, analisada em CG/DIC.



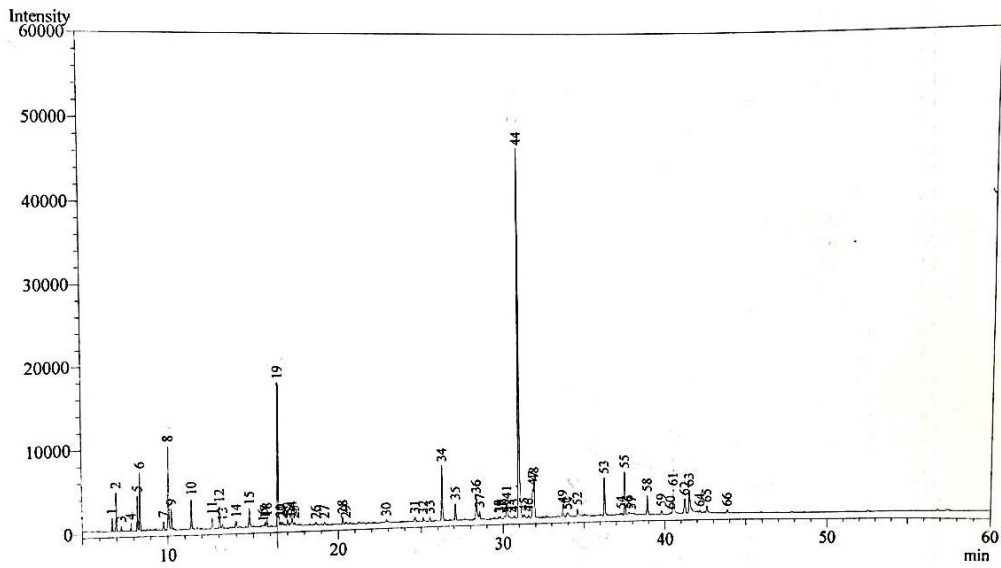
APÊNDICE 10. Cromatograma de íons totais de amostra de óleo essencial da população Caeté/Rio Acima (CTRA) de *L. pinaster*, da região metropolitana de Belo Horizonte, analisada em CG/DIC.



APÊNDICE 11. Cromatograma de íons totais de amostra de óleo essencial da população Nova Lima/Serra da Calçada (NLSC) de *L. pinaster*, da região metropolitana de Belo Horizonte, analisada em CG/DIC.



APÊNDICE 12. Cromatograma de íons totais de amostra de óleo essencial da população Serra da Moeda (SM) de *L. pinaster*, da região metropolitana de Belo Horizonte, analisada em CG/DIC.



APÊNDICE 13. Composição química dos óleos essenciais (%) de *Lychnophora pinaster* da população de Olhos D'Água (OD), Minas Gerais, Brasil, em cromatografia gasosa unidimensional.

	Substância	IRc	OD 01	OD 04	OD 05	OD 07	OD 08	OD 09	OD 10	OD 11	OD 12	OD 13	OD 15	OD 16	OD 17	OD 18
1.	limoneno	1025	1,19	3,82	0,83	5,08	-	tr	1,39	0,44	-	tr	0,87	tr	-	-
2.	linalol	1096	1,89	7,6	4,74	-	0,76	14,56	14,72	1,3	1,2	3,57	3,79	7,34	3,3	1,94
3.	aldeído perfílico	1267	1,1	tr	-	tr	1,26	tr	1,8	0,72	1,38	tr	1,17	-	-	-
4.	α -humuleno	1447	1,45	4,43	2,52	2,7	1,06	4,24	0,96	0,86	-	8,18	1,89	4,28	1,15	1,4
5.	γ -amorfeno	1529	0,73	10,32	0,93	3,68	0,99	7,56	-	0,48	0,83	tr	0,63	7,46	0,9	0,78
6.	sesquiterpeno 3	1543	3,16	6,21	3,44	-	3,23	5,48	4,18	2,65	3,05	3,23	3,04	4,56	2,61	3,16
7.	longicanfenilona	1558	0,65	tr	tr	tr	tr	3,33	tr	tr	tr	-	tr	2,47	-	tr
8.	<i>epi</i> -longipinanol	1567	0,53	tr	tr	tr	1,7	-	-	tr	-	-	tr	tr	-	tr
9.	sesquiterpeno 4	1599	3,02	9,04	8,11	8,69	2,53	10,45	3,45	2,38	1,87	14,29	3,3	12,04	4,25	4,15
10.	sesquiterpene 6	1636	1,35	tr	1,31	tr	-	3,39	1,12	0,98	0,79	1,32	1,05	2,83	1,11	1,66
11.	germacrona	1688	-	12,61	-	-	-	13,93	-	-	-	-	-	8,57	-	-

	Substância	IRc	OD 01	OD 04	OD 05	OD 07	OD 08	OD 09	OD 10	OD 11	OD 12	OD 13	OD 15	OD 16	OD 17	OD 18
12.	ni	1705	4,16	20,16	5,13	5,5	1,91	28,61	3,84	2,92	2,7	4,42	3,42	32,48	5,91	6,61
13.	ni	1722	-	tr	-	-	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.	ni	1734	0,35	-	1,92	2,11	2,43	tr	2,37	3,44	2,82	1,31	-	5,54	1,52	-
15.	ni	1771	9,82	-	10,72	11,49	17,58	-	11,78	9,27	14,21	5,51	8,88	-	7,07	9,91
16.	14-acetoxi- α -humuleno	1802	52,19	tr	41,15	44,09	60,18	tr	50,58	53,75	64,92	30,74	60	tr	29,99	50,58
17.	<i>iso</i> -longifolol acetato	1819	0,81	-	1,05	-	3,1	-	1,15	3,88	2,29	1,44	1,85	-	7,73	1,64
Total identificado				82,4	74,19	81,85	83,34	98,13	91,55	97,34	83,07	96,06	74,01	89,89	87,57	65,54

ni: não identificado; IRc: Índice de Retenção calculado; tr: traço($\leq 0,20$); *substância provável

APÊNDICE 14. Composição química dos óleos essenciais (%) de populações de *Lychnophora pinaster* localizadas entre Caeté e Rio Acima (CTRA), Minas Gerais, Brasil, em cromatografia gasosa unidimensional.

	Substância	IRc	CTRA 01	CTRA 02	CTRA 03	CTRA 04	CTRA 05	CTRA 06	CTRA 07	CTRA 09	CTRA 10	CTRA 11	CTRA 12
1.	α -pineno	929	1,3	1,0	2,0	0,7	tr	0,6	0,9	0,9	2,5	2,7	-
2.	β -pineno	972	14,6	6,7	7,1	3,4	0,6	3,5	1,6	8,8	21,6	13,2	-
3.	(E)-cariofileno	1412	1,4	0,7	2,5	1,0	1,0	3,9	1,7	0,7	1,5	2,1	0,7
4.	sesquiterpeno 1	1504	15,4	14,0	17,9	14,2	13,5	15,3	15,1	33,7	13,4	9,5	23,1
5.	sesquiterpeno 2	1507	7,4	27,0	10,5	29,6	22,1	15,8	9,6	6,9	18,6	4,1	-
6.	(Z)-nerolidol	1528	8,3	13,7	18,8	13,4	11,3	9,3	17,8	15,0	8,7	21,1	5,0
7.	óxido de cariofileno	1572	2,1	1,1	2,1	1,5	2,8	3,7	2,8	1,9	1,4	2,9	2,1
8.	ni	1606	1,4	2,0	1,6	3,0	1,0	1,9	1,2	0,5	1,4	0,8	0,7
9.	1,7-diepi- α -cedrenal	1639	7,8	5,6	8,1	6,2	7,2	5,5	9,3	3,8	3,4	12,4	2,0
10.	cedr-8(15)-en-10-ol	1655	1,0	1,5	3,8	2,4	5,2	2,5	6,1	1,8	1,3	1,8	-
11.	14-hidroxi-(Z)-cariofileno	1564	4,5	1,4	1,7	2,0	1,8	2,0	3,5	1,5	0,9	2,9	2,3

