

MARCO TÚLIO PINHEIRO DE MELO

**CONSERVAÇÃO DE *Lippia sidoides* DO NORTE DE MINAS
GERAIS E VALE DO JEQUITINHONHA: LOCALIZAÇÃO,
COLETA, ECOGEOGRAFIA, CRESCIMENTO, MODO DE
REPRODUÇÃO E DIVERGÊNCIA GENÉTICA**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências Agrárias,
concentração em Agroecologia, do
Instituto de Ciências Agrárias da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências Agrárias.

Área de concentração: Agroecologia

Orientador: Prof. Dr. Ernane Ronie Martins

Montes Claros
2012

Elaborada pela Biblioteca Comunitária do ICA/UFMG

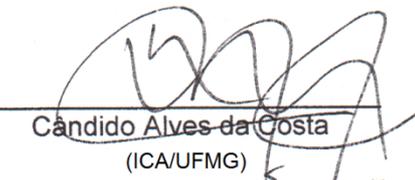
M528c 2012	<p>Melo, Marco Tulio Pinheiro de.</p> <p>Conservação de <i>Lippia sidoides</i> do norte de Minas Gerais e Vale do Jequitinhonha: localização, coleta, ecogeografia, crescimento, modo de reprodução e divergência genética / Marco Tulio Pinheiro de Melo. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2012.</p> <p>100.: il.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.</p> <p>Orientador: Prof. Ernane Ronie Martins.</p> <p>Banca examinadora: Alisson Moura Santos, Cândido Alves da Costa, Lourdes Silva de Figueiredo, Ernane Ronie Martins .</p> <p>Inclui bibliografia: f. 89-100.</p> <p>1. Plantas medicinais. 2. <i>Lippia sidoides</i> – Conservação. I. Martins, Ernane Ronie. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.</p>
	CDU: 633.88

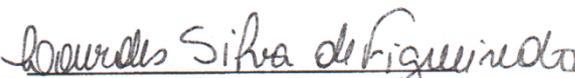
MARCO TÚLIO PINHEIRO DE MELO

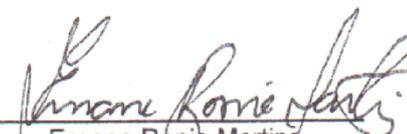
CONSERVAÇÃO DE *Lippia sidoides* DO NORTE DE MINAS GERAIS E
VALE DO JEQUITINHONHA: LOCALIZAÇÃO, COLETA,
ECOGEOGRAFIA, CRESCIMENTO, MODO DE REPRODUÇÃO E
DIVERGÊNCIA GENÉTICA

Aprovada em 13 de abril de 2012.


Alisson Moura Santos
(EMBRAPA)


Cândido Alves da Costa
(ICA/UFMG)


Lourdes Silva de Figueiredo
Coorientadora (ICA/UFMG)


Ernane Rónie Martins
Orientador (ICA/UFMG)

Montes Claros
2012

“Quantos anos uma montanha pode existir
Antes que ela seja dissolvida pelo mar?
E quantos anos algumas pessoas podem existir
Até que sejam permitidas a serem livres?
E quantas vezes um homem pode virar sua cabeça
E fingir que ele simplesmente não vê?

A resposta, meu amigo, está pairando ao vento
A resposta está pairando ao vento

E quantas vezes um homem precisará olhar para cima
Antes que ele possa ver o céu?
E quantas orelhas um homem precisará ter
Antes que ele possa ouvir as pessoas chorarem?
E quantas mortes ele causará até saber
Que pessoas demais morreram?

A resposta, meu amigo, está pairando ao vento
A resposta está pairando ao vento”

(Bob Dylan)

AGRADECIMENTOS

Em especial, a Deus por guiar e iluminar a minha caminhada e pela essencial presença em minha vida;

aos meus pais, Eduardo e Fátima Haddad, pelo apoio, criação e incentivo nessa árdua caminhada;

aos meus irmãos, Hudson e Catharine, pelos bons momentos, pelas conversas, pelos conselhos e pela amizade;

à Lorena Caldeira, pelo companheirismo, pela atenção, pelo apoio e pelo amor e carinho de sempre;

aos meus orientadores, Ernane Ronie Martins e Lourdes Silva de Figueiredo, pela oportunidade, pela confiança, pela orientação, pela atenção, pelos ensinamentos e pela amizade;

ao amigo, Pedro Henrique Lopes Silva, pela importante ajuda, pela dedicação e atenção com o trabalho, pelas contribuições e pela amizade;

ao Francisco Glicerio Ribeiro, pelos imprescindíveis e relevantes ensinamentos, pela atenção e indispensável colaboração com as análises isoenzimáticas;

aos professores, Flaviano Oliveira Silvério e Gevany Paulino de Pinho, e à mestranda, Ane Patrícia Cacique, pela valiosa contribuição com as análises químicas;

aos colegas, Willer Durval Lemos Coelho, Jacqueline Oliveira dos Santos e Cinthya Souza Santana, pela ajuda com as avaliações agronômicas e com a caracterização reprodutiva;

à Francine Martins, Sofia Maria Rocha, Aretusa Resende Mendes, Flávia Figueiredo, Julian, Thâmara Cavalcanti e Maria Clara Fernandes Figueiredo pela importante ajuda com as análises de laboratório e com a extração de óleo essencial;

à CAPES e à FAPEMIG, pelo auxílio financeiro durante o Mestrado;

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo importante subsídio financeiro que permitiu a realização do presente trabalho;

aos funcionários e amigos do ICA/UFMG, em especial, Aldinei, Júnior, Danilo, Flavinho e Maria Nazareth (Naza) pelos bons momentos e pelas agradáveis conversas;

Por fim, a todos que de alguma maneira contribuíram para realização e conclusão dessa pesquisa.

RESUMO

O alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) é uma planta medicinal com importante atividade antisséptica e antimicrobiana. A planta é considerada como prioritária para conservação e manejo. Dessa forma, o mapeamento e a caracterização dos locais de ocorrência da espécie são essenciais para a formulação de estratégias de conservação. Outro ponto importante é a implantação de um banco de germoplasma *in vivo*, que possibilite o desenvolvimento de estudos de crescimento, modo de reprodução e de divergência genética com diversos acessos da espécie e, conseqüentemente, gera informações imprescindíveis para definição de estratégias de conservação e melhoramento genético. Assim, os objetivos da presente pesquisa foi caracterizar os locais de ocorrência de populações de alecrim-pimenta, avaliar o comportamento agrônômico e a divergência genética de acessos da espécie, além de determinar o modo de reprodução da espécie. Foram amostradas 18 populações nas regiões norte de Minas Gerais e Vale do Jequitinhonha entre fevereiro de 2010 e janeiro de 2011. Em cada expedição, foram registradas as coordenadas geográficas e coletadas amostras de solo, folhas e estacas para propagação. O experimento agrônômico foi desenvolvido no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), Montes Claros -MG. Os acessos foram avaliados no delineamento experimental de blocos casualizados, com 14 acessos de *L. sidoides* e três repetições. Como dois acessos morreram, apenas doze foram submetidos à análise eletroforética de isoenzimas em gel de amido, visando a analisar a sua divergência genética. Os acessos foram agrupados seguindo o método de Tocher. Para a análise do modo de reprodução, foram utilizadas 30 flores coletadas de plantas matrizes no Horto Medicinal do ICA/UFMG. Conforme o estudo ecogeográfico, os acessos se encontram entre as coordenadas 15°38'31.00" e 18°24'31.70" de latitude Sul e 42°15'47.90" e 44°16'5.30" de longitude Oeste, com altitude média de 820m, variando entre 564 e 1264m. O teor de óleo essencial dos acessos, em ambiente natural, apresentou uma média de 3,40%, variando entre 0,28 e 7,78%. Aproximadamente 78% e 67% das populações ocorreram em solo distrófico e com acidez elevada a média, respectivamente. Os locais de ocorrência de todos os acessos apresentaram níveis muito baixos de fósforo. Em relação à matéria orgânica, os níveis variaram entre médio e bom. As regiões amostradas apresentaram solos com textura arenosa a média. Quanto ao bioma, 78% dos acessos ocorrem em regiões de Cerrado, 11%, em zonas de transição entre Cerrado e Mata Atlântica e 11%, em Mata Atlântica. Aproximadamente 94% dos acessos se encontram em regiões de clima tropical quente e subquente, variando entre semiárido e semiúmido. Em relação à precipitação, as regiões amostradas apresentam valores médios anuais menores que 1000mm (17%), 1000 – 1200mm (50%), 1200 – 1500mm (22%) e maiores que 1500mm (11% das regiões). A avaliação agrônômica mostrou que os acessos apresentaram diferenças significativas para as características: altura de planta, número de folhas, diâmetro do caule, fitomassa fresca e seca e produção de óleo essencial. Em relação ao modo de reprodução da espécie, a relação pólen/óvulo de *L. Sidoides* foi 1553 ± 443 grãos de pólen por óvulo. Os

resultados da divergência genética mostraram que os acessos ICA-05 e ICA-08 foram os mais dissimilares, enquanto ICA-08 e ICA-12 apresentaram a maior similaridade, pelos dados isoenzimáticos. A divergência genética por meio dos dados agronômicos apresentou ICA-02 e ICA-09 como os acessos mais similares e ICA-10 e ICA-12 como os menos similares. Com base nos resultados, conclui-se que grande parte dos acessos amostrados de *L. sidoides* ocorre naturalmente em solos mais pobres e ácidos, em vegetação típica do Cerrado, com climas quentes, em regiões com diferentes níveis de precipitação e grande variação de altitude. Os acessos ICA-12, ICA-11, ICA-01, ICA-07, ICA-06 e ICA-04 se mostram como os mais promissores para produção de fitomassa e óleo essencial, enquanto que o acesso ICA-10 foi o menos promissor. Os resultados de teor de timol evidenciam o significativo potencial do acesso ICA-05. A razão pólen/óvulo evidencia que a *L. sidoides* é alógama facultativa. Observa-se grande variabilidade genética nos acessos estudados.

Palavras-chave: Conservação *in situ*. Variabilidade genética. Caracterização agronômica. Isoenzimas. Relação pólen/óvulo. Plantas medicinais.

ABSTRACT

The "alecrim-pimenta" (*Lippia sidoides*) is a medicinal plant with important antiseptic and antimicrobial activity. The plant is considered as priority for conservation and management. Another important point is the implantation of an *in vivo* germplasm bank, which enables the development of studies of growth, reproduction mode and genetic diversity with several accessions of the species and, consequently, generates essential information to define conservation strategies and genetic improvement. Therefore, the objective of this study was to characterize the sites of occurrence of the populations of *alecrim-pimenta*, evaluate the agronomic behavior and the genetic divergence of species accessions, and also determine the reproduction mode of the species. Eighteen populations were sampled in the north of Minas Gerais regions and Jequitinhonha Valley between February 2010 and January 2011. On each expedition were recorded the geographic coordinates and collected samples of soil, leaves and cuttings for propagation. The agronomic experiment was carried out in the Instituto de Ciências Agrárias of Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), Montes Claros, Minas Gerais State. The accessions were evaluated on the experimental design of randomized blocks design, with 14 *L. sidoides* accessions with three replications. As two accessions had died, only twelve were analyzed through isoenzymes electrophoresis in starch gel, aiming to analyze its genetic divergence. The accessions were clustered following Tocher's method. To the reproduction mode analysis, 30 flowers were collected from stock plants in medicinal vegetable garden of ICA/UFMG were used. According to the ecogeographic study, the accessions are between the coordinates 15°38'31.00" e 18°24'31.70" of South latitude and 42°15'47.90" and 44°16'5.30" West longitude, with an average altitude of 820m, ranging from 564 and 1264m. The essential oil content of the accessions in natural environment presented an average of 3.40%, ranging between 0.28 and 7.78%. Approximately 78% and 67% of the populations occurred in dystrophic soil with high to medium acidity, respectively. The sites of occurrence of all populations presented very low levels of phosphorus. In relation to organic matter, the levels ranged between medium and good. The sampled regions presented sandy and medium soils. As for the biome, 78% of the populations occur in the *Cerrado* regions, 11% in areas of transition between *Cerrado* and Atlantic Forest and 11% in Atlantic Forest. Approximately 94% of the populations are in the tropical warm and under warm tropical, ranging from semiarid and semihumid. In relation to the precipitation, the sampled regions have annual average values less than 1000mm (17%), 1000 – 1200mm (50%), 1200 – 1500mm (22%) and higher than 1500mm (11% of the regions). The agronomic evaluation showed that the accessions presented significant differences to the variables: plant height, amount of leaves, stalk diameter, fresh and dry phytomass and essential oil production. In relation to the species reproduction mode, the pollen/ovule ratio of *L. Sidoides* was 1553 ± 443 pollen grains per ovule. The results of the genetic divergence showed the accessions ICA-05 and ICA-08 were the most dissimilar, while ICA-08 and ICA-12 presented the highest similarity by the isoenzymatic data. The genetic divergence by the agronomic data presented ICA-02 and ICA-09 as the most similar accessions and ICA-10 and ICA-12 as the lowest. Based on the

results, it can conclude that the most of the sampled populations of *L. sidoides* occur naturally in poor and acid soils, in typical vegetation of Cerrado, with warm weathers, in areas with different precipitation levels and great variation in altitude. The accessions ICA-12, ICA-11, ICA-01, ICA-07, ICA-06 and ICA-04 show itself as the most promising to the yield of phytomass and essential oil, while ICA-10 was the less promising accession. The results of thymol content evidenced the significant potential of accession ICA-05. The pollen/ovule ratio indicates that the specie is facultative alogamous. It was observed high genetic variability in the studied accessions.

Keywords: *In situ* conservation. Genetic variability. Agronomic characterization. Isoenzymes. Pollen/ovule ratio. Medicinal plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2 - LOCALIZAÇÃO, COLETA E ECOGEOGRAFIA DO ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides* Cham.), NO NORTE DE MINAS GERAIS E NO VALE DO JEQUITINHONHA

Figura 1 - Distribuição de 18 acessos de *Lippia sidoides* Cham., localizados no norte de Minas Gerais e no Vale do Jequitinhonha, em mapa de precipitação anual 43

Figura 2 - Distribuição de 18 acessos de *Lippia sidoides* Cham., localizados no norte de Minas Gerais e no Vale do Jequitinhonha, em mapa de Biomas 44

Figura 3 - Distribuição de 18 acessos de *Lippia sidoides* Cham., localizados no norte de Minas Gerais e no Vale do Jequitinhonha, em mapa de Clima .. 46

CAPÍTULO 3 - CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE FITOMASSA E DE ÓLEO ESSENCIAL DE ACESSOS DE ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides* Cham.) CULTIVADOS NO NORTE DE MINAS GERAIS

Gráfico 1 - Altura de 14 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados no norte de Minas Gerais no período de março a outubro de 2011..... 57

Gráfico 2 - Número de folhas de 14 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados no norte de Minas Gerais no período de março a outubro de 2011 58

Gráfico 3 - Diâmetro do caule de 14 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados no norte de Minas Gerais no período de março a outubro de 2011. Montes Claros, 2012 59

Figura 1 - Cromatogramas dos óleos essenciais de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados no norte de Minas Gerais 63

CAPÍTULO 4 - DIVERGÊNCIA GENÉTICA E MODO DE REPRODUÇÃO DO ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides* Cham.)

Figura 1 - Zimograma de Isocitrato-desidrogenase (IDH) de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados no norte de Minas Gerais..... 78

Figura 2 - Zimograma de Malato-desidrogenase (MDH) de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados no norte de Minas Gerais..... 79

Figura 3 - Zimograma de Chiquimato-desidrogenase (SKDH) de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados no norte de Minas Gerais..... 80

Figura 4 - Agrupamento de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. pelo método da ligação média não ponderada (UPGMA), baseado na caracterização isoenzimática, de acordo com a dissimilaridade do complemento aritmético do índice de Jaccard 82

Figura 5 - Dispersão gráfica e agrupamento de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham., com base nas coordenadas estimadas a partir da matriz de dissimilaridade obtida pelo índice de Jaccard..... 83

Figura 6 - Agrupamento de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. pelo método da ligação média não ponderada (UPGMA), baseado na caracterização agronômica, de acordo com a dissimilaridade da Distância Euclidiana Média..... 85

Figura 7 - Dispersão gráfica e agrupamento de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham., com base nas coordenadas estimadas a partir da matriz de dissimilaridade obtida pela Distância Euclidiana Média de caracteres agronômicos..... 87

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - LOCALIZAÇÃO, COLETA E ECOGEOGRAFIA DO ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides*) NO NORTE DE MINAS GERAIS E VALE DO JEQUITINHONHA

Tabela 1 - Caracterização geográfica e de precipitação dos locais de ocorrência de 18 acessos de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) coletados em Minas Gerais..... 42

Tabela 2 - Classificação vegetacional dos locais de ocorrência dos 18 acessos de *Lippia sidoides* Cham. amostrados..... 45

Tabela 3 - Classificação climática dos locais de ocorrência dos 18 acessos de *Lippia sidoides* Cham. amostrados. 47

Tabela 4 - Teor de óleo essencial de 18 acessos de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) coletados no norte de Minas Gerais e no Vale do Jequitinhonha..... 48

Tabela 5 - Características químicas e físicas do solo em 18 acessos de *Lippia sidoides* Cham. coletados no norte de Minas Gerais e Vale do Jequitinhonha 49

CAPÍTULO 3 - CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE FITOMASSA E DE ÓLEO ESSENCIAL DE ACESSOS DE ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides* Cham.) CULTIVADOS NO NORTE DE MINAS GERAIS

Tabela 1 - Acessos de *Lippia sidoides* Cham. utilizados na avaliação do crescimento e óleo essencial no norte de Minas Gerais..... 54

Tabela 2 - Equações lineares referentes à característica altura de 14 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados por 225 dias em Montes Claros – MG. 57

Tabela 3 - Equações lineares referentes à característica número de folhas de 14 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados por 225 dias em Montes Claros – MG. 59

Tabela 4 - Equações lineares referentes à característica diâmetro do caule de 14 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados por 225 dias em Montes Claros – MG. 60

Tabela 5 - Altura da planta, número de folhas e diâmetro do caule de 14 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados por 225 dias em Montes Claros – MG 60

Tabela 6 - Produção de fitomassa fresca (FMF), de fitomassa seca (FMS), de óleo essencial (Óleo), de teor de óleo essencial (Teor) e de teor de timol (Timol) de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados no norte de Minas Gerais 62

Tabela 7 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as características (fitomassa fresca – FMF; fitomassa seca – FMS; altura da planta – ALT; número de folhas – NFO; diâmetro do caule – DCA; produção de óleo essencial – OLE; teor de óleo essencial – TEO; teor de timol – TIM) analisadas de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. no norte de Minas Gerais 65

CAPÍTULO 4 - DIVERGÊNCIA GENÉTICA E MODO DE REPRODUÇÃO DO ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides* Cham.)

