

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 29/03/2023.



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 <i>L. pinaster</i> , Minas Gerais, 2019. Marques, 2019. (A) Espécime de <i>L. pinaster</i> Mart. da região norte do estado de Minas Gerais, (B) Em detalhe, inflorescência de <i>L. pinaster</i>	6
Figura II – Imagens de indivíduos de <i>L. pinaster</i> , 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 <i>L. pinaster</i> 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 <i>L. Mart.</i> , 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 <i>L. pinaster</i> Mart.....	31
Figura 4 - Gráfico de <i>scores</i> (A) e de variáveis (B) da análise discriminante de populações de <i>L. pinaster</i> 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 – <i>Heatmap</i> dos compostos dos óleos essenciais em função das populações de <i>L. pinaster</i> . 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 – <i>Heatmap</i> resultante da análise de correlação dos compostos presentes no óleo essencial das populações de <i>L. pinaster</i>	49
Figura 7 – <i>Scores</i> das amostras de óleos essenciais das populações de <i>L. pinaster</i> 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.

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. **UFPA / 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 -terpene-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

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.