	Substância	IRc	CTRA 01	CTRA 02	CTRA 03	CTRA 04	CTRA 05	CTRA 06	CTRA 07	CTRA 09	CTRA 10	CTRA 11	CTRA 12
12.	14-hidroxi- α -humuleno	1699	1,4	0,3	tr	0,6	0,6	tr	0,3	tr	0,7	0,6	tr
Total identificado			75,4	74,9	76,13	77,86	67,26	63,98	69,71	75,52	75,47	74,08	35,82

Continuação Apêndice 14

	Substância	IRc	CTRA 13	CTRA 14	CTRA 15	CTRA 16	CTRA 17	CTRA 18	CTRA 19	CTRA 20	CTRA 21	CTRA 22	CTRA 24
1.	α -pineno	929	1,0	2,0	0,7	tr	0,6	0,9	0,8	0,9	2,5	2,7	1,9
2.	β -pineno	972	6,7	7,1	3,4	0,6	3,5	1,6	1,9	8,8	21,6	13,2	6,0
3.	(<i>E</i>)-cariofileno	1412	0,7	2,5	1,0	1,0	3,9	1,7	2,3	0,7	1,5	2,1	2,0
4.	sesquiterpeno 1	1504	14,0	17,9	14,2	13,5	15,3	15,1	11,3	33,7	13,4	9,5	17,3
5.	sesquiterpeno 2	1507	27,0	10,5	29,6	22,1	15,8	9,6	23,8	6,9	18,6	4,1	23,5
6.	(<i>Z</i>)-nerolidol	1528	13,7	18,8	13,4	11,3	9,3	17,8	11,7	15,0	8,7	21,1	15,1
7.	óxido de cariofileno	1572	1,1	2,1	1,5	2,8	3,7	2,8	2,4	1,9	1,4	2,9	1,7

	Substância	IRc	CTRA 13	CTRA 14	CTRA 15	CTRA 16	CTRA 17	CTRA 18	CTRA 19	CTRA 20	CTRA 21	CTRA 22	CTRA 24
8.	ni	1606	2,0	1,6	3,0	1,0	1,9	1,2	3,5	0,5	1,4	0,8	1,9
9.	1,7-diepi- α -cedrenal	1639	5,6	8,1	6,2	7,2	5,5	9,3	5,6	3,8	3,4	12,4	4,3
10.	cedr-8(15)-en-10-ol	1655	1,5	3,8	2,4	5,2	2,5	6,1	5,3	1,8	1,3	1,8	1,2
11.	14-hidroxi-(Z)-cariofileno	1564	1,4	1,7	2,0	1,8	2,0	3,5	1,7	1,5	0,9	2,9	1,1
12.	Sesquiterpeno 7	1699	0,3	tr	0,6	0,6	tr	0,3	tr	tr	0,7	0,6	tr
Total identificado				72,6	71,71	74,93	80,98	79,4	67,48	70,25	74,65	68,39	79,2

ni: não identificado; TR: IRc: Índice de Retenção calculado; tr: traço($\leq 0,10$).

APÊNDICE 15. Composição química dos óleos essenciais (%) de populações de *Lychnophora pinaster* de Diamantina (DIMa), Minas Gerais, Brasil, em cromatografia gasosa unidimensional.

	Substância	IRc	DIMa 02	DIMa 07	DIMa 08	DIMa 09	DIMa 14	DIMa 15	DIMa 16	DIMa 17	DIMa 19	DIMa 20	DIMa 21
1.	α -pineno	931	2,13	7,52	0,43	0,95	17,10	2,40	10,78	2,41	0,43	2,82	0,90
2.	β -pineno	974	0,83	2,38	0,22	-	5,48	1,00	3,60	1,04	-	0,91	0,22
3.	mirreno	988	tr	0,52	0,19	-	-	-	tr	-	tr	tr	-
4.	limoneno	1026	0,13	tr	tr	-	2,00	0,35	0,67	tr	-	0,21	0,34
5.	1,8-cineol	1028	0,11	tr	tr	-	0,59	-	0,65	-	-	0,16	-
6.	linalol	1097	0,19	0,52	2,02	-	0,71	0,82	2,76	0,84	0,44	0,17	0,35
7.	nonanal	1101	-	-	0,17	-	-	tr	tr	-	-	1,46	tr
8.	(<i>E</i>)-pinocarveol	1135	0,57	1,80	0,17	-	6,54	3,00	3,29	2,79	0,91	1,26	0,27
9.	terpinen-4-ol	1173	0,56	0,76	0,12	-	3,08	1,86	1,87	1,95	0,61	0,53	0,25
10.	mirtenol	1192	0,14	tr	0,13	-	0,67	0,35	tr	tr	tr	0,28	0,17

	Substância	IRc	DIMa 02	DIMa 07	DIMa 08	DIMa 09	DIMa 14	DIMa 15	DIMa 16	DIMa 17	DIMa 19	DIMa 20	DIMa 21
11.	α -humuleno	1448	0,63	4,83	1,26	1,52	2,08	3,95	1,54	4,11	1,43	2,88	1,52
12.	sesquiterpeno 1	1506	0,72	1,80	1,56	0,71	2,24	1,66	2,58	1,79	1,48	1,82	1,84
13.	ni	1530	0,43	1,17	0,91	0,50	1,36	0,64	1,95	0,69	1,10	1,15	0,98
14.	sesquiterpeno 3	1545	1,19	2,96	2,67	1,51	2,77	1,34	5,21	1,35	3,70	2,57	2,30
15.	sesquiterpeno 4	1595	1,74	10,55	2,99	2,93	8,03	7,05	5,37	7,59	4,23	3,02	5,20
16.	sesquiterpeno 5	1601	tr	tr	0,41	0,32	1,40	0,48	0,41	tr	tr	0,49	0,21
17.	ni	1620	tr	1,57	0,49	0,34	tr	tr	1,11	tr	tr	tr	0,16
18.	<i>epi</i> - α -cadinol	1623	tr	tr	0,22	0,42	0,67	tr	0,43	tr	tr	0,25	tr
19.	sesquiterpeno 6	1633	0,12	1,35	0,82	0,50	0,45	0,46	0,89	0,51	0,93	0,64	0,69
20.	ni	1637	0,11	tr	0,34	-	-	0,39	0,85	-	0,27	0,23	0,42
21.	ni	1642	tr	1,76	tr	-	-	-	1,03	-	-	0,25	-
22.	14-hidroxi-9- <i>epi</i> - <i>E</i> -cariofileno	1670	tr	tr	tr	-	11,00	tr	0,74	-	-	-	tr
23.	ni	1676	-	-	-	-	-	3,68	-	3,70	-	-	-

	Substância	IRc	DIMa 02	DIMa 07	DIMa 08	DIMa 09	DIMa 14	DIMa 15	DIMa 16	DIMa 17	DIMa 19	DIMa 20	DIMa 21
24.	germacrona	1688	1,79	9,82	6,24	5,90	21,26	6,44	8,19	7,35	8,25	5,04	11,74
25.	14-hidroxi- α -humuleno	1695	5,92	33,14	7,26	17,29	tr	13,69	10,72	13,75	9,05	7,44	14,61
26.	14-hidroxi-4,5-dehidro- cariofileno	1702	0,19	0,59	2,83	tr	tr	tr	0,70	tr	0,34	1,06	0,96
27.	ni	1606	1,31	5,03	0,25	1,23	tr	0,76	2,23	0,82	5,26	3,26	0,79
28.	benzoato de benzila	1724	1,31	0,76	0,92	2,63	-	2,82	tr	2,53	3,85	5,19	2,44
29.	14-acetoxi- α -humuleno	1800	42,32	-	37,48	31,88	0,93	22,59	2,23	20,61	25,98	15,60	26,18
Total identificado			63,98	89,4	72,18	70,08	88,36	76,81	77,74	75,64	69,23	62,26	75,06

ni: não identificado; IRc: Índice de Retenção calculado; tr: traço($\leq 0,10$).