Tabela 1- Identificação dos acessos de *Lippia sidoides* Cham. avaliados ... 70

Tabela 2 - Soluções de extração e do eletrodo empregadas no processo de eletroforese de isoenzimas e na extração de enzimas de tecidos foliares de *Lippia sidoides* Cham 72

Tabela 3 - Número de óvulos e de grãos de pólen por flor e da relação pólen/óvulo (P/O) de *Lippia sidoides* Cham. 77

Tabela 4 - Medidas de dissimilaridade, entre 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham., obtidas a partir do complemento aritmético do índice de Jaccard.... 81

Tabela 5 - Análise de agrupamento, pelo método de Tocher, a partir dos dados isoenzimáticos dos 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham..... 82

Tabela 6 - Médias padronizadas de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. em relação a oito caracteres agronômicos 84

Tabela 7 - Medidas de dissimilaridade, entre 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham., obtidas a partir da Distância Euclidiana Média 85

Tabela 8 - Análise de agrupamento, pelo método de Tocher, a partir dos caracteres agronômicos dos 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham..... 86

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Plantas medicinais	18
2.1.1 Domesticação de espécies medicinais	19
2.1.2 Produção de plantas medicinais	21
2.2 <i>Lippia sidoides</i> Cham. (Alecrim-pimenta)	22
2.2.1 Origem e descrição botânica	22
2.2.2. Propriedades farmacológicas e constituição química..	23
2.2.3 Fenologia e cultivo	26
2.3 Variabilidade genética	28
2.3.1 Avaliação da variabilidade genética	30
2.3.2 Utilização de marcadores isoenzimáticos	31
2.5 Conservação	32
2.6 Coleta	33
2.7 Ecogeografia e erosão genética	34
2.8 Modo de reprodução	35
2.9 Crescimento	35

CAPÍTULO 2 - LOCALIZAÇÃO, COLETA E ECOGEOGRAFIA DO ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides*) NO NORTE DE MINAS GERAIS E VALE DO JEQUITINHONH

RESUMO.....	37
ABSTRACT	38
1 INTRODUÇÃO	39
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4 CONCLUSÃO.....	49

CAPÍTULO 3 - CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE FITOMASSA E DE ÓLEO ESSENCIAL DE ACESSOS DE ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides*) CULTIVADOS NO NORTE DE MINAS GERAIS

RESUMO.....	50
ABSTRACT	51
1 INTRODUÇÃO	52
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4 CONCLUSÃO.....	65

CAPÍTULO 4 - DIVERGÊNCIA GENÉTICA E MODO DE REPRODUÇÃO DO ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides* Cham.)

RESUMO.....	66
ABSTRACT	67
1 INTRODUÇÃO	68
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	70
2.1 Modo de reprodução	71
2.2 Caracterização isoenzimática.....	71
2.3 Caracterização agronômica.....	73
2.4 Divergência genética	74
2.4.1 Divergência genética por padrões isoenzimáticos .	74
2.4.2 Divergência genética por meio de caracteres agronômicos	74
2.5 Métodos de agrupamento.....	75
2.6 Projeção da divergência genética em gráficos cartesianos ...	75
2.7 Correlação entre as estimativas de divergência genética obtidas por meio de padrões isoenzimáticos e caracteres agronômicos	76
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1 Modo de reprodução	76

3.2	Divergência genética por padrões isoenzimáticos	77
3.3	Divergência genética por meio de caracteres agronômicos...	83
3.4	Correlação entre as estimativas de divergência genética	88
4	CONCLUSÃO	88
5	REFERÊNCIAS	89

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade os homens buscam, na natureza, recursos para aumentar a sua longevidade e, com observações, descobriram diversas propriedades e efeitos de algumas plantas, o que contribuiu para que os primeiros observadores da natureza elevassem as plantas à categoria de entidades divinas. Com isso, o homem aprendeu a tirar proveito dos recursos naturais. No Brasil, antes da chegada dos europeus já havia o uso das plantas medicinais pelos indígenas, que transmitiram o conhecimento e os usos das ervas locais às gerações seguintes (LORENZI; MATOS, 2008).

Segundo Ming *et al.* (2003), o uso de plantas como medicamento vem aumentando dia a dia em todo o mundo, realidade que também é bastante visível no Brasil. Por diversos motivos, sejam de ordem médica, social, cultural, econômica ou filosófica, as plantas medicinais têm sido opção terapêutica para uma parcela crescente da população brasileira, rural ou urbana.

Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que 80% da população mundial fizeram uso de algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia nos últimos tempos (MARTINS *et al.*, 2000).

As substâncias medicinais naturais usadas em farmácias populares em todo o mundo continuarão contribuindo para a saúde, como tem feito há milhares de anos, entretanto, há muitos obstáculos para a sua exploração e o seu uso generalizado (TOMLINSON; AKERELE, 1998), tais como: poucas iniciativas e/ou experiências no cultivo de plantas medicinais nativas e falta de informações técnicas para o cultivo (MING *et al.*, 2003). Dessa forma, estudos agronômicos referentes ao espaçamento de plantio, à adubação, à irrigação, à propagação, etc, são significativamente relevantes para superar esses obstáculos.

Lippia sidoides é um subarbusto nativo na região norte de Minas Gerais e no Vale do Jequitinhonha, além do Nordeste brasileiro. A espécie apresenta óleos essenciais que são utilizados comercialmente e conferem

propriedades farmacológicas importantes, principalmente como antisséptico e antimicrobiano. Devido a sua grande importância, *L. sidoides* foi incluída em programas de fitoterapia e listada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Rennisus), além de ser considerada como uma das sete espécies prioritárias da Caatinga para conservação e manejo (VIEIRA; SILVA, 2002). A planta vem sendo cultivada, no entanto a variabilidade genética da espécie não tem sido explorada, uma vez que se percebe grande ocorrência da mesma em estado nativo, com aparente variabilidade química, mas sem que se conheça o seu real potencial químico ou agrônomo. Assim, a presente pesquisa, como parte inicial do programa local de "Conservação de Recursos Genéticos de *Lippia sidoides*", visou a conhecer e a avaliar a diversidade da espécie no norte de Minas Gerais e no Vale do Jequitinhonha, subsidiando a domesticação e o melhoramento para a produção de óleo essencial. Para isso, objetivou-se localizar e coletar amostras de populações da espécie no norte de Minas Gerais e no Vale do Jequitinhonha, realizar levantamento ecogeográfico, montar banco ativo de germoplasma *in vivo*, avaliar o crescimento dos acessos, determinar o teor de óleo essencial e de timol no óleo, identificar o modo de reprodução da espécie e avaliar a divergência genética, por meio de marcadores isoenzimáticos e dados agrônomo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

O uso de plantas medicinais no tratamento e na cura de enfermidades existe desde a antiguidade. Ainda hoje, são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que 80% da população mundial dependem da medicina tradicional para as suas necessidades primárias de saúde (MARTINS *et al.*, 2000). Apesar de não terem todos os seus constituintes químicos conhecidos, diversas espécies são prescritas com frequência, devido aos efeitos medicinais que produzem.

Esses efeitos são conhecidos com base em observações populares, fato esse que contribui significativamente para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais (MACIEL *et al.*, 2002). Esses autores afirmam que esse tipo de cultura medicinal desperta, de maneira indireta, o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo diversas áreas, enriquecendo os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural (a flora mundial).

Segundo Ming *et al.* (2003), o uso de plantas como medicamento vem aumentando dia a dia em todo o mundo, realidade que também é bastante visível no Brasil. Por diversos motivos, sejam de ordem médica, social, cultural, econômica ou filosófica, as plantas medicinais têm sido opção terapêutica para uma parcela crescente da população brasileira, rural ou urbana.

Além do aspecto social, que envolve o largo uso das plantas pelas populações, há que se destacar a importância econômica dessas espécies, tanto para as indústrias farmacêuticas, quanto para os agricultores. A maior parte das espécies utilizadas é nativa, obtida por meio do extrativismo, sem o uso de manejo sustentado. Somente algumas espécies medicinais são cultivadas e, quase sempre, em pequena escala (MING, 1998). É interessante destacar que a maior parte dessas espécies é coletada e não cultivada, situação que deveria ser incomum, ainda mais pelo momento em que as tecnologias agrícolas de produção estão avançadas. Porém poucas são as iniciativas e/ou experiências no cultivo de espécies medicinais nativas (MING *et al.*, 2003). Esses autores ainda exemplificam casos de espécies; *Tabebuia impetiginosa*, *Pfaffia glomerata*, *Maytenus ilicifolia*, *Polygonum acre*, *Myrcia multiflora*, *Echinodorus macrophyllus*, que são exportadas pelo Brasil e não apresentam áreas de cultivo registradas, o que supõe que essas plantas são obtidas por extrativismo.

2.1.1 Domesticação de espécies medicinais

A domesticação das plantas é um processo em que, por meio da seleção, alguns tipos mais apropriados para as necessidades ou interesses do ser humano são favorecidos, com o objetivo de tornar essas populações

mais úteis ao mesmo. Essa domesticação vai desde populações naturais de plantas em seu ambiente natural até uma monocultura com um único genótipo, passando por várias situações intermediárias ou diferentes intensidades de alterações genéticas e da paisagem (REIS *et al.*, 2003).

O manejo sustentado ou a domesticação e desenvolvimento de tecnologias de cultivo são as ações mais urgentes para a conservação dos recursos genéticos das espécies já ameaçadas, visando livrá-las da constante pressão do extrativismo desordenado (SCHEFFER *et al.*, 1998).

O cultivo e, especialmente, o extrativismo são duas estratégias básicas para a obtenção de matéria-prima de plantas medicinais. A primeira se refere ao cultivo propriamente dito e a segunda se constitui na possibilidade da retirada do produto diretamente do ambiente natural (REIS *et al.*, 2003). Ainda de acordo com esses mesmos autores, nem todas as espécies são facilmente domesticadas para a adaptação a um cultivo em regiões diferentes. Plantas que se implantam em pleno sol em áreas descobertas ou degradadas ou que se desenvolvem em locais em fase de recuperação, como *Achyrocline satureioides*, *Bauhinia forficata*, espécies dos gêneros *Baccharis*, *Mikania* e *Croton*, permitem o uso de estratégias de cultivo para a obtenção de fitoprodutos. Porém, torna-se difícil a exploração intensiva de espécies cujas características ecológicas não permitem alterações na paisagem, como *Ocotea odorífera*, *Cissampelos pareira*, *Copaífera langsdorffi*, dentre outras, que são tipicamente climáticas, tornando o cultivo convencional muito difícil.

A possibilidade de cultivo de plantas medicinais implica no domínio tecnológico de todas as etapas de desenvolvimento da espécie. Assim, a estratégia de obtenção de fitomassa requer conhecimentos sobre a propagação, a adaptação ao ambiente de cultivo, a forma de crescimento, senescência, etc.. Um ponto importante a ser considerado é a relação da produção de fitomassa com a qualidade da planta, pois, além da produtividade ótima, o rendimento dos princípios ativos é que define o potencial medicinal da espécie (REIS *et al.*, 2003).

2.1.2 Produção de plantas medicinais

Há grande volume de informações de plantas medicinais sendo produzido pela pesquisa, o que poderia levar a medicamentos eficazes de baixo custo. No entanto a transformação das informações obtidas em medicamentos para a população esbarra na dificuldade de obtenção de matéria-prima e na quantidade necessária para a produção dos mesmos (SCHEFFER, 1998). Corrêa Júnior (1998) admite que a maioria das plantas medicinais utilizadas pela população é nativa, crescendo espontaneamente nas mais diferentes formações vegetais do país e que a coleta indiscriminada dessas plantas nativas pode levá-las a um processo inexorável de extinção. Esse autor relata que a comercialização de plantas medicinais é um mercado com predominância de intermediários, grandes atacadistas, exportadores, importadores, laboratórios, etc., praticamente sem atuação de organizações de produtores, o que implica numa oferta no mercado de produtos com baixa qualidade e sem as características intrínsecas desejadas. Dessa forma, se houvesse mais organização nessa atividade, o mercado de plantas medicinais poderia crescer cada vez mais e com produtos com maior qualidade.

Embora a maior parte da produção de plantas medicinais no Brasil seja proveniente do extrativismo, a produção da matéria-prima vegetal com qualidade e sustentabilidade exige o cultivo da espécie em condições controladas.

Nem sempre as condições ideais para o desenvolvimento e produção de biomassa são as mais adequadas para a produção de princípios ativos, como os óleos essenciais (REIS; MARIOT, 2000). Algumas plantas produzem os princípios ativos em condições onde o solo apresenta boa fertilidade e outras em condições de estresse de escassez de nutrientes. O nitrogênio, por exemplo, possui ação bem controversa: quando em déficit, provoca, em papoula (*Papaver somniferum*) e em beladona (*Atropa beladonna*), aumento da concentração dos alcaloides, enquanto na lobélia (*Lobelia inflata*), há redução (MARTINS *et al.*, 2000). Em seus experimentos com adubação orgânica em *Lippia alba*, Ming (1998) observou que, à medida que se

aumentava a quantidade de matéria orgânica incorporada do solo, diminuía-se o teor de óleos essenciais. Muitas espécies produzem substâncias ativas quando submetidas a condições de estresse, como uma reduzida disponibilidade de nutrientes no solo, pois, em geral, o princípio ativo de interesse está associado ao metabolismo secundário da planta, que reflete adaptações a condições adversas ou a mecanismos de defesa (REIS; MARIOT, 2000).

2.2 *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta)

2.2.1 Origem e descrição botânica

Lippia sidoides Cham. tem origem no nordeste do Brasil Pertence à família Verbenaceae e é conhecida popularmente como alecrim-pimenta ou estrepa-cavalo. A espécie ocorre também no semiárido mineiro. A família Verbenaceae compreende 36 gêneros, incluindo herbáceas, sub-herbáceas e árvores (LORENZI; MATOS, 2008).

L. sidoides é um arbusto, de porte ereto, com até três metros de altura, que apresenta comportamento caducifólio. Possui caule muito ramificado e quebradiço, com folhas simples e pecioladas, que medem de dois a três centímetros de comprimento, com margens crenadas e pelos esbranquiçados, extremamente aromáticas e picantes. Porém, se cultivada em solos de alta fertilidade, a *L. sidoides* pode produzir plantas com folhas muito maiores, podendo chegar até a oito centímetros de comprimento. As flores são pequenas, aproximadamente 1 – 2 mm de tamanho, de coloração branco-amareladas, dispostas em inflorescências subglobosas e subpiramidais. Os frutos são reunidos em conjuntos quadrangulares, com sementes extremamente pequenas e dificilmente visíveis (LORENZI; MATOS, 2008; MARTINS *et al.*, 2000; MATOS; OLIVEIRA, 1998).

2.2.2. Propriedades farmacológicas e constituição química

Lippia sidoides é indicada para impinges, acne, pano branco, aftas, escabiose, caspa, maus odores nos pés e axilas, sarna infecciosa e pé-de-atleta, além de inflamações da boca e garganta, antiespasmódico e estomáquico (MARTINS *et al.*, 2000). Apresenta também forte atividade contra o principal causador da cárie dentária, a *Streptococcus mutans*, podendo ser usada como medicação anticárie preventiva na forma de creme dental e enxaguatório bucal; também pode ser adicionado a cosméticos, como antisséptico contra a mucoflora. As folhas e flores secas e trituradas do alecrim-pimenta também são usadas como temperos para carnes e pizzas (LORENZI; MATOS, 2008). Na fitoterapia, destaca-se pelas suas propriedades antibacterianas, analgésicas, sedativas, expectorantes, estimulantes e estomáquicas (SILVA; CASALI, 2000). Foi comprovada a eficiência no uso veterinário, na profilaxia ou no tratamento de doenças da cavidade oral de cães (GIRÃO *et al.*, 2001). Em levantamento realizado em Maracanaú - CE, por Silva *et al.* (2006), observou-se a produção de fitoterápicos a partir do alecrim-pimenta. São eles: antisséptico bucal - indicado para o caso de aftas, mau hálito, inflamações da boca e garganta; tintura - indicada para antissepsia (pele e garganta) e compressas; sabonete - indicado para diversos casos de afecções cutâneas.

As folhas de alecrim-pimenta apresentam de 1,5 a 7,78% de óleo essencial, que é composto de monoterpenos e sesquiterpenos, destacando-se o timol e o carvacrol, que constituem aproximadamente 56,7% e 16,7%, respectivamente, do óleo essencial, sendo consideradas as principais substâncias desse, especialmente o timol, que está entre as substâncias naturais mais requisitadas por diferentes setores industriais. Outro fato importante é que o teor de timol é muito maior no óleo essencial do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) do que no de Tomilho (*Thymus vulgaris*), planta que apresenta expressivo volume de importação pelo Brasil (LORENZI; MATOS, 2008; MATOS; OLIVEIRA, 1998; TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996). O timol é a substância responsável pelo cheiro característico e tem forte ação antimicrobiana contra fungos e bactérias

(CARVALHO *et al.*, 2003). Essa substância, aplicada na larva do *Aedes aegypti*, causa 100% de mortalidade, enquanto o carvacrol, nenhuma mortalidade (CARVALHO *et al.*, 2003). Em relação a essa eficiência frente às larvas, Costa *et al.* (2005) recomendam a aplicação do óleo essencial de alecrim-pimenta na concentração de até 100 mg . L⁻¹.

Em estudos com óleo essencial de *L. sidooides*, Mendonça *et al.* (1990) avaliaram a sua toxicidade e alergenicidade na utilização como cosméticos. Foram feitos testes oftálmicos e cutâneos em coelhos e em humanos, verificando-se que não houve reação positiva quando utilizado na concentração de 1%. Em relação à toxicidade, esses autores verificaram uma atividade antimicrobiana significativa, pela ação do timol.

Em relação à atividade antimicrobiana do óleo essencial do alecrim-pimenta, Botelho *et al.* (2007b) constataram grande eficiência dessa substância contra bactérias cariogênicas e *Candida albicans*, que é um fungo frequentemente associado aos portadores do vírus HIV.

O óleo essencial também é indicado no tratamento de gengivite, confirmando o seu uso odontológico (RODRIGUES *et al.*, 2009). A utilização do óleo do alecrim-pimenta na concentração de 1% resultou na significativa diminuição da placa bacteriana, da inflamação e do sangramento da gengiva. Além disso, essa redução foi estatisticamente semelhante ao controle com o gluconato de clorexidina, que é um antisséptico químico comercial (BOTELHO *et al.*, 2007a).

Em outro trabalho, Oliveira *et al.* (2006) isolaram estirpes da bactéria *Staphylococcus aureus* de diferentes materiais clínicos. Em comparação com alguns antibióticos, o óleo essencial de *L. sidooides*, em concentração absoluta, apresentou inibição total das bactérias, enquanto os antibióticos não proporcionaram tanta eficiência.

Em uma pesquisa realizada com camundongos, Monteiro *et al.* (2007) confirmaram as propriedades antiinflamatórias, antioxidantes e gastroprotetores do alecrim-pimenta. A utilização do óleo essencial melhorou e inibiu inflamações no ouvido e lesões gástricas, com resultados tão eficientes quanto o tratamento com medicamentos comerciais. Além disso, o

óleo não afetou o valor de proteínas do muco gástrico, comparado ao medicamento comercial.

Analisando-se a atividade antifúngica e os aspectos toxicológicos do óleo de *L. sidoides*, Fontenelle *et al.* (2007) verificaram que esse inibiu, totalmente, o crescimento fúngico de diversas cepas de *Microsporium canis* e foi mais eficiente que o antifúngico anfotericina B na inibição do crescimento de *Candida* spp. e constataram também, que a aplicação de até três gramas do óleo, por quilograma de peso corporal, via oral, em camundongos, não gerava toxicidade. De acordo com Almeida *et al.* (2009), a aplicação de extrato hidroalcolico de folhas de alecrim-pimenta, via intraperitoneal, apresenta toxicidade aguda.

Segundo Camurça-Vasconcelos (2006), o óleo apresenta potencial anti-helmíntico, sendo indicado para o controle de nematoides gastrintestinais de camundongos e de pequenos ruminantes.

Oliveira *et al.* (2008b) sugerem o uso do óleo essencial do alecrim-pimenta como alternativa para o controle de contaminantes em Laboratórios de Cultura de Tecidos de Plantas, uma vez que esse óleo apresentou controle na inibição do crescimento micelial dos fungos: *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp e *F. oxysporum*.

Silva *et al.* (2009b) indicam o uso do óleo essencial no controle da antracnose, uma vez que inibiu 100% a germinação dos esporos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da doença.

Em outro trabalho, Reis (2009) confirmou a atividade bactericida da *L. sidoides*, indicando um possível potencial para a utilização na bioconservação de alimentos e na garantia da qualidade de pescados.

Fernandes *et al.* (2011) verificaram a eficiência da espécie frente aos fungos do gênero *Candida*, evidenciando o seu potencial como antifúngico natural para fins medicinais, cosméticos e alimentícios.

Medeiros *et al.* (2011), em recente estudo, verificaram o óleo essencial da espécie como um agente promissor no controle da Leishmaniose cutânea. Outro importante trabalho foi realizado por Moreira *et al.* (2011), que avaliaram a atividade antifúngica de proteínas presentes nas flores de *L. sidoides*. O estudo gerou resultados promissores para futuras pesquisas,

indicando potencial para a produção de plantas resistentes contra fungos, reduzindo o uso de fungicidas químicos e melhorando a qualidade e a segurança de produtos vegetais.

Siqueira *et al.* (2011) estudaram fungos endofíticos presentes nas folhas e no caule da espécie. Os resultados indicaram potencial farmacêutico desses fungos para a produção de compostos antimicrobianos.

De acordo com Alves *et al.* (2004), o óleo essencial de *L. sidoides* apresenta efeito fitotóxico em sementes de alface, indicando possível alelopatia inibitória para o tratamento de sementes.

2.2.3 Fenologia e cultivo

De acordo com estudos realizados no norte de Minas Gerais, em condições naturais, o alecrim-pimenta é fortemente influenciado pelos fatores climáticos, especialmente vinculados à disponibilidade de água para a planta, como a precipitação e a umidade relativa do ar. Dessa forma, a espécie apresenta brotação de folhas durante o período das chuvas, folhas maduras e floração nos últimos meses desse período, sendo que a floração pode se estender, com menor intensidade, até o início das secas. A frutificação ocorre logo após o pico de floração, dispersando os frutos rapidamente e, em seguida, intensificando o processo de queda foliar, que dura até o início do próximo período de chuvas (CARVALHO JÚNIOR *et al.*, 2011). Apesar do comportamento caducifólio da espécie, tem-se observado que o alecrim-pimenta mantém as folhas maduras, além do processo de brotação, se irrigado periodicamente.

O cultivo do alecrim-pimenta por semeadura é pouco recomendado, uma vez que as sementes são muito pequenas, o que dificulta a coleta e a manipulação das mesmas (MATOS; OLIVEIRA, 1998). Além disso, segundo Lorenzi e Matos (2008), as sementes raramente germinam. Normalmente, a propagação de *L. sidoides* é realizada por alporquia e estaquia (MARTINS *et al.*, 2000), sendo essa última a técnica de multiplicação vegetativa mais comumente utilizada para a clonagem (ASSIS; TEIXEIRA, 1998), pois é altamente eficiente, de baixo custo e de fácil execução, tornando-se bastante

viável na propagação da espécie (FACHINELLO *et al.*, 2005). A coleta das estacas deve ser realizada no início da manhã, provavelmente por esse ser um período em que as plantas matrizes não se encontram com déficit hídrico (CARVALHO JÚNIOR *et al.*, 2009a).

Após o preparo das mudas, essas devem ser mantidas em ambiente com atmosfera saturada d'água até a formação das raízes, cerca de um a dois meses (FACHINELLO *et al.*, 2005; MATOS; OLIVEIRA, 1998). O substrato no qual são colocadas as estacas e o sistema de irrigação são muito importantes para o sucesso do enraizamento, sendo que o substrato deve apresentar capacidade de retenção de umidade para que as raízes encontrem um ambiente propício para se desenvolverem, formando um bom sistema radicular (MING *et al.*, 1998). A utilização de leitos de enraizamento com umidade controlada é de grande importância para a sobrevivência das estacas (POGGIANI; SUITER, 1974), uma vez que essa condição de climatização controla a perda de água pelas estacas e reduz as temperaturas da folha e do ar (HARTMANN *et al.*, 2002). Figueiredo *et al.* (2009a), ao estudarem o enraizamento de estacas de *L. sidoides* em leito de enraizamento sob nebulização intermitente, admitem que não há necessidade da utilização de ácido indolbutírico no enraizamento da espécie. Oliveira *et al.* (2008a) sugerem a utilização de estacas apicais nesse processo de propagação, pois essas tendem a apresentar uma maior quantidade de raízes por estaca. Em relação ao tamanho, Carvalho Júnior *et al.* (2009b) recomendam a utilização de estacas apicais com 14,1 a 17cm de comprimento, uma vez que apresentam maior ramificação das raízes e emissão de brotações e, conseqüentemente, maior vigor do material propagativo formado.

A presença de folhas e gemas exerce forte influência estimuladora no enraizamento, pois os carboidratos resultantes da atividade fotossintética da planta também contribuem para a formação de raízes, apesar de que os efeitos estimuladores de folhas e gemas devam-se principalmente, à produção de auxina (MING *et al.*, 1998).

De acordo com Souza *et al.* (2007), a *L. sidoides* deve ser cultivada em condições de luz plena, uma vez que o sombreamento afeta, negativamente,

a produção de óleo essencial. Esses autores relacionam os valores máximos desse princípio ativo ao número de inflorescências, que apresentou correlação positiva com o teor de óleo essencial. Em relação ao espaçamento de plantio, recomenda-se o de 1,0 x 0,5m, sendo 1,0m entre fileiras e 0,5m entre plantas na fileira, pois proporciona uma maior produção de fitomassa e óleo essencial por área (MELO *et al.*, 2011a). Recomenda-se a colheita da espécie 180 dias após o transplante das mudas, no período da manhã, por volta de 10 horas (FIGUEIREDO *et al.*, 2009b; MELO *et al.*, 2011b).

Segundo Radunz *et al.* (2002a), o teor de timol no óleo essencial de *L. sidooides* não é afetado pela temperatura do ar de secagem das folhas, podendo variar entre 40 e 70°C. Porém recomenda-se o processo sob a temperatura de 70°C, uma vez que apresenta o menor tempo de secagem e não afeta, significativamente, o rendimento de óleo essencial (RADUNZ *et al.*, 2002b). Esses autores ainda não recomendam a secagem das folhas à temperatura ambiente, pois o tempo gasto é demasiadamente alto, favorecendo o desenvolvimento de patógenos e posterior degradação do princípio ativo.

2.3 Variabilidade genética

A diversidade biológica ou biodiversidade é representada pela variação genética entre o habitat e as espécies, seja entre populações geograficamente separadas como entre indivíduos de uma mesma população. Também inclui a variação entre as comunidades biológicas, os ecossistemas e a interação desses (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). A variação genética entre as espécies é importante, pois gera indivíduos com características distintas, propiciando capacidade de adaptação aos fatores ambientais e aos teores de metabólitos. E também, contribui, significativamente, para os programas de melhoramento genético e favorece a seleção de plantas superiores.

Os recursos genéticos de plantas medicinais podem ser divididos em dois grandes grupos, plantas exóticas e plantas nativas. As espécies exóticas

foram trazidas por imigrantes, em distintas épocas e o seu uso foi gradativamente incorporado no Brasil. Normalmente, as plantas exóticas são cultivadas e bastante consumidas pela população urbana ou são industrializadas. Algumas espécies apresentam significativa importância, como *Chamomilla recutita*, *Mentha* sp., *Ocimum basilicum* e *Rosmarinus officinalis*. Outras se aclimatizaram em algumas regiões, constituindo-se em espécies ruderais ou naturalizadas, sendo utilizadas por diversas populações. Como exemplo, há *Ageratum conyzoides*, *Leonurus sibiricus*, *Momordica charantia*, *Plantago major*, *Senna occidentalis*, *Stachytarpheta cayennensis*, *Peperomia pellucida*, *Sida rhombifolia*, *Phyllanthus* spp., *Chenopodium ambrosioides* e *Taraxacum officinale* (SCHEFFER *et al.*, 1998).

Diferentemente das espécies exóticas, as nativas, em sua maioria, não são cultivadas, sendo obtidas por processos de extrativismo. Algumas apresentam aspecto comercial importante, sendo consumidas em larga escala no Brasil e no exterior, como é o caso da *Paulinia cupana*, *Tabebuia* sp, *Pfaffia* sp., *Polygonum* sp., *Echinodorus* sp., *Maytenus ilicifolia*, *Trichilia catigua*, *Casearia sylvestris*, *Ptychopetalum olacoides*, *Cephaelis ipecacuanha*, *Smilax* sp., *Bauhinia* sp. e da *Dimorphandra mollis*. Outras espécies nativas têm importância regional, com consumo em menores proporções, como é o caso da *Baccharis articulata*, *Achyrocline satureioides*, *Hymenaea* sp., *Lychnophora pinaster*, *Brosimum gaudichaudii*, *Pterodon* sp., *Cecropia glaziouvii* e da *Mikania glomerata*. No Nordeste brasileiro, vale ressaltar o uso da canela da *Croton zehntneri*, *Lippia sidoides*, *Operculina macrocarpa* e da *Vanillosmopsis arborea* (SCHEFFER *et al.*, 1998).

O Brasil é um país que apresenta a maior biodiversidade do mundo, cerca de 20 a 25%, porém diversos problemas, como semelhanças de características, nome científico incorreto, poucos profissionais e complexidade, dificultam a catalogação e a classificação das espécies (GOEDERT, 2007; PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Ainda segundo esses autores, estima-se que os taxonomistas descreveram de 10 a 30% das espécies existentes no mundo e muitas serão extintas antes mesmo de serem descritas. Portanto, devem ser traçadas estratégias para a identificação botânica e o mapeamento das espécies, principalmente nas

regiões de rica biodiversidade, como o Brasil. Assim, essas informações servirão como base para os programas de conservação. Outro ponto importante é o fortalecimento de iniciativas para a conservação de espécies em seus habitats naturais, de forma integrada com o sistema formal de conservação *ex situ* (GOEDERT, 2007).

A variabilidade genética se constitui na fonte primária dos estudos genéticos e sem ela não seria possível, entretanto, ocorrer adaptações e evolução nas espécies, bem como melhoramento genético. Assim, o sucesso de qualquer programa de melhoramento depende, fundamentalmente, da variabilidade genética (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Porém, devido ao extrativismo intenso e à implantação de monocultivos, diversas espécies medicinais sofreram perdas significativas de variabilidade genética. De acordo com Oliveira e Martins (1998) e Martins *et al.* (2000), o melhor exemplo é o caso da ipeca (*Psychotria ipecacuanha*), que teve a sua diversidade genética reduzida tanto pelo extrativismo em larga escala, quanto pela redução das matas onde ocorria naturalmente. Dessa forma, torna-se cada vez mais importante a conservação dos recursos genéticos das plantas medicinais, especialmente daquelas que se encontram ameaçadas. Assim, o estudo e a conservação do germoplasma é a melhor forma de preservar e conhecer a diversidade genética. De acordo com Pires e Gripp (1988), toda pesquisa realizada com plantas medicinais só terá aplicação se asseguradas a sobrevivência e a disponibilidade do material genético nela empregado para as pesquisas correspondentes, que poderá ser feito num banco de germoplasma.

2.3.1 Avaliação da variabilidade genética

Conforme Cruz (2008), a variabilidade genética pode ser avaliada a partir de características agronômicas, morfológicas, moleculares, entre outras. No entanto a influência ambiental pode interferir, decisivamente, na estimativa das características agronômicas e morfológicas. Assim, marcadores moleculares e bioquímicos evitam muitos dos problemas decorrentes da influência ambiental, pois permitem analisar a variação

diretamente nos produtos gênicos (proteínas) ou no genoma (DNA). Entre as vantagens dos marcadores moleculares, destacam-se a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do estágio do desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos (FALEIRO, 2007).

Segundo Moreira et al. (1994), a divergência genética relaciona-se com o grau em que as populações se distanciam entre si, quanto ao conjunto de caracteres que lhe são peculiares. É, portanto, a distância entre as populações que está sendo comparada. A diversidade genética se refere ao grau em que a base genética difere dentro de uma população.

Na análise da divergência genética, alguns métodos multivariados são empregados (CRUZ, 2008):

- matrizes de dissimilaridade;
- análises de agrupamento (Tocher, métodos hierárquicos, dispersão gráfica, etc.).

As medidas de dissimilaridade são de grande importância em estudos de divergência genética, em que se procura identificar genitores a serem utilizados em programas de hibridação. Os métodos de agrupamento permitem o estabelecimento de grupos, de modo que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos (CRUZ, 2008).

2.3.2 Utilização de marcadores isoenzimáticos

Os marcadores moleculares têm sido utilizados em diversos trabalhos, visando à tomada de decisões na conservação de recursos genéticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Em conformidade com Faleiro (2007), o uso desses marcadores permite a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente, a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio de desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos. Esse autor afirma que esses marcadores têm permitido estudos de evolução, de diversidade genética, de identidade, origem genética e identificação de novas variantes, gerando informações importantes para

subsidiar diferentes ações de pesquisa desde a coleta até o uso dos recursos genéticos em programas de melhoramento.

Entre as classes de marcadores moleculares existentes, os baseados em Sequências Simples Repetidas (SSR), ou microssatélites, são bastante utilizados, entretanto apresentam alto custo, para o desenvolvimento de primers específicos (FALEIRO, 2007) e requerem estudo prévio do genoma (ZUCCHI, 2002). Marcadores isoenzimáticos apresentam baixo custo, metodologia rápida e fácil (FALEIRO, 2007), não requerem estudo prévio do genoma e são particularmente úteis, porque podem ser usados em praticamente qualquer espécie. Geralmente, são codominantes, possibilitando identificar todas as classes genotípicas; além disso, permitem a análise rápida de grande número de amostras (ROBINSON, 2006).

Foi verificado que as isoenzimas são de grande utilidade em estudos da estrutura genética de populações naturais e em estudos de divergência genética (CAMPOS TELLES et al., 2003; GONÇALVES *et al.*, 2010; LOPES et al., 2003; MELO JÚNIOR et al., 2004; SILVA *et al.*, 2009a).