Continuação Apêndice 15

	Substância	IRc	DIMa 22	DIMa 23	DIMa 24	DIMa 25	DIMa 03	DIMa 26	DIMa 27
1.	α -pineno	931	0,23	0,38	0,70	0,36	8,61	4,86	2,13
2.	β -pineno	974	0,13	-	-	0,20	2,99	1,72	0,22

	Substância	IRc	DIMa 22	DIMa 23	DIMa 24	DIMa 25	DIMa 03	DIMa 26	DIMa 27
3.	mirreno	988	-	tr	tr	tr	tr	-	-
4.	limoneno	1026	tr	-	-	tr	tr	0,60	0,18
5.	1,8-cineol	1028	tr	-	-	-	1,03	tr	0,13
6.	linalol	1097	0,24	1,17	5,91	0,50	1,54	1,25	0,21
7.	nonanal	1101	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
8.	(<i>E</i>)-pinocarveol	1135	1,18	1,59	1,41	0,44	3,74	5,49	0,46
9.	terpinen-4-ol	1173	0,55	1,08	0,84	0,32	0,85	2,25	0,34
10.	mirtenol	1192	0,13	0,25	tr	tr	1,37	0,69	0,10
11.	α -humuleno	1448	0,67	1,62	0,67	3,35	1,47	0,47	1,68
12.	sesquiterpeno 1	1506	2,92	1,53	1,38	1,03	2,45	2,42	1,27
13.	ni	1530	1,19	-	1,40	1,18	1,89	1,47	1,08
14.	sesquiterpeno 3	1545	2,29	2,23	3,76	3,56	3,97	2,95	2,48
15.	sesquiterpeno 4	1595	3,29	5,14	2,96	5,35	7,01	2,68	0,39

	Substância	IRc	DIMa 22	DIMa 23	DIMa 24	DIMa 25	DIMa 03	DIMa 26	DIMa 27
16.	sesquiterpeno 5	1601	0,64	0,48	0,51	0,32	1,16	tr	0,25
17.	ni	1620	0,49	0,77	tr	0,82	tr	tr	tr
18.	<i>epi</i> - α -cadinol	1623	0,47	0,54	tr	0,46	0,68	tr	0,19
19.	sesquiterpeno 6	1633	0,50	0,51	0,70	1,44	1,27	0,56	1,26
20.	ni	1637	0,50	0,44	tr	0,46	tr	tr	0,31
21.	ni	1642	tr	0,23	tr	tr	1,75	tr	0,10
22.	14-hidroxi-9- <i>epi</i> -e-cariofileno	1670	-	-	-	-	-	-	tr
23.	ni	1676	tr	-	-	tr	tr	-	-
24.	germacronaa	1688	7,06	7,40	6,63	11,17	14,98	5,10	9,67
25.	14-hidroxi- α -humuleno	1695	12,08	8,62	6,00	31,75	30,10	5,49	13,99
26.	14-hidroxi-4,5-dehidro-cariofileno	1702	0,58	0,52	0,73	0,20	tr	0,61	0,14
27.	ni	1606	1,38	1,54	0,76	0,95	1,58	1,94	0,70
28.	benzoato de benzila	1724	1,70	2,25	2,81	2,40	tr	3,97	2,17

	Substância	IRc	DIMa 22	DIMa 23	DIMa 24	DIMa 25	DIMa 03	DIMa 26	DIMa 27
29.	14-acetoxi- α -humuleno	1800	41,33	31,10	24,49	11,00	4,88	25,17	15,92
Total identificado			81,5	71,1	64,77	79,08	94,86	73,27	55,06

ni: não identificado; IRc: Índice de Retenção calculado; tr: traço($\leq 0,10$).

APÊNDICE 16. Composição química dos óleos essenciais (%) de populações de *Lychnophora pinaster* localizada entre Nova Lima e Serra da Calçada (NLSC), Minas Gerais, Brasil, em cromatografia gasosa unidimensional.

	Substância	IRLc	NLSC 01	NLSC 02	NLSC 03	NLSC 04	NLSC 05	NLSC 06	NLSC 07	NLSC 08	NLSC 09	NLSC 10	NLSC 11
1.	α -pineno	929	tr	-	tr	0,2	0,2	-	-	0,3	tr	tr	0,5
2.	β -pineno	972	0,4	tr	tr	0,3	2,0	-	-	2,8	2,4	0,5	3,4
3.	limoneno	1024	tr	tr	tr	0,9	0,5	-	-	0,4	tr	0,2	tr
4.	<i>n</i> -nonanal	1099	0,9	0,3	1,4	0,3	0,3	tr	0,2	0,7	1,2	tr	0,99
5.	(<i>E</i>)-pinocarveol	1133	tr	tr	tr	tr	0,4	-	-	1,1	0,6	tr	0,5
6.	(<i>E</i>)- β -terpineol	1172	tr	0,6	tr	0,5	tr	tr	0,3	0,5	tr	0,2	tr
7.	mirtenol	1191	0,4	tr	tr	tr	0,3	-	-	0,9	0,5	tr	tr
8.	ni	1243	2,2	0,5	1,0	1,1	0,3	1,0	0,4	0,9	1,1	0,8	0,6
9.	acetato de geranila	1377	1,5	1,1	1,1	0,3	0,3	1,7	0,6	0,7	1,0	0,8	0,8
10.	α -humuleno	1447	2,2	1,8	4,6	0,3	2,5	1,6	1,8	3,7	1,8	1,8	1,5
11.	tridecanal	1502	1,6	1,4	3,0	0,8	1,6	2,0	1,7	1,5	1,3	0,8	1,5

	Substância	IRLc	NLSC 01	NLSC 02	NLSC 03	NLSC 04	NLSC 05	NLSC 06	NLSC 07	NLSC 08	NLSC 09	NLSC 10	NLSC 11
12.	sesquiterpeno 1	1505	0,7	tr	0,6	0,2	0,2	tr	0,3	tr	tr	tr	0,3
13.	sesquiterpeno 3	1543	1,0	1,8	2,2	0,9	1,4	tr	0,8	0,8	1,0	1,1	2,0
14.	sesquiterpeno 4	1599	5,3	6,3	7,4	3,6	5,5	4,3	4,6	7,3	3,7	3,9	3,4
15.	germacrona	1688	4,8	3,2	3,6	2,4	5,2	4,2	3,1	3,0	2,8	2,7	3,2
16.	14-hidroxi- α -humuleno	1701	4,6	1,6	3,2	5,0	4,9	2,2	2,3	2,2	2,7	3,6	1,7
17.	ni	1722	2,8	0,9	0,7	0,6	0,3	0,9	2,6	0,9	tr	tr	0,7
18.	14-acetoxi- α -humuleno	1803	49,3	67,2	42,9	70,6	62,1	68,9	64,9	55,1	61,8	68,3	68,1
Total identificado			77,63	86,6	71,61	87,74	87,87	86,88	83,56	82,8	81,89	84,64	88,05

ni: não identificado; TR: IRLc: Índice de Retenção calculado; tr: traço($\leq 0,10$).

Continuação Apêndice 16

	Substância	IRc	NLSC 12	NLSC 14	NLSC 15	NLSC 16	NLSC 17	NLSC 20	NLSC 21	NLSC 22	NLSC 23	NLSC 24	NLSC 25
1.	α -pineno	929	tr	1,1	-	tr	-	-	0,3	tr	2,4	tr	tr
2.	β -pineno	972	3,1	-	tr	1,0	-	-	1,3	0,9	16,4	0,4	0,8
3.	limoneno	1024	tr	0,7	tr	0,8	-	-	1,1	0,7	2,0	tr	tr
4.	<i>n</i> -nonanal	1099	tr	tr	1,4	0,7	-	2,2	0,6	tr	0,5	0,2	tr
5.	(<i>Z</i>)-pinocarveol	1133	tr	0,9	tr	tr	tr	tr	tr	tr	2,2	-	0,3
6.	(<i>Z</i>)- β -terpineol	1172	tr	tr	tr	0,7	-	tr	1,0	0,4	1,1	0,5	0,3
7.	mirtenol	1191	tr	1,2	tr	tr	-	tr	tr	-	1,5	-	0,4
8.	ni	1243	0,8	tr	tr	2,3	tr	1,6	1,0	1,0	2,3	0,6	1,3
9.	acetato de geranila	1377	0,7	tr	1,5	2,2	tr	3,1	0,5	1,4	0,8	0,2	1,0
10.	α -humuleno	1447	2,6	2,7	13,3	2,4	0,9	1,9	1,9	2,3	2,4	4,8	1,5
11.	tridecanal	1502	1,0	37,4	1,5	1,5	4,5	2,3	0,8	1,1	1,4	0,8	6,7
12.	sesquiterpeno 1	1505	tr	0,8	tr	0,3	tr	tr	0,2	tr	tr	0,2	0,5
13.	sesquiterpeno 3	1543	1,0	0,8	1,4	0,9	0,7	1,1	0,6	0,8	2,2	0,6	1,6

Substância	IRc	NLSC 12	NLSC 14	NLSC 15	NLSC 16	NLSC 17	NLSC 20	NLSC 21	NLSC 22	NLSC 23	NLSC 24	NLSC 25
14. sesquiterpeno 4	1599	3,3	2,1	12,9	6,0	4,1	5,3	4,5	4,8	5,0	9,3	5,8
15. germacrona	1688	2,9	tr	2,6	3,6	2,8	3,3	2,7	3,3	4,8	6,0	5,4
16. 14-hidroxi- α -humuleno	1701	1,9	tr	tr	4,0	1,9	2,7	3,9	4,4	3,4	9,0	4,7
17. ni	1722	tr	tr	1,5	1,1	1,6	2,0	1,3	1,1	4,8	tr	2,3
18. 14-acetoxi- α -humuleno	1803	69,2	tr	43,7	54,1	72,5	51,8	63,5	69,6	35,1	55,3	45,2
Total identificado		86,47	57,53	79,89	81,31	88,95	77,23	85,18	91,69	88,23	87,79	77,69

ni: não identificado; IRc: Índice de Retenção calculado; tr: traço($\leq 0,10$).

APÊNDICE 17. Composição química dos óleos essenciais (%) de populações de *Lychnophora pinaster* da Serra da Moeda, Minas Gerais, Brasil, em cromatografia gasosa unidimensional.

	Substância	IRc	SM 01	SM 03	SM 04	SM 05	SM 06	SM 07	SM 08	SM 09	SM 10	SM 11	SM 12	SM 13	SM 14	SM 16	SM 22	SM 24	SM 25
1.	α -tujeno	923	-	-	-	-	0,26	tr	-	0,38	0,57	tr	0,45	0,55	0,67	-	1,16	tr	0,56
2.	α -pineno	930	1,06	0,26	-	-	0,69	0,65	0,28	-	1,23	0,36	1,09	1,14	1,44	0,35	1,96	0,45	1,75
3.	etil 3-metil pentanoato	958	-	-	0,21	-	0,32	tr	-	-	0,17	tr	1,09	-	-	0,49	0,21	tr	0,36
4.	sabineno	969	0,37	0,29	-	-	0,58	0,66	0,25	0,25	1,17	0,37	1,33	1,1	1,13	0,23	2	0,48	1,7
5.	β -pineno	973	6,49	0,32	-	0,23	0,81	0,89	0,79	1,3	1,53	0,52	tr	1,65	1,69	0,5	2,05	0,66	2,89
6.	o-cimeno	1020	0,71	0,38	0,93	0,51	1,46	2,05	0,67	0,48	2	0,86	2,91	2,34	2,52	0,94	3,25	1,47	4,55
7.	limoneno	933	0,79	-	-	0,27	0,74	0,7	0,21	0,32	1,2	-	0,87	0,59	0,88	0,52	-	tr	1,24
8.	terpineno	1054	0,34	-	-	0,22	0,5	tr	-	-	1,11	-	tr	0,7	1,11	0,25	0,72	0,36	1,71
9.	terpinoleno	1084	-	-	-	-	-	tr	-	-	0,36	-	0,74	0,28	0,39	0,13	-	0,46	0,69
10.	linalol	1096	0,43	0,23	0,51	0,86	0,27	tr	0,31	0,22	0,18	-	tr	0,41	0,55	0,32	0,67	0,43	1,37

	Substância	IRc	SM 01	SM 03	SM 04	SM 05	SM 06	SM 07	SM 08	SM 09	SM 10	SM 11	SM 12	SM 13	SM 14	SM 16	SM 22	SM 24	SM 25
11.	lebaicona	1117	-	-	-	-	-	tr	-	-	0,3	-	tr	0,28	0,34	-	0,35	tr	0,61
12.	(Z)-pinocarveol	1134	0,91	-	-	-	0,32	0,86	-	0,22	0,57	-	0,57	0,6	0,7	0,23	0,63	tr	1,44
13.	terpinen-4-ol	1173	1,63	1,83	1,25	1,88	2,24	4,31	0,91	1,1	4,02	1,72	3,66	3,96	5,34	1,19	5	2,22	9,27
14.	α -terpineol	1185	0,24	-	-	-	-	tr	-	-	0,21	-	tr	0,2	0,26	-	0,32	tr	0,41
15.	mirtenal	1191	1,4	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	tr	0,28	-	-	0,38	tr	0,55
16.	α -cipereno	1394	1,9	1,75	1,98	2,69	3,09	4,99	4,15	2,95	1,08	6,98	2,52	2,06	0,77	1,15	1,49	0,5	4,22
17.	(E)-cariofileno	1413	0,48	0,34	0,43	0,7	0,85	0,4	1,18	0,49	0,33	1,18	0,92	1,33	1,33	0,32	0,82	0,79	1,23
18.	ni	1443	1,17	2,11	3,6	1,48	2,06	1,79	2,55	1,95	1,93	2,11	2,44	2,01	2,01	2,58	1,93	3,46	2,13
19.	ni	1448	0,24	0,45	1,54	0,25	0,46	tr	0,76	0,35	0,44	0,45	0,66	0,53	0,48	1	0,52	1,3	0,61
20.	ni	1488	0,73	1,19	3,3	0,89	1,26	1	1,94	1,03	1,14	2,3	1,4	2,82	1,31	2,07	1,41	2,76	1,37
21.	sesquiterpeno 1	1506	16,59	35,1	55,53	21,33	35,43	32,56	42,42	31,01	29,19	40,06	40,91	29,58	28,71	44,87	27,49	56,47	30,41
22.	isodauceno	1508	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	tr	-
23.	ni	1529	1,85	3,17	5,29	8,9	3,13	3,22	3,89	2,92	2,59	10	8,29	7,11	2,72	3,6	7,12	6,2	2,66

	Substância	IRc	SM 01	SM 03	SM 04	SM 05	SM 06	SM 07	SM 08	SM 09	SM 10	SM 11	SM 12	SM 13	SM 14	SM 16	SM 22	SM 24	SM 25
24.	ni	1574	1,21	0,87	-	1,22	0,9	1,28	1,15	0,86	0,71	1,32	1,53	0,97	1,34	0,44	1,72	0,54	0,81
25.	β-coapen-4-α-ol	1595	0,57	0,35	0,54	0,58	0,74	2,93	0,24	0,44	0,35	2,03	tr	0,26	-	-	0,11	tr	0,55
26.	ni	1641	8,6	2,91	2,51	3,79	5,89	10,37	2,93	4,4	4,52	4,13	12,67	2,32	5,03	2,38	5,11	4,69	2,91
27.	14-hidroxi-9-epi-E- cariofileno	1675	3,12	0,74	1,62	1,64	2,2	8,52	1,23	2,94	1,87	2,87	0,84	1,68	1,05	2,63	4,23	1,07	3,32
28.	ni	1713	0,64	0,3	0,99	0,76	0,78	3,25	0,67	0,94	0,93	0,66	tr	0,78	-	1,04	-	0,52	1,52
30.	sesquiterpeno 7	1777	10,73	12,28	1,3	10,68	9,04	7,64	6,06	11,73	10,15	11,34	12,67	10,58	9,4	8,07	-	4,05	2,42
Total identificado			62,43	64,87	81,53	58,88	74,02	88,07	72,59	66,28	69,85	89,26	97,56	76,11	71,32	75,3	70,77	88,88	83,97

ni: não identificado; IRc: Índice de Retenção calculado; tr: traço($\leq 0,10$).