As isoenzimas são definidas como diferentes formas moleculares de uma enzima catalisando a mesma reação na célula. Essas formas representam a consequência bioquímica da substituição, deleção ou adição de um ou mais aminoácidos no polipeptídeo (ROBINSON, 2006) e constituem o polimorfismo isoenzimático.

2.5 Conservação

A variação genética pode ser mantida pelo uso de diferentes metodologias. Dentre as metodologias nos recursos genéticos, as mais importantes são: conservação *in situ*, aquela onde as espécies são mantidas no hábitat natural, e conservação *ex situ*, que é realizada com a criação de bancos de germoplasma fora do ambiente de origem do material genético (GUERRA; NODARI, 2003). Segundo Giacometti (1984), banco de germoplasma é a organização ampla que inclui atividades como coleta, conservação, caracterização, avaliação, regeneração e informação dos dados. Enquanto a coleta visa a aquisição do germoplasma, a caracterização

e a avaliação objetivam não só o reconhecimento do real valor do germoplasma, como também a distinção entre os acessos.

No Brasil, o Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) foi criado em 1974, para coordenar os recursos genéticos do país. Esse centro de pesquisa possui a “coleção base”, com a manutenção de sementes em câmaras a -18°C e as “coleções ativas”, que são bancos de germoplasma em diversos locais do país. Essas coleções consistem de plantas no campo que fornecem material genético para pesquisa ou enriquecimento da coleção base e apresentam significativa relevância para a conservação dos recursos genéticos nacionais. As atividades realizadas envolvem a coleta, o intercâmbio, a caracterização botânica, a avaliação agrônômica, a documentação e a informação (PIRES; GRIPP, 1988).

2.6 Coleta

De acordo com Walter *et al.* (2007), a coleta de germoplasma é o conjunto de atividades que visa à obtenção de unidades físicas vivas, que contenham a composição genética de um organismo ou amostra populacional de determinada espécie, com a habilidade de se reproduzir. Com o constante desmatamento e degradação ambiental, além dos monocultivos, diversas espécies foram e estão sofrendo perdas drásticas na variabilidade genética. Em alguns casos, essas perdas chegam a gerar sérios riscos de extinção. Dessa forma, a coleta de germoplasma torna-se indispensável para o processo de conservação das espécies.

A amostragem de populações de uma espécie permite o estudo e a representação da diversidade interpopulacional, que pode ser mais importante que a diversidade intrapopulacional, principalmente nos casos de espécies autógamas ou que se reproduzem assexuadamente (BROWN; BRIGGS, 1991). Esses autores ainda discutem sobre a importância da amostragem ao longo de gradientes de latitude, altitude, solo, clima, etc., uma vez que aumentam as chances de se localizarem ecótipos com características adaptativas diferentes. Em razão de ser difícil a avaliação de

acessos de grandes coleções de germoplasma quanto à resposta a estresses bióticos, dados climatológicos ou geográficos da área de coleta podem identificar acessos com alta probabilidade de tolerância a tais estresses (SMITH et al., 1994).

As expedições de coleta devem ser restritas à época de amadurecimento dos frutos, o que pode variar entre localidades e entre genótipos, influenciando a representatividade da amostra (BROWN; BRIGGS, 1991). Quando possível, a coleta de sementes é a forma mais indicada de amostrar o germoplasma (BROWN; BRIGGS, 1991).

2.7 Ecogeografia e erosão genética

Junto à coleta propriamente dita do germoplasma, algumas informações poderão subsidiar os estudos ecogeográficos. O estudo ecogeográfico é um processo de obtenção e síntese de informações ecológicas, geográficas e taxonômicas, sendo os seus resultados preditivos e podem ser usados na formulação de estratégias de conservação e prioridades de coleta (MAXTED et al., 1997). Dentre os dados que são tomados no momento da coleta, muitos são considerados como dados de passaporte, sendo alguns de grande importância nesses estudos: data de coleta - para obter épocas de floração e frutificação; posição do local de coleta - latitude, longitude e altitude; hábitat - descrição do hábitat; dados fenológicos - presença de flores ou frutos; tipo de solo; uso da terra; variações fenotípicas; nomes comuns da espécie; usos da espécie; local onde o espécime foi ou será depositado - herbário, banco de germoplasma, jardim botânico, etc.. (MAXTED et al., 1997).

Muitas informações poderão ser inferidas após a coleta, desde que a posição tenha sido bem informada, por meio de mapas apropriados. Informações como geologia, solo, relevo, vegetação, etc. (MAXTED et al., 1997). Martins (2000) observou correlações significativas entre características do solo do local de coleta, como saturação em alumínio e características químicas de *Psychotria ipecacuanha* (teor de emetina). Correlações entre características morfológicas e ambientais podem indicar

adaptação ecotípica. A análise multivariada é uma ferramenta muito utilizada no estudo ecogeográfico, por reunir grande número de variáveis ao mesmo tempo; por outro lado, requer dados robustos. Mapas também são utilizados para mostrar locais de coleta ou área de ocorrência, inclusive com apresentação de dados ecogeográficos (MAXTED et al., 1997).

Os dados dos estudos ecogeográficos podem subsidiar a avaliação dos riscos de erosão genética, conforme proposto por Guarino (1995). Segundo esse autor, há diversas listas dos riscos potenciais para espécies; a quantificação dos riscos envolve a atribuição de notas à presença ou à ausência de determinada fonte de risco, além de sua eventual severidade, reversibilidade e duração.

2.8 Modo de reprodução

O modo de reprodução da espécie e o seu sistema de cruzamento determinam como a variabilidade genética se organiza no espaço e no tempo (ROBINSON, 2006). Conforme Borém e Miranda (2009), essa caracterização é imprescindível para a decisão de estratégias de conservação e melhoramento genético.

Para analisar o modo de reprodução de uma espécie, Cruden (1977) indica a relação pólen/óvulo, uma vez que essa razão se correlaciona com o sistema reprodutivo das plantas. Esse autor admite ainda que esse método é o melhor indicador do sistema de reprodução das plantas, quando comparado à análise da morfologia floral e do tamanho das flores. Almeida (2007) complementa que o método se constitui em uma alternativa rápida e de baixo custo, quando comparado às técnicas de cruzamentos artificiais controlados e de marcadores moleculares, além de ser utilizado em estudos de evolução dos mecanismos reprodutivos das plantas.

2.9 Crescimento

O estudo do crescimento é a descrição das mudanças irreversíveis, com o tempo, que implicam em alterações no tamanho, frequentemente na

forma e, ocasionalmente, no número (HUNT, 1989). A análise do crescimento destina-se à avaliação da produção líquida das plantas, derivada do processo fotossintético, sendo o resultado do desempenho do sistema assimilatório durante certo período de tempo (MAGALHÃES, 1985). Nessa análise, são tomadas medidas, tais como: número de folhas, altura, diâmetro do caule, número de nós, peso da matéria fresca e seca. Essas duas últimas medidas são tomadas no caso da avaliação de crescimento do tipo destrutiva (BENINCASA, 1988).

Esse estudo tem sido largamente utilizado na avaliação de germoplasma e na domesticação de plantas medicinais, visando a selecionar genótipos superiores. Em carqueja (*Baccharis myrioccephala* D.C.), Castro et al. (1999) compararam dois acessos quanto ao crescimento e ao rendimento de tanino em cinco épocas de colheita, sendo que foram observadas diferenças significativas entre os acessos e entre as épocas.

Em outro trabalho, realizado por Januzzi *et al.* (2011), foi identificado um acesso de *Lippia alba* com potencial para a produção de citral, um dos principais metabólitos presente no óleo essencial da espécie e que é responsável pelas suas propriedades medicinais. Assim, o acesso de *L. alba* em questão apresenta potencial para estudos de melhoramento genético.

Além da identificação de genótipos superiores, as avaliações de crescimento fornecem dados que complementam estudos de divergência genética.

CAPÍTULO 2 - LOCALIZAÇÃO, COLETA E ECOGEOGRAFIA DO ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides* Cham.), NO NORTE DE MINAS GERAIS E NO VALE DO JEQUITINHONHA

RESUMO

O alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) é uma importante planta medicinal, nativa do nordeste brasileiro e áreas do Sudeste. Devido ao seu óleo essencial, apresenta grande potencial antifúngico e antibacteriano. É considerada uma das sete espécies prioritárias para a conservação. Dessa forma, o mapeamento e a caracterização dos locais de ocorrência da espécie são essenciais para a formulação de estratégias de conservação. Assim, o objetivo da presente pesquisa foi caracterizar os locais de ocorrência de populações de alecrim-pimenta, quanto ao solo, ao bioma, ao clima, à precipitação anual, à latitude, à longitude e à altitude da região, além do rendimento de óleo de cada acesso coletado. Foram amostradas 18 populações nas regiões do norte de Minas Gerais e no Vale do Jequitinhonha. As expedições foram realizadas em épocas chuvosas, entre fevereiro de 2010 e janeiro de 2011. Em cada expedição foram registradas as coordenadas geográficas, assim como a coleta de solo e de folhas para posterior análise. Na descrição dos locais amostrados, utilizaram-se bancos de dados e mapas apropriados. Os acessos se encontram entre as coordenadas 15°38'31" e 18°24'31" de latitude Sul e 42°15'47" e 44°16'5" de longitude Oeste, com altitude média de 820m, variando entre 564 e 1264m. O teor de óleo essencial apresentou média de 3,40%, variando entre 0,28 e 7,78%. Aproximadamente 78% e 67% das populações ocorreram em solo distrófico e com acidez elevada a média, respectivamente. Todos os acessos apresentaram níveis muito baixos de fósforo. Em relação à matéria orgânica, os níveis variaram entre médio e bom. As regiões amostradas apresentaram solos com textura arenosa a média. Quanto ao bioma, 78% dos acessos ocorrem em regiões de Cerrado, 11% em zonas de transição entre Cerrado e Mata Atlântica e 11% em Mata Atlântica. A vegetação predominante foi do tipo Savana. Aproximadamente 94% dos acessos se encontram em regiões de clima tropical quente e subquente, variando entre semiárido e semiúmido. Em relação à precipitação, as regiões amostradas apresentam valores médios anuais menores que 1000mm (17%), 1000 – 1200mm (50%), 1200 – 1500mm (22%) e maiores que 1500mm (11% das regiões). Com base nos resultados, conclui-se que grande parte dos acessos amostrados de *L. sidoides* ocorre naturalmente em solos mais pobres e ácidos, em vegetação do tipo Savana, com climas quentes, em regiões com diferentes níveis de precipitação (desde um intenso período seco até períodos bastante úmidos) e grande variação de altitude.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Germoplasma. Conservação. *In situ*.

CHAPTER 2 - LOCALIZATION, COLLECT AND ECOGEOGRAPHY OF "ALECRIM-PIMENTA" (*LIPPIA SIDOIDES*) IN THE NORTH OF MINAS GERAIS AND VALE DO JEQUITINHONHA

ABSTRACT

The *alecrim-pimenta* (*Lippia sidoides* Cham.) is an important medicinal plant, native to the Brazilian northeast and southeast areas. Due of its essential oil, it present great antifungal and antibacterial potential. The specie is considered one of the seven priority species for conservation. Thus, the mapping and characterization of sites of occurrence of the specie are essentials to formulate conservation strategies. Therefore, the objective of this work was to characterize the sites of occurrence of the populations of *alecrim-pimenta*, as the soil, biome, vegetation, weather, annual precipitation, latitude, longitude and altitude of the region, beyond the essential oil content of each collected population. Eighteen populations were sample in the north of Minas Gerais and Vale do Jequitinhonha regions. The expeditions were carried out in rainy season, between February 2010 and January 2011. On each expedition were recorded the geographic coordinates, as well as collecting soil and leaves for analysis. On the description of the samples, they were used databases and appropriate maps. The populations are between the coordinates 15°38'31" e 18°24'31" de South latitude and 42°15'47" and 44°16'5" West longitude, with an average altitude of 820m, ranging from 564 and 1264m. The essential oil content averaged was 3.40%, ranging between 0.28 and 7.78%. Approximately 78% and 67% of the populations occurred in dystrophic soil with high to medium acidity, respectively. All populations presented very low levels of phosphorus. In relation to organic matter, the levels ranged between medium and good. The sampled regions presented sandy and medium soils. As for the biome, 78% of the populations occur in the Cerrado regions, 11% in areas of transition between Cerrado and Atlantic Forest and 11% in Atlantic Forest. The predominant vegetation type is savanna. Approximately 94% of the populations are in the tropical warm and under warm tropical, ranging from semi-arid and semi-humid. In relation to the precipitation, the sampled regions have annual average values less than 1000mm (17%), 1000 – 1200mm (50%), 1200 – 1500mm (22%) and higher than 1500mm (11% of the regions). Based on the results, it can conclude that the most of the sampled populations of *L. sidoides* occur naturally in poor and acid soils, in savanna vegetation type, with warm weathers, in areas with different precipitation levels (from an intense dry season until very humid periods) and great variation in altitude.

Key words: Medicinal plants. Germplasm. Conservation. *In situ*.

1 INTRODUÇÃO

O alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) é uma planta medicinal da família Verbenaceae, própria da vegetação do semiárido, com origem no nordeste do Brasil. A espécie apresenta porte arbustivo, ereto, com muitas ramificações, podendo atingir até três metros de altura. Possui folhas muito aromáticas e picantes que apresentam óleo essencial rico em timol e carvacrol (LORENZI; MATOS, 2008), monoterpenos responsáveis pela atividade antimicrobiana apresentada pela espécie (LEMOZ et al., 1990). Destaca-se pela sua utilização na preparação de medicamentos antissépticos de uso tópico, possuindo relevantes aplicações em farmácia, em medicina, em odontologia e em saúde pública (MATOS; OLIVEIRA, 1998).

O norte de Minas Gerais constitui a maior parte da área mineira da Superintendência de Desenvolvimento do Nordeste (SUDENE), estando incluído no Polígono das Secas. Nessa área, predomina o Cerrado propriamente dito, em suas variações e faixas de transição para a Caatinga. Segundo Correia (1999), a área de domínio dos cerrados é amplamente diversificada em termos de solo e de clima, o que favorece a riqueza em diversidade genética. Nessa região, ocorrem diversas espécies de *Lippia*, dentre elas a *L. sidoides*. Tem sido observada grande variabilidade no aroma de tal espécie, o que precisa ser investigado. Devido à sua grande importância, a espécie foi incluída em programas de fitoterapia e listada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), além de ser considerada como uma das sete espécies prioritárias da Caatinga para conservação e manejo (VIEIRA; SILVA, 2002).

Definido como um processo de obtenção e síntese de informações ecológicas e geográficas, o estudo ecogeográfico apresenta grande importância, uma vez que os seus resultados subsidiam a formulação de estratégias de conservação (MAXTED et al., 1997, citados por MARTINS et al., 2009). Além de colaborar significativamente com a criação dessas estratégias, ainda contribuem para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético. Em recente estudo, realizado por Danner et al. (2010), que trabalharam com jabuticaba (*Plinia* sp.), planta de interesse

farmacêutico e alimentício, observou-se que a espécie tolera solos fortemente ácidos e com alta saturação de alumínio. Além disso, o mapeamento dos locais de ocorrência das plantas favorece a conservação da espécie, uma vez que as sementes são recalcitrantes, impossibilitando a conservação da variabilidade via banco de sementes. Esse tipo de estudo também é importante para formular modelos para definir a ocorrência da espécie, ou seja, predizer locais com maior probabilidade de ocorrência e realizar futuras coletas, principalmente com base em dados de vegetação, clima e altitude. Outros dois importantes estudos foram realizados por Souza e Martins (2004), trabalhando com *Dimorphandra mollis* e Oliveira e Martins (2002), trabalhando com *Psychotria ipecacuanha*. Essas espécies medicinais apresentam grande interesse econômico, sendo bastante exploradas. Com os estudos em questão, foi possível analisar o nível de erosão genética das espécies, informações importantes para a definição de estratégias de conservação.

Dessa forma, o objetivo da presente pesquisa foi caracterizar os locais de ocorrência de populações de *L. sidoides*, quanto ao solo, à vegetação, ao clima, à precipitação anual, à latitude, à longitude e à altitude de ocorrência.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Antes do procedimento de coleta propriamente dito, em algumas expedições, foram pesquisadas áreas de possível ocorrência da espécie. As demais viagens foram realizadas aleatoriamente pelas regiões do norte de Minas Gerais e Vale do Jequitinhonha. Realizaram-se as coletas em épocas chuvosas entre os meses de fevereiro de 2010 e janeiro de 2011. Isso, devido ao comportamento caducifólio da espécie em período de seca, fato que dificulta a identificação da espécie.

Uma vez localizadas as populações de alecrim-pimenta, marcavam-se os pontos geográficos (latitude, longitude e altitude), utilizando-se o Receptor GPS, tipo Garmin®, modelo 60CSX. Em seguida, selecionavam-se, aleatoriamente, indivíduos na população e realizava-se a amostragem de estacas, para propagação vegetativa e posterior montagem de banco de

germoplasma, de folhas, para extração de óleo essencial e quantificação do potencial de produção de cada acesso, e de solo, próxima aos acessos, com coletas nas camadas de 0 – 20cm, seguindo a metodologia definida por Ribeiro et al. (1999). As amostras de folhas e de solo foram acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas para extração de óleos essenciais, no caso das folhas, e análises, no caso do solo, nos Laboratórios de Plantas Medicinais e de Análises de Solos, respectivamente, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG).

O óleo essencial foi extraído pelo método de hidrodestilação, usando-se o aparelho de Clevenger, sendo utilizadas as amostras congeladas, em balões de vidro de um litro, com aproximadamente 2/3 do volume preenchido com água. O processo de extração teve a duração de 2h40min (EHLERT *et al.*, 2006). Em seguida, o óleo essencial foi separado da água, com o auxílio de micropipetas. Após esse processo, o material vegetal resultante foi mantido em estufa de circulação forçada de ar a 65°C, até atingir peso constante. O teor de óleo essencial foi expresso com base na matéria seca da amostra utilizada na extração.