APÊNDICE 18. Composição química dos óleos essenciais (%) de populações de *Lychnophora pinaster* da Grão Mogol, Minas Gerais, Brasil, em cromatografia gasosa unidimensional.

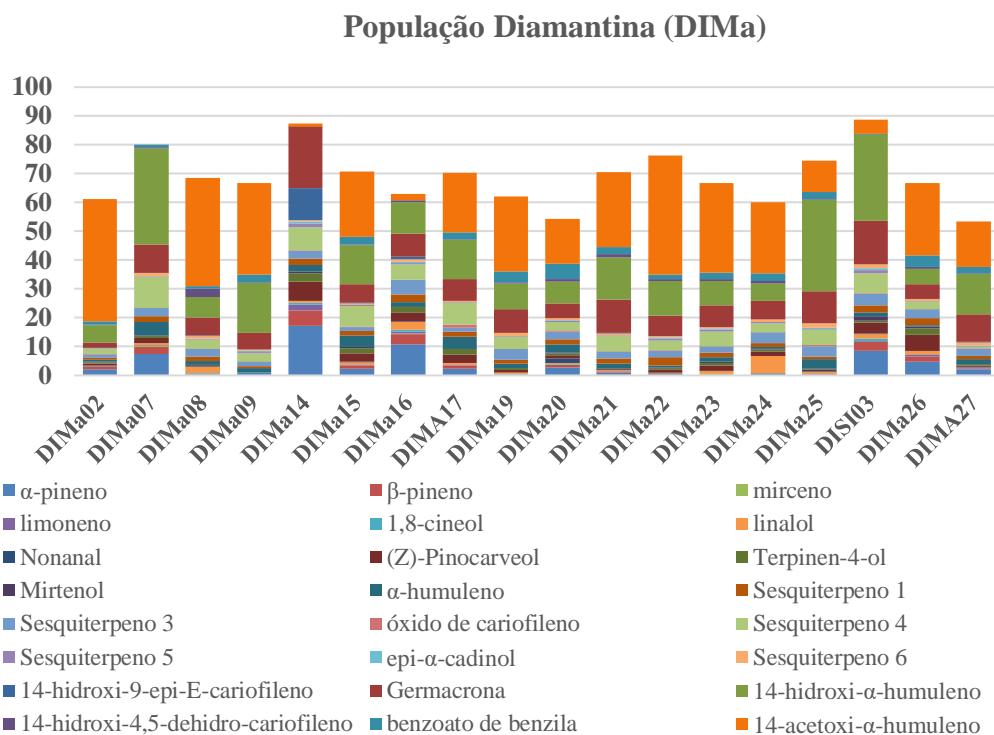
Substância	IRL _c	GM 03	GM 04	GM 06	GM 08	GM 10	GM 11	GM 14	GM 15	GM 16	GM 17	GM 18	GM 19	GM 20	GM 21	GM 22	GM 24	GM 25
1. α -pineno		38,25	7,45	22,53	3,4	12,21	16,95	4,85	16,11	17,57	19,05	12,79	9,04	tr	13,51	2,34	8,74	6,84
2. β -pineno		13,45	3,17	12,43	1,74	5,22	5,5	2,09	6,27	7,2	7,87	4,48	3,75	tr	5,52	1,12	3,64	2,43
3. linalol		1,14	1	4,67	2,56	1,86	2,39	2,11	4,47	4,14	2,8	0,91	4,55	5,59	4,53	1,61	3,65	11,59
4. <i>n</i> -nonanal		0,28	tr	tr	0,68	tr	tr	tr	0,52	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	1,08	0,95
5. <i>E</i> -pinocarveol		7	3,67	8,05	0,88	7,45	4,06	4,25	3,63	4,69	3,42	2,98	5,87	22,86	6,99	1,23	3,27	3,91
6. terpinen-4-ol		3,62	2,71	5,08	0,96	5,58	2,76	2,95	2,78	3,24	3	2,04	3,52	6,87	5,11	1,35	2,06	2,47
7. ni		0,92	0,89	1,82	0,79	1,59	0,91	1,18	1,17	1,32	1,21	0,8	1,56	2,69	1,51	0,64	1,13	0,82
8. mirtenal		1,42	tr	2,23	tr	1,67	0,81	0,98	0,79	tr	tr	0,85	1,09	5,61	1,28	tr	0,7	0,85
9. <i>n</i> -decanal		0,27	1,37	tr	tr	tr	tr	1,72	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,68	tr	1,47	0,44
10. <i>E</i> -cariofileno		1,48	5,21	6,37	2,99	3,66	3,63	6,19	4,21	4,03	2,31	2,2	1,28	tr	2,62	5,17	4,73	2,99
11. α -humuleno		0,17	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,29	tr	tr	tr	0,66	0,49	0,32
12. α -copaen-11-ol		0,76	1,46	1,63	1,19	2,11	2,05	2,24	0,82	1,03	tr	1,08	1,89	1,65	1,98	0,94	1,75	0,81

13.	espatulenol	2,49	5,57	5,14	2,91	7,25	4,92	5,39	3,6	2,63	1,91	4,06	4,01	6,07	6,42	2,19	4,7	5,62
14.	<i>E</i> -carpacina	0,29	tr	0,94	tr	1,51	1,4	1,75	0,66	tr	tr	1,23	1,15	1,3	1,05	tr	2,04	0,81
15.	ni	0,53	tr	0,87	tr	1,41	1,39	1,26	tr	0,74	tr	1,06	0,94	1,18	1,52	0,64	1,21	0,6
16.	ni	0,37	tr	tr	tr	tr	0,87	1,18	0,89	tr	tr	1,16	1,28	1,22	0,87	tr	1,2	1,68
17.	<i>allo</i> -epóxido de aromadendreno	0,93	tr	1,64	tr	1,57	3,31	2,98	1,62	tr	tr	1,86	3,21	1,19	1,31	tr	2,44	1,37
18.	14-hidróxi- α -humuleno	11,05	47	18,36	51,62	31,33	35,88	49,55	45,3	27,36	34,44	36	40,81	36,65	19,61	45,34	38,92	41,91
19.	ni	0,16	tr	tr	1,19	2,75	tr	tr	tr	tr	tr	0,21	0,74	tr	0,88	tr	1,61	1,02
20.	ni	0,5	tr	0,87	1,96	1,63	2,02	2,25	1,02	tr	tr	1,56	2	tr	tr	tr	2,2	tr

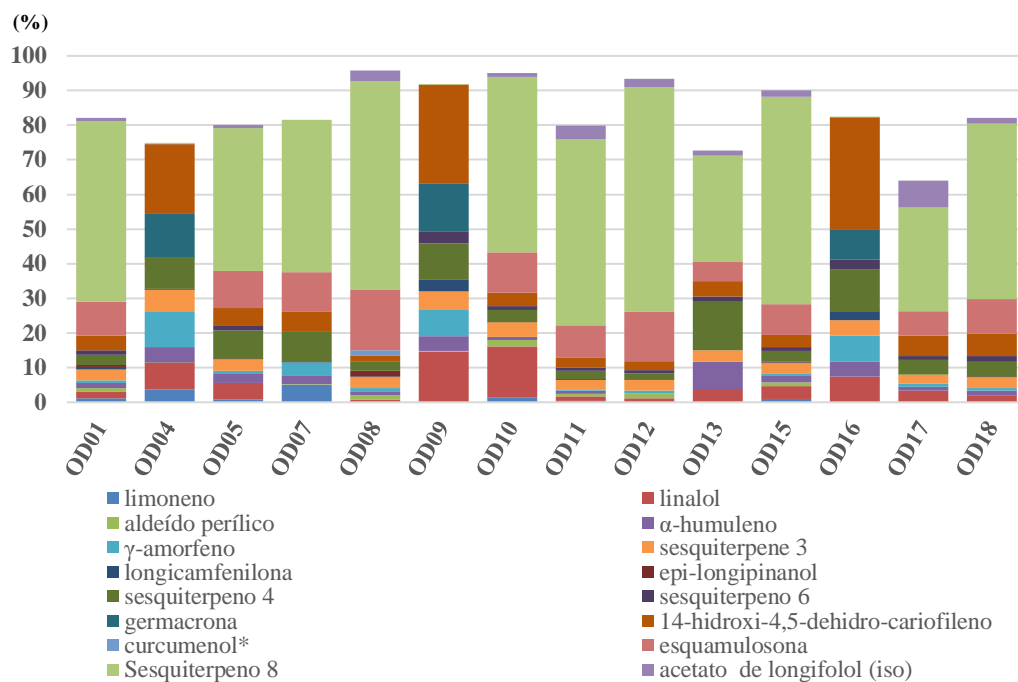
Total identificado

ni: não identificado; IRc: Índice de retenção linear calculado; tr: traço($\leq 0,10$).