Após a extração de óleo essencial, mensurou-se o teor de óleo com base na matéria seca da amostra de folhas. Em cada coleta, produziram-se exsiccatas, que foram encaminhadas ao herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), para identificação.

A partir dos dados de posição (latitude e longitude) do local de amostragem das populações, foram utilizados mapas de vegetação (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2004), clima (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2002) e precipitação (ATLAS DE ZONEAMENTO AGROCLIMÁTICO DE MINAS GERAIS, 2002). Os pontos geográficos foram plotados nos mapas para a posterior determinação das condições ambientais onde se localizam os acessos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo foi conduzido com 18 acessos amostrados nas regiões norte de Minas Gerais e Vale do Jequitinhonha. Os valores de latitude, longitude, altitude e precipitação anual nas 18 populações se encontram na TAB. 1. Os acessos se encontram entre as coordenadas 15°38'31" e 18°24'31" de latitude Sul e 42°15'47" e 44°16'5" de longitude Oeste. Os acessos foram localizados entre 564 e 1264m de altitude, resultado que complementa o estudo de Oliveira (2008), que trabalhou com acessos de *L. sidoides* na região nordeste do Brasil e localizou as populações entre 40 e 544m de altitude. Desta forma, amplia-se a faixa de altitude onde a espécie ocorre.

Tabela 1 - Caracterização geográfica e de precipitação dos locais de ocorrência de 18 acessos de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) coletados no norte de Minas Gerais e no Vale do Jequitinhonha.

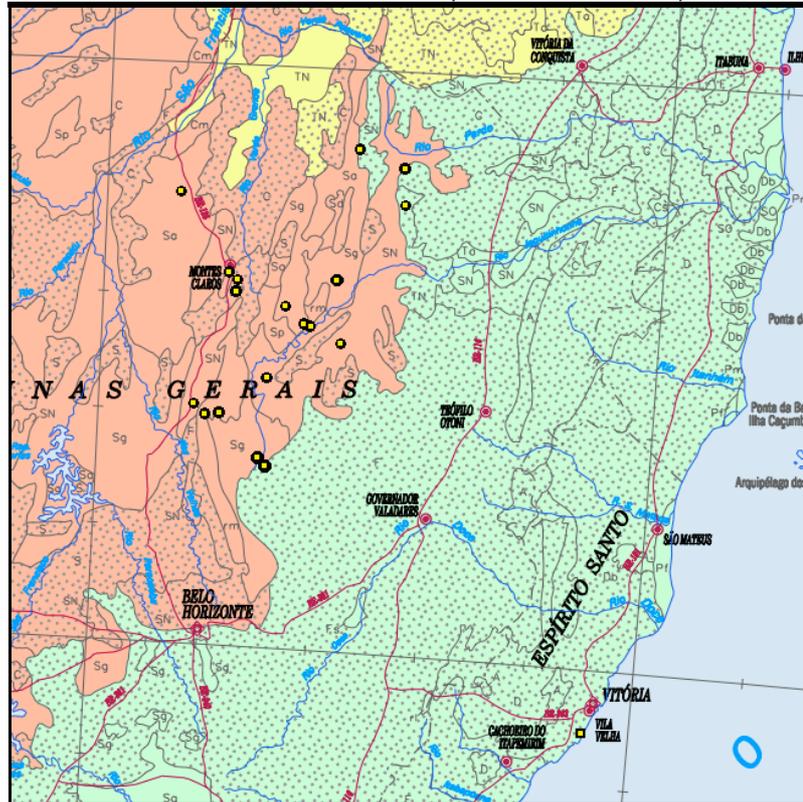
Municípios	Acessos	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Precipitação anual (mm)
Salinas	ICA-01	16° 7'6"S	42°15'59"O	564	< 1000
Tumalina	ICA-02	17°18'20"S	42°50'51"O	573	1000 - 1200
Tumalina	ICA-03	17° 9'9"S	43° 8'19"O	940	1000 - 1200
Serro	ICA-04	18°18'14"S	43°33'21"O	993	> 1500
Serro	ICA-05	18°24'31"S	43°30'23"O	1009	> 1500
Cristália	ICA-06	16°44'27"S	42°53'43"O	810	1000 - 1200
Montes Claros	ICA-07	16°41'2"S	43°50'36"O	642	1000 - 1200
Juramento	ICA-08	16°45'23"S	43°46'3"O	721	1000 - 1200
Glaucilândia	ICA-09	16°51'20"S	43°47'32"O	939	1000 - 1200
Buenópolis	ICA-10	17°53'32"S	43°57'18"O	626	1200 - 1500
Buenópolis	ICA-11	17°49'15"S	44° 9'35"O	672	1200 - 1500
Buenópolis	ICA-12	17°54'4"S	44° 3'35"O	623	1200 - 1500
Diamantina	ICA-13	17°36'9"S	43°30'60"O	862	1200 - 1500
Tumalina	ICA-14	17° 9'8"S	43° 7'4"O	924	1000 - 1200
Japonvar	ICA-15	15°59'7"S	44°16'5"O	883	< 1000
Taiobeiras	ICA-16	15°48'10"S	42°15'47"O	926	1000 - 1200
Rio Pardo de Minas	ICA-17	15°38'31"S	42°39'25"O	792	< 1000
Itacambira	ICA-18	16°59'7"S	43°20'39"O	1264	1000 - 1200

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

A precipitação anual dos locais de amostragem foi bastante variável (TAB. 1 e FIG. 1), desde regiões mais secas (menos de 1000 mm por ano) a bastante úmidas (mais de 1500mm por ano). Porém mais de 70% desses locais apresentam precipitação anual entre 1000 e 1500 mm, divergindo das

do Norte e o Ceará, regiões com predominância de Caatinga. Esse resultado indica que a espécie ocorre naturalmente também em outros biomas, principalmente o Cerrado. A vegetação típica do Cerrado foi predominante, abrangendo a maior parte dos locais. As demais regiões foram caracterizadas por refúgios vegetacionais e Floresta Estacional Semidecidual (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2004).

Figura 2 - Distribuição de 18 acessos de *Lippia sidoides* Cham., localizados no norte de Minas Gerais e no Vale do Jequitinhonha, em mapa de Biomas.



Fonte: IBGE, 2004. Adaptado.

Tabela 2 - Classificação vegetacional dos locais de ocorrência dos 18 acessos de *Lippia sidoides* Cham amostrados.

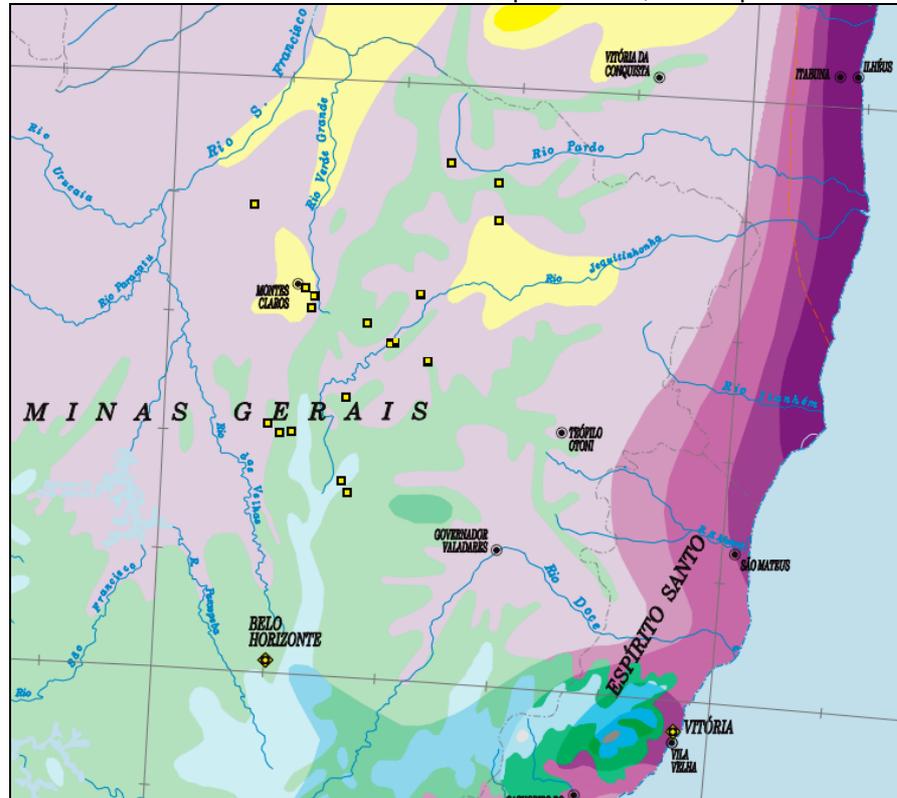
Acessos	Vegetação	Bioma
ICA-01	Contato Savana Estépica/Floresta Estacional	Mata Atlântica
ICA-02	Contato Savana/Floresta Estacional	Cerrado
ICA-03	Savana gramíneo-lenhosa	Cerrado
ICA-04	Savana gramíneo-lenhosa	Cerrado
ICA-05	Floresta Estacional Semidecidual	Mata Atlântica
ICA-06	Savana gramíneo-lenhosa	Cerrado
ICA-07	Contato Savana/Floresta Estacional	Cerrado
ICA-08	Savana	Cerrado
ICA-09	Savana	Cerrado
ICA-10	Refúgio Vegetacional Montano	Cerrado
ICA-11	Contato Savana/Floresta Estacional	Cerrado
ICA-12	Refúgio Vegetacional Montano	Cerrado
ICA-13	Contato Savana/Floresta Estacional	Cerrado
ICA-14	Contato Savana/Floresta Estacional	Cerrado
ICA-15	Savana	Cerrado
ICA-16	Contato Savana/Floresta Estacional	Cerrado - Mata Atlântica
ICA-17	Contato Savana/Floresta Estacional	Cerrado - Mata Atlântica
ICA-18	Savana gramíneo-lenhosa	Cerrado

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Quanto ao clima (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2002), 17% dos acessos são característicos do tropical quente semiárido, com seis meses secos e 33% apresentam clima tropical quente semiúmido, com 4 – 5 meses secos. O clima tropical quente é caracterizado por temperaturas médias acima de 18 °C. Já o clima tropical subquente, com seis meses secos e temperatura média entre 15 - 18 °C, é representado por 44% dos acessos. Os outros 6% correspondem ao clima tropical mesotérmico brando semiúmido, com 4 – 5 meses secos e temperatura média entre 10 – 15°C (TAB. 3 e FIG. 3). Em alguns trabalhos com *L. sidoides*, realizados nos estados do CE (BOTELHO et al., 2007a; CAVALCANTI et al., 2004; COSTA et al., 2005; FONTENELLE et al., 2007) e RN (COSTA et al., 2001; MACAMBIRA et al., 1986), as plantas foram

coletadas de locais caracterizados por clima tropical quente semiárido, com 7 – 8 meses secos, regiões mais quentes e com períodos mais secos, comparadas com as da presente pesquisa.

Figura 3 - Distribuição de 18 acessos de *Lippia sidoides* Cham., localizados no norte de Minas Gerais e no Vale do Jequitinhonha, em mapa de Clima.



Fonte: IBGE, 2002. Adaptado.

Tabela 3 - Classificação climática dos locais de ocorrência dos 18 acessos de *Lippia sidoides* Cham amostrados.

Acessos		Clima		Tempertatura média mensal
ICA-01	Tropical quente	Semiárido	6 meses secos	maior que 18°C
ICA-02	Tropical subquente	Semiárido	6 meses secos	15 - 18°C em pelo menos um mês
ICA-03	Tropical quente	Semiúmido	4 - 5 meses secos	maior que 18°C
ICA-04	Tropical mesotérmico brando	Semiúmido	4 - 5 meses secos	10 - 15°C
ICA-05	Tropical subquente	Semiárido	6 meses secos	15 - 18°C em pelo menos um mês
ICA-06	Tropical quente	Semiúmido	4 - 5 meses secos	maior que 18°C
ICA-07	Tropical quente	Semiárido	6 meses secos	maior que 18°C
ICA-08	Tropical quente	Semiárido	6 meses secos	maior que 18°C
ICA-09	Tropical quente	Semiúmido	4 - 5 meses secos	maior que 18°C
ICA-10	Tropical subquente	Semiárido	6 meses secos	15 - 18°C em pelo menos um mês
ICA-11	Tropical quente	Semiúmido	4 - 5 meses secos	maior que 18°C
ICA-12	Tropical subquente	Semiárido	6 meses secos	15 - 18°C em pelo menos um mês
ICA-13	Tropical subquente	Semiárido	6 meses secos	15 - 18°C em pelo menos um mês
ICA-14	Tropical subquente	Semiárido	6 meses secos	15 - 18°C em pelo menos um mês
ICA-15	Tropical quente	Semiúmido	4 - 5 meses secos	maior que 18°C
ICA-16	Tropical subquente	Semiárido	6 meses secos	15 - 18°C em pelo menos um mês
ICA-17	Tropical quente	Semiúmido	4 - 5 meses secos	maior que 18°C
ICA-18	Tropical subquente	Semiárido	6 meses secos	15 - 18°C em pelo menos um mês

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

O teor de óleo essencial apresentou média de 3,40%, variando entre 0,28 e 7,78% (TAB. 4). Oliveira (2008), trabalhando com *L. sidoides*, verificou rendimentos médios, mínimo e máximo de 5,59%, 4,19% e 7,68%, respectivamente. Porém vale ressaltar que esses resultados se referem à produção em condições de cultivo, diferente daquelas da presente pesquisa que foram em condições naturais dos acessos. Dessa forma, os resultados são importantes para a caracterização inicial do potencial de produção de cada população.

Tabela 4 - Teor de óleo essencial de 18 acessos de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) coletados no norte de Minas Gerais e no Vale do Jequitinhonha.

Municípios	Acessos	Teor (%)
Salinas	ICA-01	1,92
Turmalina	ICA-02	4,49
Turmalina	ICA-03	3,36
Serro	ICA-04	4,86
Serro	ICA-05	5,54
Cristália	ICA-06	7,78
Montes Claros	ICA-07	5,36
Juramento	ICA-08	2,64
Glaucilândia	ICA-09	4,13
Buenópolis	ICA-10	1,36
Buenópolis	ICA-11	3,33
Buenópolis	ICA-12	2,57
Diamantina	ICA-13	1,36
Turmalina	ICA-14	1,98
Japonvar	ICA-15	0,28
Taiobeiras	ICA-16	2,03
Rio Pardo de Minas	ICA-17	4,73
Itacambira*	ICA-18	-

*O acesso apresentou quantidade insuficiente de folhas para quantificação do teor de óleo essencial.

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Em relação à caracterização do solo, 78% dos acessos ocorreram em solo distrófico (saturação por bases inferior a 50%), característica de solos mais pobres. Aproximadamente 67% das amostras apresentaram acidez elevada a média, com variação de pH entre 5,0 e 6,1. Todos os locais de ocorrência dos acessos apresentaram níveis muito baixos de fósforo, corroborando Caldeira Júnior et al. (2007), que, ao trabalharem com *Caryocar brasiliensis*, espécie que ocorre nessas condições de solo, verificaram níveis muito baixos de fósforo para a região norte de Minas Gerais. Em relação à matéria orgânica, os níveis variaram entre médio e bom. A textura do solo variou entre média e arenosa, caracterizando 56% e 44% dos acessos, respectivamente. As médias e os respectivos desvios-padrão de todos os atributos caracterizados na análise de solo encontram-se na TAB. 5.

Tabela 5 - Características químicas e físicas do solo em 18 acessos de *Lippia sidoides* Cham. coletados no norte de Minas Gerais e Vale do Jequitinhonha.

Atributos do solo	Média ± Desvio Padrão
pH em água	5,4±0,32
P Mehlich (mg.kg ⁻¹)	1,67±1,3
P remanescente (mg.L ⁻¹)	24,43±7,81
K ⁺ (mg.kg ⁻¹)	71,17±66,89
Ca ⁺ (cmolc.dm ⁻³)	1,54±1,37
Mg ⁺ (cmolc.dm ⁻³)	0,63±0,53
Al ³⁺ (cmolc.dm ⁻³)	0,6±0,48
H + Al ³⁺ (cmolc.dm ⁻³)	3,29±1,77
Soma de Bases (cmolc.dm ⁻³)	2,36±2,01
CTC (cmolc.dm ⁻³)	2,95±1,83
Saturação por alumínio (%)	29,39±24,57
CTC a pH 7,0 (cmolc.dm ⁻³)	5,64±2,25
Saturação por bases (%)	39,06±24,3
Matéria Orgânica (dag.kg ⁻¹)	3,82±1,13
Areia grossa (dag.kg ⁻¹)	19,79±14,6
Areia fina (dag.kg ⁻¹)	46,66±12,1
Silte (dag.kg ⁻¹)	16,44±8,42
Argila (dag.kg ⁻¹)	17,11±8,57

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

4 CONCLUSÃO

A maioria dos acessos amostrados de *Lippia sidoides*. ocorre naturalmente em solos mais pobres e ácidos, em vegetação do tipo Savana, com climas quentes, em regiões com diferentes níveis de precipitação (desde um intenso período seco até períodos bastante úmidos) e grande variação de altitude (desde 564 até 1264m).