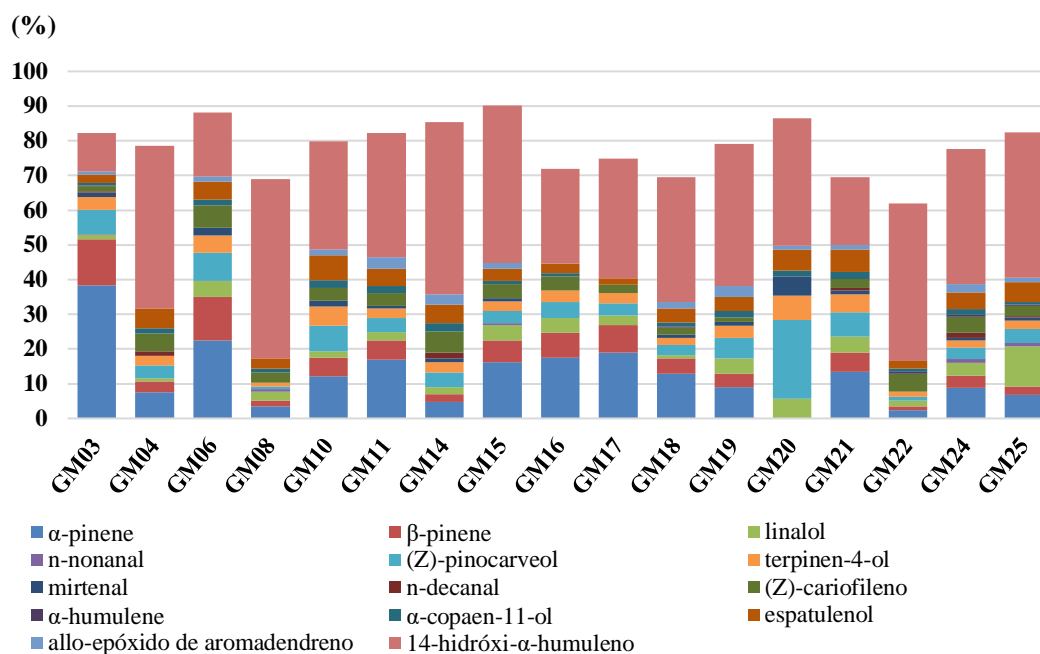
APÊNDICE 19. Composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de *L. pinaster* da População Diamantina (DIMA), Minas Gerais, Brasil.



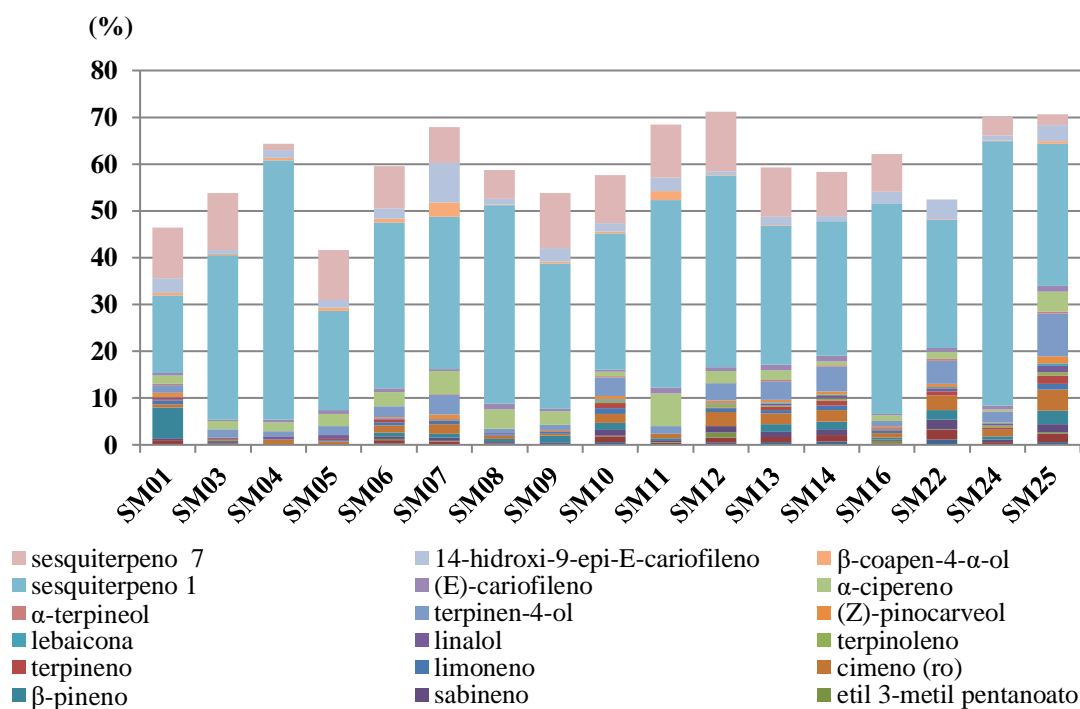
APÊNDICE 20. Composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de *L. pinaster* da População Olhos D'Água (OD), Minas Gerais, Brasil.



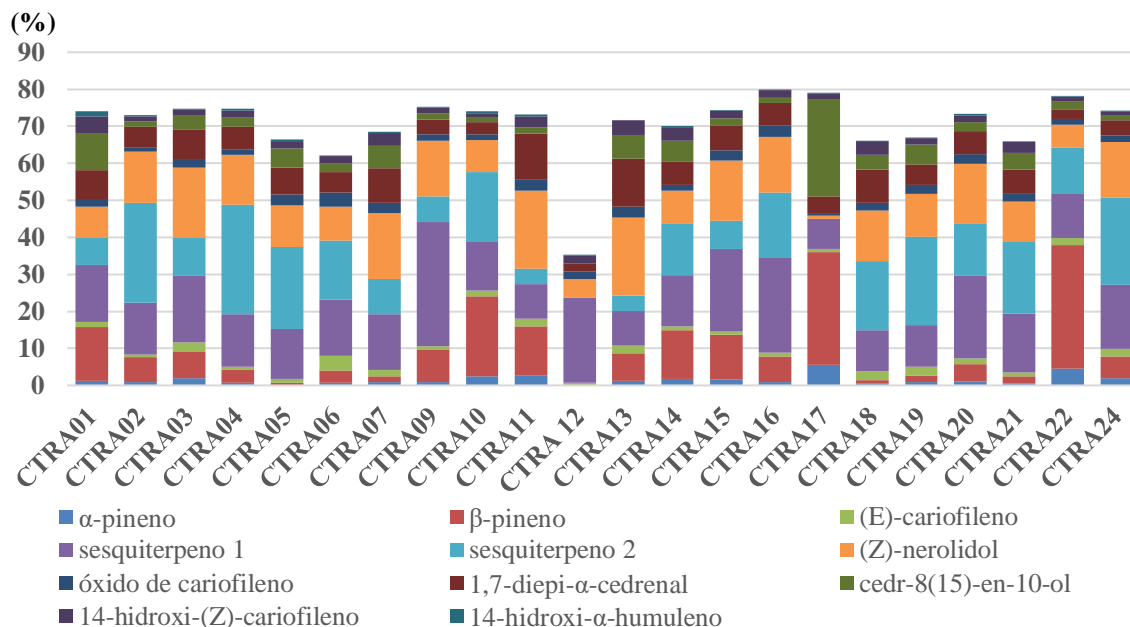
APÊNDICE 21. Composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de *L. pinaster* da População Grão Mogol (GM), Minas Gerais, Brasil.



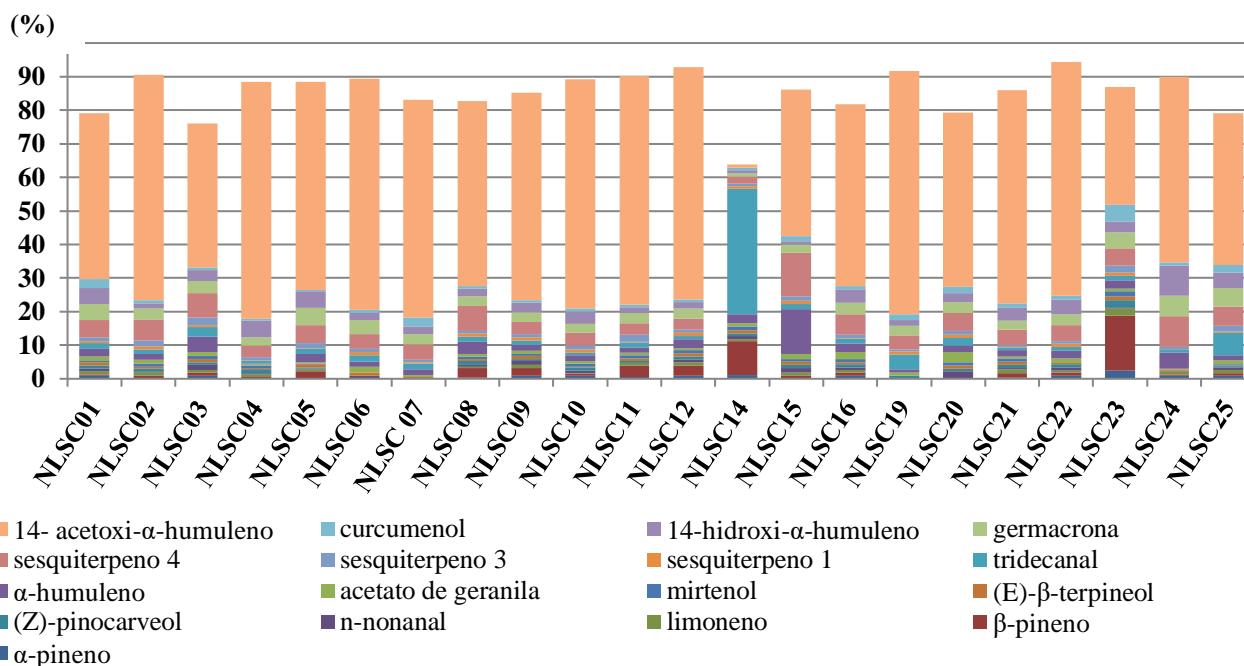
APÊNDICE 22. Composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de *L. pinaster* da População Serra da Moeda (SM), Minas Gerais, Brasil.



APÊNDICE 23. Composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de *L. pinaster* da População Caeté/Rio Acima (CTRA), Minas Gerais, Brasil.



APÊNDICE 24. Composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de *L. pinaster* da População Nova Lima/Serra Calçada (NLSC), Minas Gerais, Brasil.

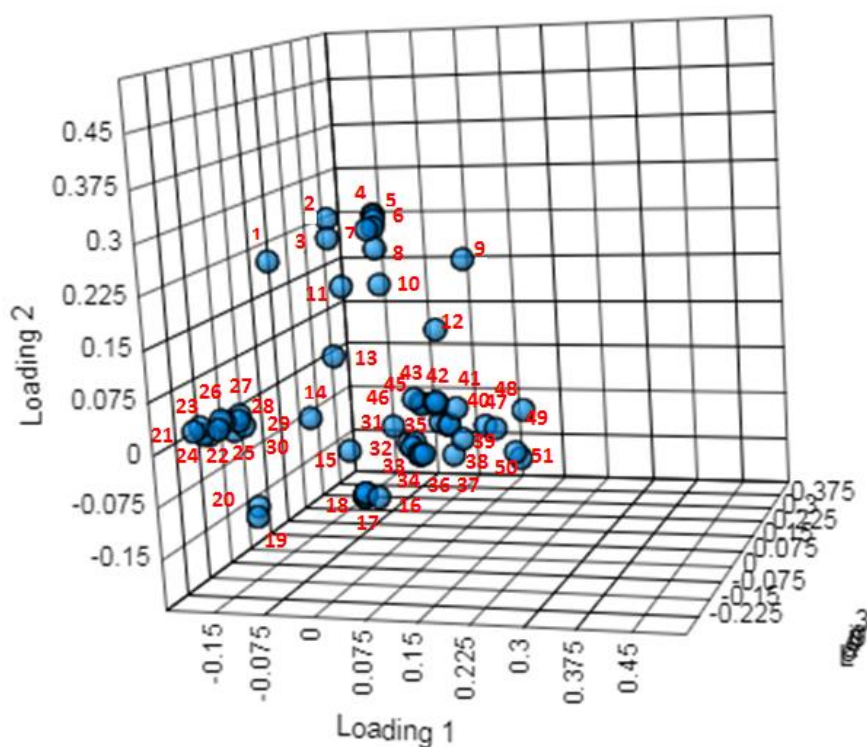


APÊNDICE 25. Teste Unidimensional de Igualdade das Médias das Classes químicas via Análise Discriminante a partir das características dos solos e dos óleos essenciais das populações de *L.pinaster*.

Variável	Lambda	F	DF1	DF2	p-valor
α -tujeno	0,597	14,051	5	104	< 0,0001
α -pineno	0,474	23,097	5	104	< 0,0001
etil 3-metil pentanoato	0,713	8,388	5	104	< 0,0001
sabineno	0,447	25,703	5	104	< 0,0001
β -pineno	0,679	9,845	5	104	< 0,0001
mirceno	0,710	8,481	5	104	< 0,0001
cimeno (ro)	0,359	37,088	5	104	< 0,0001
limoneno	0,798	5,264	5	104	0,000
cineole	0,762	6,495	5	104	< 0,0001
terpineno	0,604	13,629	5	104	< 0,0001
terpinoleno	0,678	9,883	5	104	< 0,0001
linalol	0,561	16,252	5	104	< 0,0001
n-nonanal	0,600	13,851	5	104	< 0,0001
nonanal	0,854	3,563	5	104	0,005
lebaicona	0,691	9,292	5	104	< 0,0001
(Z)-pinocarveol	0,526	18,777	5	104	< 0,0001
<i>trans</i> - β -terpineol	0,525	18,826	5	104	< 0,0001
terpinen-4-ol	0,368	35,729	5	104	< 0,0001
α -terpineol	0,169	102,480	5	104	< 0,0001
mirtenol	0,736	7,475	5	104	< 0,0001
mirtenal	0,635	11,934	5	104	< 0,0001
<i>n</i> -decanal	0,665	10,468	5	104	< 0,0001
aldeido perílico	0,590	14,480	5	104	< 0,0001
acetato de geranila	0,389	32,658	5	104	< 0,0001
α -cipereno	0,319	44,466	5	104	< 0,0001
(Z)-cariofileno	0,218	74,690	5	104	< 0,0001
(E)-cariofileno	0,262	58,588	5	104	< 0,0001
α -humuleno	0,588	14,562	5	104	< 0,0001
tridecanal	0,856	3,498	5	104	0,006
sesquiterpeno 1	0,127	142,638	5	104	< 0,0001
sesquiterpeno 2	0,307	46,886	5	104	< 0,0001
Isodauceno	0,899	2,345	5	104	0,046
(Z)-nerolidol	0,165	105,281	5	104	< 0,0001
gama amorfeno	0,655	10,935	5	104	< 0,0001
α -copaen-11-ol	0,173	99,724	5	104	< 0,0001
sesquiterpeno 3	0,216	75,633	5	104	< 0,0001
longicanfenilona	0,804	5,060	5	104	0,000
<i>epi</i> -longipinanol	0,831	4,236	5	104	0,002
espatulenol	0,127	142,405	5	104	< 0,0001