CAPÍTULO 3 - CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE FITOMASSA E DE ÓLEO ESSENCIAL DE ACESSOS DE ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides* Cham.) CULTIVADOS NO NORTE DE MINAS GERAIS

RESUMO

O alecrim-pimenta é uma importante planta medicinal, nativa do nordeste brasileiro e semiárido mineiro, que, devido ao seu óleo essencial, apresenta grande potencial antifúngico e antibacteriano. Observa-se grande variabilidade da composição química do óleo em seu estado nativo, entretanto desconhece-se seu real potencial químico ou agrônomico. Assim, torna-se importante o estudo de crescimento e produção da espécie, que permite, além da avaliação de germoplasma, a domesticação da espécie. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o comportamento agrônomico, a produção e o teor de óleo essencial de 14 acessos de *Lippia sidoides*, cultivados no norte de Minas Gerais. O experimento foi desenvolvido no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados com 14 acessos de *Lippia sidoides* e três repetições. Quinzenalmente, a altura da planta, o número de folhas e o diâmetro do caule foram avaliados. Após sete meses, a colheita foi realizada para se avaliar a produção de fitomassa fresca e seca, a produção e o teor de óleo essencial e o teor de timol. Os acessos de *Lippia sidoides* apresentaram diferenças significativas para as características: altura de planta, número de folhas, diâmetro do caule, fitomassa fresca e seca e produção de óleo essencial. Os acessos ICA-12, ICA-11, ICA-01, ICA-07, ICA-06 e ICA-04 se mostraram como os mais promissores para produção de fitomassa e óleo essencial enquanto que o acesso ICA-10 foi o menos promissor. Os resultados de teor de timol evidenciam o significativo potencial do acesso ICA-05, o qual poderá ser utilizado em programas para melhorar a qualidade do óleo essencial produzido pela espécie.

Palavras-chave: Diversidade genética. Caracterização agrônômica. Timol. Plantas medicinais.

CHAPTER 3 - GROWTH AND PHYTOMASS AND ESSENTIAL OIL PRODUCTION OF ALECRIM-PIMENTA ACCESSIONS (*Lippia sidoides* Cham.), CULTIVATED IN THE NORTH OF MINAS GERAIS

ABSTRACT

The *alecrim-pimenta* is an important medicinal plant, native of Northeast of Brazil and semiarid of Minas Gerais and because of its essential oil, it presents great antifungal and antibacterial potential. It was observed high variability of chemical composition of the oil, in their natural state, however, it is unknown its real chemical or agronomic potential. Thus, it is important the study of specie growth and yield, since it is widely used on the germplasm evaluation and medicinal plants domestication in order to select superior genotypes. Therefore, the aim of this study was to evaluate the agronomic behavior, the yield and essential oil content of 14 *Lippia sidoides* accessions, cultivated in the North of Minas Gerais. The experiment was carried out in the Instituto of Ciências Agrárias of Universidade Federal of Minas Gerais (ICA/UFMG), Montes Claros, Minas Gerais State, Brazil. It was installed in a randomized block design, with 14 *Lippia sidoides* accessions with three replications. Each 15 days, the plant height, amount of leaves and stalk diameter were analyzed. After seven months, the harvest was carried out to analyze the fresh and dry phytomass, yield and essential oil content and thymol content. The *Lippia sidoides* accessions presented significant differences to the variables: plant height, amount of leaves, stalk diameter, fresh and dry phytomass and essential oil production. The accessions ICA-12, ICA-11, ICA-01, ICA-07, ICA-06 and ICA-04 show itself as the most promising to the yield of phytomass and essential oil, while ICA-10 was the less promising accession. The results of thymol content evidenced the significant potential of accession ICA-05, which may be used in programs to improve the quality of the essential oil produced by the specie.

Key words: Genetic diversity. Agronomic characterization. Thymol. Medicinal plants.

1 INTRODUÇÃO

O alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) é uma planta medicinal da família Verbenaceae, nativa do nordeste brasileiro e semiárido mineiro. Apresenta comportamento caducifólio, porte ereto, com até três metros de altura e possui folhas aromáticas e picantes, as quais contêm óleo essencial rico em timol e carvacrol (LORENZI; MATOS, 2008). Esses dois metabólitos apresentam atividade antibacteriana e antifúngica (BRUNETON, 1999), conferindo à planta grande importância econômica. Medeiros *et al.* (2011), em recente estudo, verificaram o óleo essencial da espécie como um agente promissor no controle da Leishmaniose cutânea. Outro importante trabalho foi realizado por Moreira *et al.* (2011), que avaliaram a atividade antifúngica de proteínas presentes nas flores de *L. sidoides* e obtiveram resultados promissores para futuras pesquisas, indicando potencial para a produção de plantas resistentes contra fungos, reduzindo o uso de fungicidas químicos e melhorando a qualidade e a segurança de produtos vegetais.

Devido à relevância apresentada pelo alecrim-pimenta e à necessidade de conservação da espécie, é importante que haja estratégias, tanto para a domesticação quanto para a conservação da mesma. Dessa forma, o estudo de crescimento é fundamental para esses dois processos. Outro ponto a se destacar é que esse tipo de estudo ainda não foi realizado no norte de Minas e Vale do Jequitinhonha, tornando ainda mais importante o estudo de crescimento e produção da espécie, uma vez que esse é bastante utilizado na avaliação de germoplasma e na domesticação de plantas medicinais. Oliveira (2008) trabalhou com *L. sidoides* no Estado do Sergipe e observou importantes resultados, como genótipos mais promissores para a produção de fitomassa e de óleo essencial. Em outro trabalho, Jannuzzi *et al.* (2011) avaliaram características agronômicas e químicas de acessos de *Lippia alba*, cultivados no Distrito Federal. Os resultados encontrados evidenciaram um potencial para incrementar a qualidade da matéria prima da espécie, além de servir como subsídio para programas de melhoramento genético.

O estudo de crescimento, associado às práticas agronômicas pode potencializar o crescimento e o teor de óleo essencial da espécie, fato

significativamente importante para a criação de cultivos comerciais, visando à produção em larga escala, além da criação de produtos baseados na matéria prima do alecrim-pimenta.

Assim, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o crescimento, o teor, o rendimento de óleo essencial e o teor de timol de acessos de *Lippia sidoides*, cultivados no norte de Minas Gerais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em campo, na Fazenda Experimental Hamilton de Abreu Navarro do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), em Montes Claros, norte de Minas Gerais (16°41'00"S e 43°50'00"W), no período de fevereiro de 2010 a outubro de 2011. O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen, é Aw, com estação seca bem definida e chuvas concentradas nos meses de novembro a janeiro.

Inicialmente, realizou-se a amostragem de 18 acessos de *Lippia sidoides*, nas regiões norte de Minas Gerais e Vale do Jequitinhonha. Foram coletadas estacas para propagação e formação das plantas matrizes. O material vegetativo foi levado à casa de vegetação do ICA/UFMG, onde foi plantado em bandejas de poliestireno expandido, preenchidas com substrato comercial Bioplant®. As estacas foram mantidas em leito de enraizamento, com nebulização intermitente, por 35 dias. Após esse período, as mudas foram transplantadas em vasos plásticos, com capacidade para 15 litros, devidamente preenchidos com substrato na proporção de 2:1 (solo: esterco bovino curtido). As plantas matrizes foram mantidas em casa de vegetação até janeiro de 2011. Após esse período, foram selecionadas estacas para propagação e posterior plantio em campo.

O processo de produção das mudas foi semelhante ao das plantas matrizes, com exceção do transplantio para vasos plásticos. Após 35 dias no leito de enraizamento, 14 acessos (TAB. 1) foram transplantados no campo. Os acessos provenientes dos municípios Japonvar, Taiobeiras, Rio Pardo de

Minas e Itacambira não apresentaram sucesso no processo de propagação, impossibilitando o transplântio dos mesmos no campo.

Tabela 1 - Acessos de *Lippia sidoides* Cham. utilizados na avaliação do crescimento e óleo essencial no norte de Minas Gerais. x

Identidade dos acessos	Município de origem
ICA-01	Salinas - MG
ICA-02	Turmalina- MG
ICA-03	Turmalina- MG
ICA-04	Serro- MG
ICA-05	Serro- MG
ICA-06	Cristália- MG
ICA-07	Montes Claros- MG
ICA-08	Juramento- MG
ICA-09	Glaucilândia- MG
ICA-10	Buenópolis- MG
ICA-11	Buenópolis- MG
ICA-12	Buenópolis- MG
ICA-13	Diamantina- MG
ICA-14	Turmalina- MG

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

O experimento em campo foi implantado no mês de março de 2011, utilizando-se o delineamento em blocos casualizados, com três repetições, sendo uma planta por parcela. Utilizou-se o espaçamento 1,0 x 0,5m, sendo um metro entre linhas e 0,5 m entre plantas (MELO *et al.*, 2011a). O transplântio foi realizado para covas de 30x30x30 cm, devidamente adubadas com 12 kg m⁻² de esterco bovino curtido.

Durante todo o período de cultivo do alecrim-pimenta, foram realizadas irrigações diárias, com duração de 1 – 2 horas, por gotejamento e controle de plantas espontâneas, por meio de capinas manuais.

Após o transplântio, quinzenalmente, realizaram-se avaliações dos caracteres de crescimento com base nas seguintes características: altura da planta (cm), número de folhas e diâmetro (cm) do caule a 10 cm do solo.

A colheita foi realizada sete meses após o transplântio das mudas, por volta de 10 horas da manhã (MELO *et al.*, 2011b). Coletou-se toda a planta, com o auxílio de tesouras de poda. Em seguida, as amostras foram

encaminhadas ao Laboratório de Plantas Medicinais do ICA/UFMG, para avaliação da produção de fitomassa fresca e seca e da produção e teor de óleo essencial. Amostras de 100g de folhas frescas foram armazenadas em freezer, para posterior extração de óleo essencial. Na determinação da fitomassa seca, as amostras foram mantidas em estufa de circulação forçada de ar a 65°C, até peso constante.

O óleo essencial foi extraído pelo método de hidrodestilação, usando-se o aparelho de Clevenger, sendo utilizadas as amostras congeladas, em balões de vidro de um litro, com aproximadamente 2/3 do volume preenchido com água. O processo de extração teve a duração de 2h40min (EHLERT *et al.*, 2006). Em seguida, o óleo essencial foi separado da água, com o auxílio de micropipetas. Após esse processo, o material vegetal resultante foi mantido em estufa de circulação forçada de ar a 65°C, até atingir peso constante. O teor de óleo essencial foi expresso com base na matéria seca da amostra utilizada na extração.

A quantificação do teor de timol no óleo essencial foi realizada por meio de cromatografia, sendo essa análise realizada em cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (GC 7820A), equipado com detector de ionização em chama (CG/DIC) e coluna capilar HP-5 (Agilent Technologies), com fase estacionária 5% fenil e 95% metilpolisiloxano (30m de comprimento x 0,32mm de diâmetro interno x 0,25µm de espessura do filme). Nitrogênio (99,996% de pureza) foi utilizado como gás de arraste à taxa de 1,2mL . min⁻¹ e *make up* de 5 mL . min⁻¹. O injetor *split/splitless* foi mantido a 250°C. A coluna cromatográfica inicialmente a 40°C foi aquecida a uma taxa de 10°C . min⁻¹ até 200°C, permanecendo nessa temperatura por três minutos. Após a separação dos compostos, a temperatura foi elevada até 210°C, permanecendo por um minuto. A temperatura do detector foi de 280°C com fluxo de gás hidrogênio (99,995% de pureza) de 35mL . min⁻¹ e ar sintético (99,999% de pureza) de 400 mL . min⁻¹. Utilizando-se um auto-injetor (7693A), 1µL da amostra, foi injetada no cromatógrafo, a uma razão de split 1:5. Soluções padrão de timol (99,5% de pureza) obtido na Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) foram preparadas em diclorometano (Vetec, Brasil) nas concentrações de 25, 50, 100, 250 e 500mg . L⁻¹ e estocadas a 4°C até o

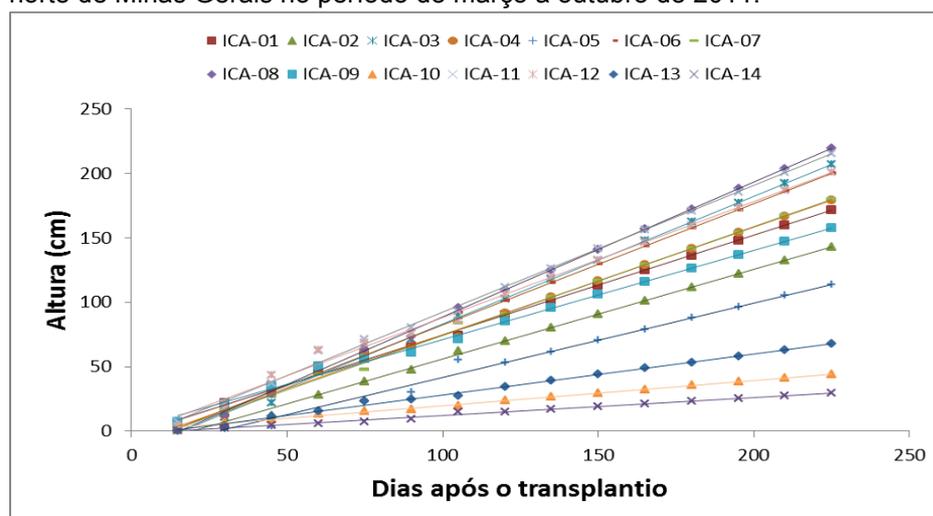
momento das análises por CG/DIC. A partir dessas concentrações, criou-se a curva analítica para posterior quantificação do timol nas amostras de óleo essencial. Essas amostras foram pesadas, utilizando-se balança analítica, tipo Shimadzu (Kyoto, Japão) e diluídas em diclorometano para análises cromatográficas. As amostras diluídas foram transferidas para vials de 2mL e as injeções no CG/DIC foram realizadas em triplicatas para cada amostra.

Os resultados das avaliações de crescimento foram submetidos à análise de regressão em função do tempo. Os dados das análises de produção foram submetidos à análise de variância e, em seguida, as médias foram comparadas pelo teste Scott & Knott, com a utilização do programa Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG) (RIBEIRO JÚNIOR, 2001). Antes da realização da análise de variância, fez-se uma análise exploratória, utilizando-se o teste de Cochran e Bartlett, para identificação da homogeneidade entre as variâncias dos resultados. Como os resultados mostraram heterogeneidade, os dados foram transformados para $\text{Log}(x)$ (BANZATTO; KRONKA, 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas características avaliadas, percebe-se grande variabilidade entre os acessos amostrados. Em relação à altura, foram observadas desde plantas com tamanho inferior a 0,50 m até superiores a 2 m (GRAF. 1.). Os acessos que mais se destacaram foram: ICA-04, ICA-08, ICA-11, ICA-03, ICA-12, ICA-06, ICA-07, ICA-01, ICA-09 e ICA-02 sendo os mais altos entre os avaliados. Os mais baixos foram representados por ICA-05, ICA-13, ICA-10 e ICA-14 (TAB. 5). Oliveira (2008), trabalhando também com *Lippia sidoides*, e Arrigoni-Blank *et al.* (2005), trabalhando com *Hyptis pectinata*, observaram variações significativas entre as alturas dos acessos avaliados.

Gráfico 1 - Altura de 14 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados no norte de Minas Gerais no período de março a outubro de 2011.



Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Tabela 2 - Equações lineares referentes à característica altura de 14 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados por 225 dias em Montes Claros – MG.

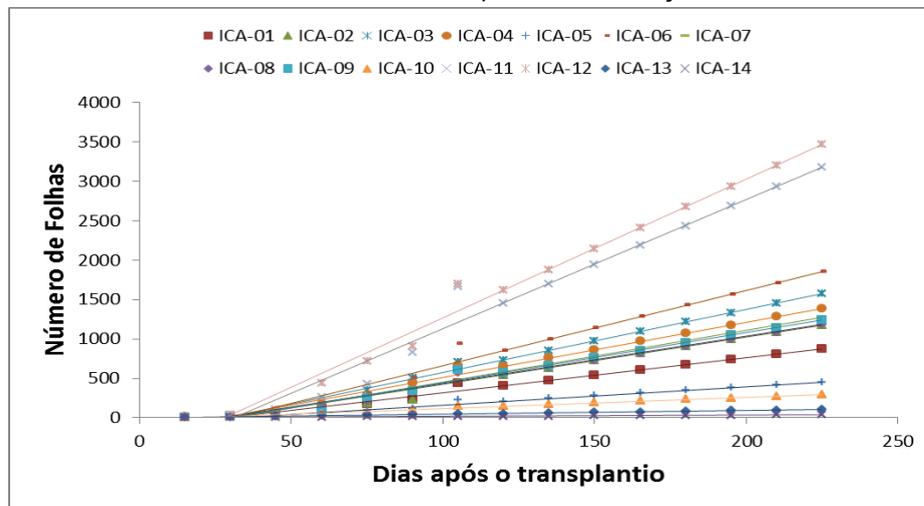
Acessos	Equações	r^2
ICA-01	$y = 0,7758x - 3,2576$	$r^2 = 0,9975$
ICA-02	$y = 0,6939x - 13,453$	$r^2 = 0,9975$
ICA-03	$y = 0,9911x - 15,99$	$r^2 = 0,9984$
ICA-04	$y = 0,8332x - 8,4397$	$r^2 = 0,9956$
ICA-05	$y = 0,577x - 16,058$	$r^2 = 0,9878$
ICA-06	$y = 0,9405x - 11,559$	$r^2 = 0,9989$
ICA-07	$y = 0,8437x - 10,131$	$r^2 = 0,9979$
ICA-08	$y = 1,0494x - 16,483$	$r^2 = 0,9992$
ICA-09	$y = 0,6955x + 1,4461$	$r^2 = 0,9966$
ICA-10	$y = 0,197x + 0,0466$	$r^2 = 0,9969$
ICA-11	$y = 0,9862x - 6,4863$	$r^2 = 0,9973$
ICA-12	$y = 0,9018x - 2,4222$	$r^2 = 0,9948$
ICA-13	$y = 0,3204x - 4,1552$	$r^2 = 0,9966$
ICA-14	$y = 0,1385x - 1,953$	$r^2 = 0,9929$

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Considerando a característica número de folhas, percebe-se pela TAB. 5 que os acessos ICA-12 e ICA-11 se destacaram, com crescimento significativamente superior aos demais. As menores médias foram apresentadas pelos acessos: ICA-05, ICA-10, ICA-13 e ICA-14. Essa

característica é importante, principalmente porque é o órgão responsável pela produção de óleo essencial. Essa afirmação pode ser confirmada pela TAB. 7, uma vez que o número de folhas apresenta significativa correlação positiva (0,6221) com a produção de óleo essencial. O diâmetro do caule também foi marcado por grande variação, sendo as plantas com maior desenvolvimento cambial representadas por: ICA-11, ICA-07, ICA-12, ICA-04, ICA-01, ICA-06, ICA-08 e ICA-09 (TAB. 5). Esses resultados foram semelhantes aos observados por Blank *et al.* (2004), ao trabalharem com diversos acessos de *Ocimum* sp. Em relação às três características de crescimento, os acessos ICA-10, ICA-13 e ICA-14 se encontraram entre as menores médias, o que indica baixo desenvolvimento vegetativo desses.