óxido de cariofileno	0,134	134,438	5	104	< 0,0001
β -coapen-4- α -ol	0,658	10,820	5	104	< 0,0001
sesquiterpeno 4	0,375	34,633	5	104	< 0,0001
sesquiterpeno 5	0,450	25,452	5	104	< 0,0001
<i>epi</i> - α -cadinol	0,384	33,394	5	104	< 0,0001
sesquiterpeno 6	0,384	33,337	5	104	< 0,0001
1,7-diepi- α -cedrenal	0,179	95,496	5	104	< 0,0001
<i>allo</i> -epóxido de aromadendreno	0,407	30,266	5	104	< 0,0001
cedr-8(15)-en-10-ol	0,640	11,713	5	104	< 0,0001
14-hidroxi-(Z)-cariofileno	0,186	91,193	5	104	< 0,0001
14-hidroxi-9- <i>epi</i> -E-cariofileno	0,668	10,360	5	104	< 0,0001
germacrona	0,417	29,066	5	104	< 0,0001
14-hidroxi- α -humuleno	0,174	98,922	5	104	< 0,0001
14-hidroxi-4,5-dehidro-cariofileno	0,573	15,522	5	104	< 0,0001
curcumenol	0,928	1,612	5	104	0,163
benzoato de benzila	0,338	40,687	5	104	< 0,0001
esquamulosa	0,306	47,180	5	104	< 0,0001
sesquiterpeno 7	0,211	77,897	5	104	< 0,0001
sesquiterpeno 8	0,277	54,198	5	104	< 0,0001
14-acetoxi- α -humuleno	0,140	128,229	5	104	< 0,0001

APÊNDICE 26. Loadings das variáveis químicas das amostras dos óleos essenciais das populações de *L. pinaster*.



Loadings: (1)terpinen-4-ol; (2) α -terpineol; (3)mirtenal; (4) espatulenol; (5) α -copaen-11-ol; (6)*allo*-epóxido de aromadendreno; (7)(Z)-pinocarveol; (8) n-decanal; (9)14-hidroxi- α -humuleno; (10) linalol, (11) α -pineno; (12)n-nonanal; (13) β -pineno; (14) isodauceno; (15) limoneno; (16)óxido de cariofileno; (17) sesquiterpeno 2; (18) cedr-8,15-en-10-ol; (19)sesquiterpeno 1; (20) (*E*)-cariofileno; (21) o-cimeno; (22) 14-hidroxi-9-epi-(*E*)- cariofileno; (23) sabineno; (24) α -cipereno; (25) β -copaen-4- α -ol; (26) terpineno; (27) lebaicona; (28) terpinoleno; (29) etil-3-metil-pentanoato; (30) α -tujeno; (31)curcumenol; (32) epi-longipinanol; (33) longicanfenilona; (34) aldeído perílico; (35) esquamulosona; (36) sesquiterpeno 8; (37) γ -amorfenol; (38)14-hidroxi-4,5-dehidro-cariofileno.; (39) sesquiterpeno 6; (40) acetato de geranila; (41)(Z)- β -terpineno; (42) benzanoato de benzila; (43) sesquiterpeno 5; (44) nonanal; (45) mirceno; (46) cineol; (47) 14-acetoxi- α -humuleno; (48) germacrona; (49) α -humuleno; (50) sesquiterpeno 3; (51) sesquiterpeno 4

APÊNDICE 27. Valores de *loadings* das variáveis para as três primeiras componentes principais.

Substância	PC1	PC2	PC3
α -tujeno	-0.16093	0.02212	-0.19181
α -pineno	-0.096462	0.15714	0.12798
etil 3-metil pentanoato	-0.13996	0.011358	-0.17129
sabineno	-0.18678	0.020494	-0.21858
β -pineno	-0.13246	0.03908	0.16632
mirceno	0.077691	0.014973	-0.029394
p-cimeno	-0.19372	0.015515	-0.22678
limoneno	0.033439	-0.012821	-0.20498
1,8-cineol	0.071514	0.02211	-0.037156
terpineno	-0.16491	0.024969	-0.19454
terpinoleno	-0.14465	0.020238	-0.17778
linalol	0.03951	0.19631	-0.063041
nonanal	0.082071	0.012442	-0.032663
lebaicona	-0.1452	0.027695	-0.17279
Z-pinocarveol	-0.0021538	0.26515	0.0089246
<i>trans</i> - β -terpineol	0.099746	-0.019224	-0.0072999
terpinen-4-ol	-0.12142	0.23514	-0.08647
α -terpineol	-0.091903	0.27096	0.076957
mirtinol	0.13534	0.0086336	-0.034104
mirtenal	-0.087125	0.24337	0.062338
n-decanal	-0.032617	0.21828	0.11583
aldeído perílico	0.077503	-0.041099	-0.07289
acetato de geralina	0.11365	-0.023588	-0.0068167
α -cipereno	-0.18433	0.008343	-0.21359
Z-cariofileno	-0.040026	0.25794	0.13796
<i>E</i> -cariofileno	-0.22271	-0.17156	0.039823
α -humuleno	0.24938	0.016991	-0.073445
tridecanal	0.11237	-0.024291	-0.0068934
sesquiterpeno 1	-0.18667	-0.16165	-0.04599
sesquiterpeno 2	-0.10578	-0.18979	0.19463
isodauceno	-0.071158	0.0036955	-0.088566

Z-nerolidol	-0.11037	-0.19853	0.20199
γ -amorfino	0.099831	-0.047272	-0.086782
α -copaen-11-ol	-0.040719	0.26373	0.13849
sesquiterpeno 3	0.24624	-0.034838	-0.11053
longicanfenilona	0.080687	-0.034703	-0.068469
<i>epi</i> -longipinanol	0.069152	-0.037738	-0.064195
espatulenol	-0.041352	0.26735	0.14056
óxido de cariofileno	-0.083027	-0.19592	0.19356
β -coapen-4- α -ol	-0.15337	0.0048343	-0.17653
sesquiterpeno 4	0.24894	-0.047405	-0.096133
sesquiterpeno 5	0.1098	0.020746	-0.048542
<i>epi</i> - α -cadinol	0.10674	0.019029	-0.04627
sesquiterpeno 6	0.16612	-0.019348	-0.10198
<i>allo</i> -epóxido de aromadendreno	-0.038808	0.24887	0.12938
cedr-815-en-10-ol	-0.1065	-0.19103	0.19698
14-hidroxi-Z-cariofileno	-0.1095	-0.19824	0.20149
14-hidroxi-9- <i>epi</i> - <i>E</i> -cariofileno	-0.15863	0.017322	-0.21867
germacrona	0.20009	-0.015914	-0.054016
14-hidroxi- α -humuleno	0.099051	0.19704	0.13988
14-hidroxi-4,5-dehidro	0.15452	-0.040555	-0.11129
curcumenol	0.035255	-0.021017	-0.031958
benzoato de benzila	0.10824	0.014282	-0.038476
esquamulosa	0.090863	-0.048316	-0.08274
sesquiterpeno 7	-0.17774	0.0061002	-0.20778
sesquiterpeno 8	0.094232	-0.049376	-0.085379
14-acetoxi- α -humuleno	0.17571	-0.018782	-0.026976

IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os diferentes perfis químicos encontrados nos óleos essenciais das populações de *L. pinaster* dentro e entre as regiões de Minas Gerais podem resultar em diferentes efeitos biológicos caso seja feito uso destes materiais como recursos medicinais. Diante disso, esforços devem ser despendidos a fim de avaliar os possíveis efeitos terapêuticos dos óleos essenciais dos diferentes perfis químicos encontrados.

A distância genética encontrada entre as populações pode se dever há presença de um processo de especiação, não obstante a pressão antrópica, desmatamento e ocupação de terras de algumas das regiões estudadas, hipótese que pode ser testada em estudos posteriores. Em função do déficit de heterozigotos, endogamia, distância genética e diversidade química detectados entre as populações das diferentes regiões estudadas, recomenda-se a criação de um banco de recursos genéticos, bem como um programa e uma política de conservação da espécie para que esses recursos genéticos não sejam perdidos.