Gráfico 2 - Número de folhas de 14 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados no norte de Minas Gerais no período de março a outubro de 2011.



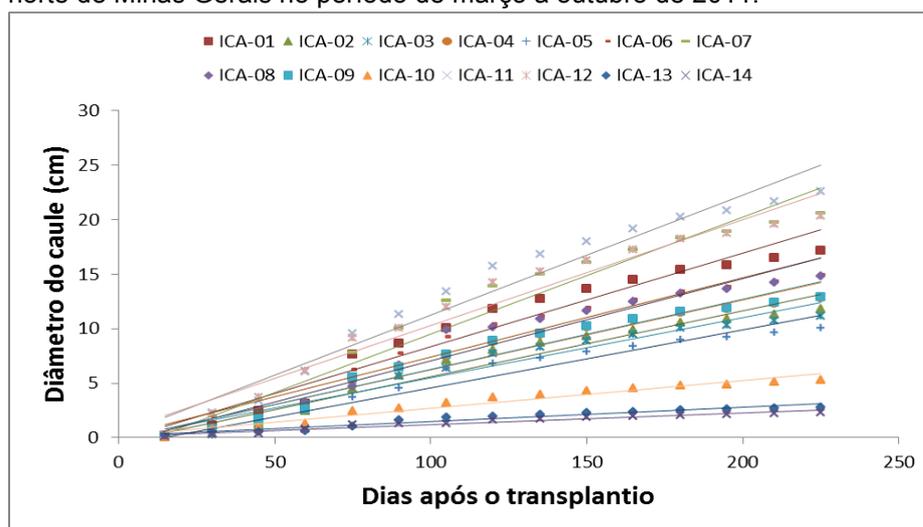
Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Tabela 3 - Equações lineares referentes à característica número de folhas de 14 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados por 225 dias em Montes Claros – MG.

Acessos	Equações	r^2
ICA-01	$y = 4,4484x - 124,52$	$r^2 = 0,9851$
ICA-02	$y = 5,9786x - 173,62$	$r^2 = 0,9640$
ICA-03	$y = 8,0103x - 228,05$	$r^2 = 0,9871$
ICA-04	$y = 7,0079x - 187$	$r^2 = 0,9880$
ICA-05	$y = 2,3405x - 71,573$	$r^2 = 0,9811$
ICA-06	$y = 9,5246x - 288,95$	$r^2 = 0,9792$
ICA-07	$y = 6,546x - 203,43$	$r^2 = 0,9771$
ICA-08	$y = 5,9881x - 167,48$	$r^2 = 0,9870$
ICA-09	$y = 6,3214x - 186,47$	$r^2 = 0,9833$
ICA-10	$y = 1,4405x - 26,478$	$r^2 = 0,9878$
ICA-11	$y = 16,389x - 512,1$	$r^2 = 0,9740$
ICA-12	$y = 17,627x - 498,57$	$r^2 = 0,9862$
ICA-13	$y = 0,4907x - 5,1524$	$r^2 = 0,9967$
ICA-14	$y = 0,1726x - 2,5702$	$r^2 = 0,9956$

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Gráfico 3 - Diâmetro do caule de 14 acessos de *Lippia sidoides* cultivados no norte de Minas Gerais no período de março a outubro de 2011.



Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Tabela 4 - Equações lineares referentes à característica diâmetro do caule de 14 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados por 225 dias em Montes Claros – MG.

Acessos	Equações	r ²
ICA-01	y = 0,0858x - 0,2342	r ² = 0,9507
ICA-02	y = 0,0602x - 0,4121	r ² = 0,9538
ICA-03	y = 0,0552x - 0,0479	r ² = 0,9495
ICA-04	y = 0,0642x - 0,2104	r ² = 0,9541
ICA-05	y = 0,0534x - 0,7569	r ² = 0,9409
ICA-06	y = 0,0729x + 0,1278	r ² = 0,9515
ICA-07	y = 0,1073x - 1,2256	r ² = 0,9431
ICA-08	y = 0,0754x - 0,4978	r ² = 0,9505
ICA-09	y = 0,0648x - 0,2216	r ² = 0,9539
ICA-10	y = 0,0255x + 0,148	r ² = 0,9554
ICA-11	y = 0,1102x + 0,1928	r ² = 0,9584
ICA-12	y = 0,0971x + 0,5829	r ² = 0,9588
ICA-13	y = 0,0131x + 0,1544	r ² = 0,9445
ICA-14	y = 0,0107x + 0,1279	r ² = 0,9448

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Tabela 5 - Altura da planta, número de folhas e diâmetro do caule de 14 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados por 225 dias em Montes Claros – MG.

Acessos	Altura da planta	Número de Folhas	Diâmetro do Caule
ICA-04	261,76 a	2042,89 b	18,56 a
ICA-08	219,63 a	1179,84 b	14,81 a
ICA-11	215,41 a	3175,43 a	22,56 a
ICA-03	207,01 a	1574,27 b	11,16 b
ICA-12	200,48 a	3467,51 a	20,3 a
ICA-06	200,06 a	1854,09 b	14,92 a
ICA-07	179,70 a	1269,42 b	20,55 a
ICA-01	171,30 a	876,37 b	17,17 a
ICA-09	157,94 a	1235,84 b	12,93 a
ICA-02	142,68 a	1171,57 b	11,80 b
ICA-05	113,77 b	455,04 c	10,07 b
ICA-13	68,00 b	105,00 c	2,81 c
ICA-10	44,37 b	297,64 c	5,31 c
ICA-14	29,21 b	36,26 c	2,29 c
C.V. (%)	27,64	30,57	37,42

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott & Knott, em nível de 5% de probabilidade.

Em relação às características analisadas após a colheita, apenas 12 acessos puderam ser avaliados, uma vez que as plantas pertencentes ao

ICA-13 e ICA-14 não sobreviveram até o final do experimento. Como demonstrado anteriormente, os dois acessos em questão apresentaram pequeno crescimento vegetativo.

Entre os 12 acessos, ICA-12, ICA-11, ICA-01, ICA-07, ICA-06 e ICA-04 foram superiores aos demais para as características produção de fitomassa fresca, de fitomassa seca e de óleo essencial. Os menores resultados foram observados no acesso ICA-10. Apenas o teor de óleo essencial não apresentou diferenças estatísticas entre as amostras, sendo que os valores variaram entre 1,45 e 5,89%. Esses resultados são inferiores aos encontrados por Oliveira (2008), caracterizando acessos de *Lippia sidoides*, que apresentaram até 7,68% de teor óleo essencial, porém a produção de fitomassa fresca foi de apenas 62,94g. Mesmo com o acesso que gerou 304,18g de fitomassa e 6,77% de teor, os resultados são consideravelmente baixos, quando comparados com os da presente pesquisa. A variabilidade entre os acessos se mostrou bastante significativa para as produções de fitomassa fresca, fitomassa seca e óleo essencial e para o teor de timol, gerando uma relação de 21:1, 18:1, 105:1 e 830:1, respectivamente, entre o maior e o menor valor (TAB. 6). Em relação ao teor de timol, a maioria dos acessos apresentou médias inferiores a 7%. Esses resultados divergem dos encontrados por Oliveira (2008), o qual verificou apenas um acesso com teor de timol de aproximadamente 7%. Os demais acessos apresentaram teores superiores a 45%.

O acesso que mais se destacou foi o ICA-05, com teor médio de 66,40%, sendo estatisticamente superior aos demais. O segundo com maior teor de timol foi apresentado pelo ICA-04, com média de 43,23%, valor significativamente superior ao restante dos acessos (TAB. 6).

Tabela 6 - Produção de fitomassa fresca (FMF), de fitomassa seca (FMS), de óleo essencial (Óleo), de teor de óleo essencial (Teor) e de teor de timol (Timol) de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados no norte de Minas Gerais.

Acessos	FMF (g)	FMS (g)	Óleo (g)	Teor (%)^{n.s.}	Timol (%)
ICA-12	1784,413 a	324,07 a	9,71 a	3,30	0,08 c
ICA-11	1561,50 a	286,90 a	8,15 a	2,83	0,83 c
ICA-01	988,43 a	214,64 a	9,07 a	4,38	6,01 c
ICA-07	1075,18 a	237,61 a	11,57 a	5,01	2,23 c
ICA-06	947,27 a	196,40 a	8,99 a	4,35	2,28 c
ICA-04	816,95 a	173,43 a	8,55 a	4,04	43,23 b
ICA-03	659,56 b	132,98 b	4,70 b	3,14	0,66 c
ICA-09	602,34 b	133,11 b	4,78 b	3,97	3,06 c
ICA-02	460,90 b	95,02 b	4,14 b	4,27	2,08 c
ICA-08	432,62 b	87,88 b	2,38 b	2,94	2,72 c
ICA-05	261,30 c	57,07 c	2,45 b	5,89	66,40 a
ICA-10	84,53 d	18,48 d	0,11 c	1,45	19,04 c
C.V. (%)	6,523	9,279	36,603	36,018	52,041

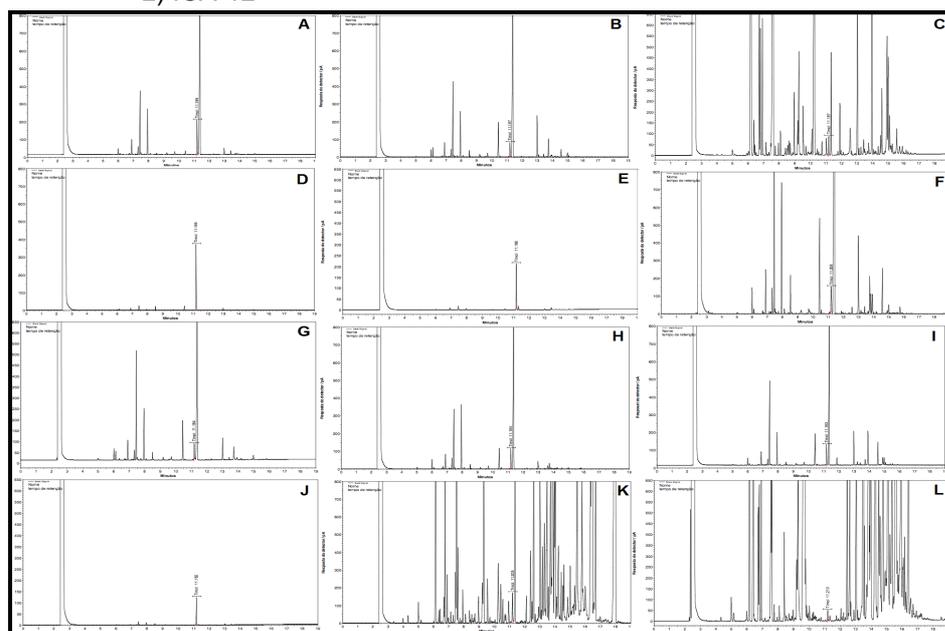
Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Nota: Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott & Knott, em nível de 5% de probabilidade.

De acordo com a FIG. 1, observa-se que os óleos essenciais dos acessos estudados apresentaram uma diversidade de componentes, com destaque para ICA-03, ICA-11 e ICA-12. Esses resultados são importantes, uma vez que evidenciam a necessidade de novas investigações para identificar essas substâncias e as propriedades farmacológicas.

Figura 1 - Cromatogramas dos óleos essenciais de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. cultivados no norte de Minas Gerais:

- A) ICA-01
- B) ICA-02
- C) ICA-03
- D) ICA-04
- E) ICA-05
- F) ICA-06
- G) ICA-07
- H) ICA-08
- I) ICA-09
- J) ICA-10
- K) ICA-11
- L) ICA-12



Fonte: MELO, 2012.

Nem todas as plantas que apresentaram as maiores alturas resultaram nas maiores produções de fitomassa, como é o caso de ICA-08 e ICA-03, que apresentaram produções intermediárias. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Blank *et al.* (2004), ao trabalharem com *Ocimum* sp., que observaram que a planta com maior altura não resultou na maior produção de fitomassa. Esses autores sugerem que isso ocorreu devido à interação de diversas variáveis, sendo uma delas o número de folhas por planta. Esta

pesquisa divergiu dos resultados encontrados por Blank et al. (2004) e por e Januzzi et al. (2011), esses últimos trabalhando com *Lippia alba*, observaram variação significativa do teor de óleo essencial entre os acessos amostrados. Januzzi et al. (2011) também observaram diferenças para as características fitomassa fresca e seca e produção de óleo essencial. Com base em todos os trabalhos mencionados, percebe-se a importância da variabilidade entre acessos avaliados, uma vez que os genótipos superiores podem ser utilizados em programas de melhoramento genético e, conseqüentemente, favorecer a produção de variedades ou genótipos com maiores produtividades e teor de óleo essencial. Projetando-se os resultados da presente pesquisa para produção por hectare, os acessos com maiores produtividades de fitomassa fresca apresentaram uma média de 35,69 t . ha⁻¹ (ICA-12), 31,23 t . ha⁻¹ (ICA-11), 19,77 t . ha⁻¹ (ICA-01), 21,50 t . ha⁻¹ (ICA-07), 18,95 t . ha⁻¹ (ICA-06) e 16,34 t . ha⁻¹ (ICA-04). Em relação à produtividade de óleo essencial, as médias foram de 194,2 kg . ha⁻¹ (ICA-12), 163 kg . ha⁻¹ (ICA-11), 181,4 kg . ha⁻¹ (ICA-01), 231,4 kg . ha⁻¹ (ICA-07), 179,8 kg . ha⁻¹ (ICA-06) e 171 kg . ha⁻¹ (ICA-04).

As características de crescimento e produção de fitomassa e óleo essencial apresentaram correlações altamente significativas e positivas entre si (TAB. 7.), sugerindo que acessos mais altos, com maior número de folhas e diâmetro do caule apresentam maiores produtividades, tanto de fitomassa quanto de óleo essencial. Januzzi et al. (2011), trabalhando com *Lippia alba*, também observaram correlações positivas entre a produção de fitomassa e a de óleo essencial e entre o teor e a produção de óleo essencial. Porém, esses autores observaram uma correlação negativa entre o teor de óleo essencial e o teor de citral (principal constituinte do óleo de *L. alba*, assim como o timol para *L. sidoides*), diferentemente da presente pesquisa.

Tabela 7 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as características (fitomassa fresca – FMF; fitomassa seca – FMS; altura da planta – ALT; número de folhas – NFO; diâmetro do caule – DCA; produção de óleo essencial – OLE; teor de óleo essencial – TEO; teor de timol – TIM) analisadas de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. no norte de Minas Gerais.

	FMS	ALT	NFO	DCA	OLE	TEO	TIM
FMF	0,984**	0,408**	0,752**	0,714**	0,825**	-0,018 ^{n.s.}	-0,271 ^{n.s.}
FMS	-	0,416**	0,710**	0,696**	0,869**	-0,003 ^{n.s.}	-0,258 ^{n.s.}
ALT		-	0,600**	0,503**	0,433**	0,102 ^{n.s.}	-0,154 ^{n.s.}
NFO			-	0,534**	0,622**	-0,012 ^{n.s.}	-0,214 ^{n.s.}
DCA				-	0,629**	0,093 ^{n.s.}	-0,183 ^{n.s.}
OLE					-	0,322*	-0,125 ^{n.s.}
TEO						-	0,368*

n.s. não significativo; * significativo a 5% de probabilidade de erro; ** significativo a 1% de probabilidade de erro.

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

4 CONCLUSÃO

Os acessos amostrados de *Lippia sidoides* apresentam significativa variabilidade para as características: altura de planta, número de folhas, diâmetro do caule, fitomassa fresca e seca, produção de óleo essencial e teor de timol.

Os acessos ICA-12, ICA-11, ICA-01, ICA-07, ICA-06 e ICA-04 se mostram como os mais promissores para a produção de fitomassa e de óleo essencial, enquanto o acesso ICA-10, o menos promissor.

Considerando-se o teor de timol, foi evidenciado o potencial do acesso ICA-05, o qual poderá ser utilizado em programas para melhorar a qualidade do óleo essencial produzido pela espécie.

CAPÍTULO 4 - DIVERGÊNCIA GENÉTICA E MODO DE REPRODUÇÃO DO ALECRIM-PIBENTA (*Lippia sidoides* Cham.)

RESUMO

O alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) é uma planta medicinal com folhas aromáticas. Apresenta óleo essencial com importante atividade farmacológica, especialmente como antisséptico e antimicrobiano. É considerada como uma das sete espécies prioritárias da caatinga para conservação e manejo. Assim, é essencial estudar a variabilidade genética e o modo de reprodução da espécie, uma vez que essas informações podem auxiliar, significativamente, no processo de conservação e, conseqüentemente, nos programas de melhoramento genético. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a divergência genética por meio da técnica de eletroforese de isoenzimas e de dados agrônômicos e determinar o modo de reprodução de *L. sidoides* por meio da relação pólen/óvulo. Doze acessos de *L. sidoides* foram submetidos à análise eletroforética de isoenzimas em gel de amido, visando a analisar a sua divergência genética. Os sistemas enzimáticos IDH, MDH e SKDH foram estudados. A similaridade genética foi avaliada com base na ausência ou na presença de bandas. Os dados agrônômicos foram analisados com base na produção de fitomassa fresca e seca, na produção e no teor de óleo essencial, na altura da planta, no número de folhas, no diâmetro do caule e no teor de timol. Matrizes de dissimilaridade foram calculadas (Índice de Jaccard – caracterização isoenzimática; distância média Euclidiana – caracterização agrônômica). Os acessos foram agrupados seguindo o método de Tocher. Para a análise do modo de reprodução, foram utilizadas 30 flores coletadas de plantas matrizes no Horto Medicinal do ICA/UFMG. Cada antera foi esmagada sobre lâmina de microscopia e corada com carmim acético. Todos os grãos de pólen foram contados, com o auxílio de microscópio ótico. O ovário foi aberto e todos os óvulos foram contados. Os resultados da divergência genética mostraram que os acessos ICA-05 e ICA-08 foram os mais dissimilares, enquanto ICA-08 e ICA-12 apresentaram a maior similaridade, pelos dados isoenzimáticos. O agrupamento de Tocher gerou três grupos: I e II, com cinco acessos cada e III, com dois acessos. A divergência genética por meio dos dados agrônômicos apresentou ICA-02 e ICA-09 como os acessos mais similares e ICA-10 e ICA-12 como os menos similares. O agrupamento de Tocher gerou três grupos também: I, com dez acessos e II e III, com um acesso cada. Em relação ao modo de reprodução da espécie, a relação pólen/óvulo mostrou que *L. sidoides* apresentou 1553 ± 443 grãos de pólen por óvulo. Essa razão evidencia que a espécie é alógama facultativa. Assim, a alta variabilidade apresentada nesta pesquisa corrobora a identificação do modo de reprodução da espécie.

Palavras-chave: Isoenzimas. Variabilidade genética. Eletroforese. Relação pólen/óvulo. Plantas medicinais.

CHAPTER 4 - GENETIC DIVERGENCE AND REPRODUCTION MODE OF *ALECRIM-PIMENTA* (*Lippia sidoides* Cham.)

ABSTRACT

The *alecrim-pimenta* (*Lippia sidoides*) is a medicinal plant with aromatic leaves that present essential oil with important pharmacological activities, especially as antiseptic and antimicrobial. It is considered one of the seven priority species of Caatinga to conservation and management. Thus, it is essential to study the genetic variability and the species reproduction mode, once this information can support significantly the conservation process and, consequently, the genetic improvement programs. Therefore, the aim of this study was to evaluate the genetic divergence by the isoenzymes electrophoresis technique and the agronomic data and determine the reproduction mode of *L. sidoides* by the pollen/ovule ratio. Twelve accessions of *L. sidoides* were analyzed through isoenzymes electrophoresis in starch gel, aiming to analyze its genetic divergence. The enzymatic systems IDH, MDH and SKDH were studied. The genetic similarity was evaluated based on the absence or presence of bands. The agronomic data were analyzed based on fresh and dry phytomass production, essential oil yield, essential oil content, plant height, amount of leaves, stalk diameter and thymol content. Dissimilarity matrices were calculated (Jaccard index – isoenzymatic characterization; average Euclidean distance – agronomic characterization). The accessions were clustered following Tocher's method. To the reproduction mode analysis, 30 flowers were collected from stock plants in medicinal vegetable garden of ICA/UFMG were used. Each anther was squashed on microscopy sheet and colored with carmim acetic. Every pollen grain was counted with the aid of an optic microscope. The ovary was opened and the ovules counted. The results of the genetic divergence showed the accessions ICA-05 and ICA-08 were the most dissimilar, while ICA-08 and ICA-12 presented the highest similarity by the isoenzymatic data. Tocher's cluster provided three groups: I and II with five accessions each and III with two accessions. The genetic divergence by the agronomic data presented ICA-02 and ICA-09 as the most similar accessions and ICA-10 and ICA-12 as the lowest. Tocher's cluster provided three groups too: I with ten accessions and II and III with one accession each. In relation to the species reproduction mode, the pollen/ovule ratio showed that *L. sidoides* presented 1553 ± 443 pollen grains per ovule. This likelihood indicates that the specie is facultative alogamous. Thus, the high variability presented in this work corroborates the identification of the reproduction mode of the specie.

Key words: Isoenzymes. Genetic variability. Electrophoresis. Pollen/ovule ratio. Medicinal plants.

1 INTRODUÇÃO

O alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) é uma planta medicinal da família Verbenaceae, nativa do nordeste brasileiro e semiárido mineiro, própria da vegetação do semiárido e que possui folhas aromáticas e picantes, as quais contêm óleo essencial rico em timol e carvacrol (LORENZI; MATOS, 2008). O óleo da espécie apresenta propriedades farmacológicas importantes, principalmente como antisséptico e antimicrobiano. Está presente na lista das sete espécies prioritárias da caatinga para conservação e manejo (VIEIRA; SILVA, 2002). Esse é um fato preocupante, pois diversas espécies medicinais brasileiras foram exportadas em grande quantidade no passado e vêm sendo exploradas de forma predatória na atualidade, gerando significativas reduções na sua diversidade genética.

De acordo com Oliveira e Martins (1998) e Martins *et al.* (2000), talvez o melhor exemplo seja o caso da ipeca (*Psychotria ipecacuanha*), que teve a sua diversidade genética reduzida tanto pelo extrativismo em larga escala, quanto pela redução das matas onde ocorria naturalmente. Dessa forma, torna-se cada vez mais importante a conservação dos recursos genéticos das plantas medicinais, especialmente da *L. sidoides*, que está listada como prioritária. Scheffer *et al.* (1998) sugerem ações mais urgentes, como o manejo sustentado, a domesticação e o desenvolvimento de tecnologias de cultivo. Para o desenvolvimento dessas ações, é essencial que se estude a variabilidade genética presente na natureza e se conheçam diversos aspectos da biologia da espécie; entre eles, o modo de reprodução. Além disso, essas informações são imprescindíveis para definição das estratégias de conservação e melhoramento genético (BORÉM; MIRANDA, 2009). A variação genética entre as espécies é importante, por gerar indivíduos com características distintas, como resistência a fatores ambientais e diferentes teores de metabólitos. Fatores que contribuem, significativamente, para os programas de melhoramento genético e favorecem a criação de plantas superiores. Entretanto, pouco tem sido feito, em termos de caracterização genética de espécies nativas e falta eficiência para impedir a erosão genética em longo prazo em diversas áreas do país (GUERRA; NODARI, 2003).

De acordo com Cruz (2008), várias características são utilizadas para a avaliação da divergência genética de uma espécie, sendo as mais utilizadas as moleculares e agronômicas. Com base nessas informações, possibilita-se o cálculo de medidas de dissimilaridade, que representam a diversidade no conjunto de acessos estudados. Para a análise molecular, os marcadores isoenzimáticos são comumente utilizados, uma vez que apresentam eficiência, baixo custo, metodologia fácil, além de possibilitar a identificação de locos em homozigose e heterozigose (FALEIRO, 2007). Esses marcadores não requerem estudo prévio do genoma e permitem a análise rápida de um grande número de amostras (ROBINSON, 2006). Gonçalves *et al.* (2010), em recente estudo com *Dimorphandra mollis*, admitem a importância da utilização de sistemas enzimáticos para análise da variabilidade genética. Conforme esses autores, os resultados desse estudo são essenciais para a adoção de estratégias de manejo adequadas à conservação genética da espécie.

Em relação à biologia de reprodução das espécies, Cruden (1977) afirma que o sistema reprodutivo das plantas se correlaciona à razão pólen/óvulo e, com base nessa relação, é possível a identificação do modo de reprodução da espécie, sendo que quanto maior a quantidade de pólen, maior a probabilidade da espécie se reproduzir por polinização cruzada. Esse autor também considera esse método o melhor indicador do sistema de reprodução das plantas, quando comparado à análise da morfologia floral e do tamanho das flores. Conforme Almeida (2007), esse trabalho constitui-se em uma alternativa rápida e de baixo custo, quando comparado às técnicas de cruzamentos artificiais controlados e de marcadores moleculares, além de ser usado nos estudos de evolução dos mecanismos reprodutivos das plantas. Assim, os estudos com as espécies medicinais *Allamanda blanchetii* (ARAÚJO *et al.*, 2011), *Aloe vera* e *Aloe saponaria* (VELÁSQUEZ-ARENAS; IMERY-BUIZA, 2008), *Alpinia zerumbet* (KRIECK *et al.*, 2008), *Ocimum sanctum* (ALMEIDA, 2007), *Amasonia campestris* (RAMÍREZ, 2007), *Zeyheria montana* (BERTONI, 2003), *Hedychium spicatum* (JUGRAN *et al.*, 2011) e *Vismia guianensis* (SANTOS; MACHADO, 1999) exemplificam e confirmam a importância desse método.

Com base na prioridade de conservação de *L. sidoides* e na falta de informações sobre a divergência genética e o modo de reprodução da espécie, é de suma importância conduzir estudos nessa área, pois permite a definição de estratégias de conservação e, conseqüentemente, poderá subsidiar futuros estudos, visando ao melhoramento genético da espécie. Assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a variabilidade genética e o modo de reprodução de *L. sidoides*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), no período de março a novembro de 2011.

Para o estudo de divergência genética, foram analisados 12 acessos, sendo três indivíduos por acesso (TAB. 1.) de *L. sidoides*, cultivados sob delineamento em blocos ao acaso, no espaçamento 1,0 x 0,5m, sendo um metro entre linhas e 0,5m entre plantas (MELO *et al.*, 2011a), com sistema de irrigação por gotejamento.

Tabela 1 - Identificação dos acessos de *Lippia sidoides* Cham. avaliados.

Identidade dos acessos	Município
ICA-01	Salinas – MG
ICA-02	Turmalina – MG
ICA-03	Turmalina – MG
ICA-04	Serro – MG
ICA-05	Serro – MG
ICA-06	Cristália – MG
ICA-07	Montes Claros – MG
ICA-08	Juramento – MG
ICA-09	Glaucilândia – MG
ICA-10	Buenópolis – MG
ICA-11	Buenópolis – MG
ICA-12	Buenópolis - MG

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

2.1 Modo de reprodução

A relação pólen/óvulo foi obtida com a divisão da média do número de grãos de pólen presentes pela média do número de óvulos em uma flor, conforme metodologia descrita por Cruden (1977). Foram coletadas 30 flores, provenientes de plantas de alecrim-pimenta localizadas no Horto Medicinal do ICA/UFMG, com flores na pré-antese e, em seguida, essas foram analisadas por meio de microscópio estereoscópico, para determinação do número de óvulos existentes em cada ovário. Esse número foi determinado por meio do corte da parede do ovário, utilizando-se um bisturi, seguindo a contagem dos óvulos. Posteriormente, uma antera de cada flor foi retirada para determinação do número de grãos de pólen em microscópio ótico. A antera foi esmagada sobre lâmina para microscopia, sendo adicionado o corante carmim acético e, em seguida, foi mensurado o número de grãos de pólen. A relação pólen/óvulo (P/O) foi estabelecida pela seguinte expressão:

$$P/O = \frac{\text{n}^\circ. \text{ de grãos de pólen em uma antera} \times \text{n}^\circ. \text{ de anteras}}{\text{n}^\circ. \text{ de óvulos}}$$

2.2 Caracterização isoenzimática

A caracterização foi realizada por meio da técnica de eletroforese horizontal em gel de amido de milho. Foram testados três sistemas enzimáticos: Isocitrato-desidrogenase (IDH), Malato-desidrogenase (MDH) e Chiquimato-desidrogenase (SKDH).

Na extração enzimática, foram coletadas amostras de folhas, provenientes dos acessos cultivados em campo, e, em seguida, armazenadas em sacos plásticos sob gelo picado em caixa de isopor. As amostras foram, imediatamente, levadas ao Laboratório de Plantas Medicinais do ICA/UFMG para extração. Aproximadamente, 0,167g de folhas, por acesso, foram pesados e macerados em almofariz de porcelana previamente resfriado. Acrescentaram-se aproximadamente 30mg de PVPP e 450µL da solução extratora (TAB. 2.), recomendadas por Alfenas *et al.*

(2006). O macerado foi absorvido por retângulos de papel Whatmann®, com medidas de 0,8 x 0,4cm.

Tabela 2 - Soluções de extração e do eletrodo empregadas no processo de eletroforese de isoenzimas e na extração de enzimas de tecidos foliares de *Lippia sidoides* Cham.

Extração (pH 8,5)*		Eletrodo (pH 7,0)**	
Componentes	Quantidade	Componentes	Quantidade
Fosfato de sódio bibásico	0,6g	Tris	16,35g
Sacarose	7g	Ácido cítrico	9,04g
PVP-40	2,56g	Água desionizada	1000mL
L-ácido ascórbico	100mg		
DIECA	100mg		
Bissulfito de sódio	50mg		
Borato de sódio (bórax)	50mg		
β-mercaptoetanol	0,2mL		
polietilenoglicol - 6000	1g		
Água desionizada	100mL		

*ALFENAS *et al.* (2006) **SHAW; PRASAD (1970)

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

No preparo do gel, utilizaram-se 40 ml da solução do eletrodo (TAB. 2.) e o volume foi completado com água destilada até atingir 600ml. A solução foi transferida para um Erlenmeyer de 1000 mL e, em seguida, acrescentaram-se 18g de sacarose e 72g de amido de milho. O composto foi aquecido por aproximadamente quatro minutos em forno micro-ondas, sendo vertido em forma de acrílico para eletroforese horizontal. Ao atingir a temperatura ambiente, foi alocado em geladeira até ser utilizado na manhã do dia seguinte.

Os géis foram retirados da geladeira e, com bisturi, fez-se um corte transversal a aproximadamente 4cm da extremidade catodal. A parte menor do gel foi afastada e os retângulos de papel contendo as amostras foram aplicados em número de seis, no primeiro gel, e sete, no segundo gel. Cada retângulo de papel correspondeu à amostra de um acesso. Nas extremidades do gel, foram inseridos retângulos de papel Whatmann®, com azul-de-

bromofenol, para visualização da frente de migração e do término da corrida. Em seguida, as duas partes do gel foram reunidas e seguiu-se a corrida eletroforética.

Cada forma com o gel foi colocada entre duas cubas com os eletrodos e 150mL da solução do eletrodo. Na conexão do gel às cubas, utilizou-se tecido dobrado tipo “perfex”. Inicialmente, procedeu-se à pré-corrida durante 30 minutos (15mA). Após esse período, retiraram-se os retângulos de papel e a corrida foi reiniciada (33mA), por aproximadamente quatro horas ou até a cor do azul-de-bromofenol atingir nove centímetros no gel, a partir da origem da corrida. As corridas eletroforéticas foram realizadas em geladeira a 4°C.

Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado, com fio de nylon nº20, horizontalmente em fatias de aproximadamente 2 mm de espessura. As fatias foram incubadas em solução reveladora por período apropriado a cada sistema enzimático, conforme recomendado por Alfenas *et al.* (2006). Após a revelação das bandas, os géis foram lavados em água corrente e mergulhados em solução aquosa de glicerina 10%, por cerca de 24 horas, sendo armazenados em geladeira, nesse período.

Com a revelação das bandas, foram delineados os zimogramas para cada sistema enzimático. Em seguida, criaram-se as matrizes binárias (1 = presença; 0 = ausência da banda eletroforética) com os resultados dos zimogramas.

2.3 Caracterização agronômica

Na coleta dos dados agronômicos, foram mensuradas as seguintes características: produção de fitomassa fresca; produção de fitomassa seca; altura da planta; número de folhas; diâmetro do caule; produção de óleo essencial; teor de óleo essencial, com base na matéria seca; e teor de timol, com base no óleo essencial.

2.4 Divergência genética

Para a avaliação da divergência genética, utilizou-se o programa GENES (CRUZ, 2008).

2.4.1 Divergência genética por padrões isoenzimáticos

Utilizou-se o Índice de Similaridade de Jaccard, definido pela fórmula (CRUZ, 2008):

$$S_j = \frac{a}{a + b + c}$$

Onde:

a = número de coincidências do tipo 1-1 para cada par de acessos;

b = número de discordâncias do tipo 1-0 para cada par de acessos;

c = número de discordâncias do tipo 0-1 para cada par de acessos.

A dissimilaridade com base em dados isoenzimáticos foi obtida pelo Complemento Aritmético do Índice de Jaccard, dado por: $CS_j = 1 - S_j$.

De acordo com Carvalho *et al.* (2009), os coeficientes que não consideram o índice *d* (número de coincidências do tipo 0-0 para cada par de acessos), como é o caso do índice de Jaccard, são preferidos, uma vez que não se sabe a natureza da ausência da banda. Além do mais, o coeficiente de Jaccard tem sido largamente utilizado, especialmente para estudos de variabilidade genética em espécies medicinais.

2.4.2 Divergência genética por meio de caracteres agronômicos

Adotou-se a Distância Euclidiana Média como medida de dissimilaridade, para estimar a divergência genética entre os acessos, por meio de caracteres agronômicos. Essa distância é dada pela expressão abaixo (CRUZ, 2008):

$$d_{ij} = \sqrt{\frac{1}{v} \sum_j (Y_{ij} - Y_{ij})^2}$$

em que Y_{ij} é o valor obtido para o *i*-ésimo genótipo em relação à *j*-ésima variável e *v*, o número de variáveis analisadas.

2.5 Métodos de agrupamento

Utilizaram-se os métodos de agrupamento: hierárquico aglomerativo de ligação média não ponderada (UPGMA) e o não hierárquico de otimização de Tocher. O primeiro consiste na formação de dendrogramas com a distribuição dos acessos e o segundo permite o estabelecimento de grupos, de modo que haja homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos (CRUZ, 2008). Para essa análise, o método requer a matriz de dissimilaridade entre os acessos. Nessa matriz, identificou-se o par de acessos mais similar, formando o grupo inicial. Para inclusão de novos acessos ao grupo, compararam-se o acréscimo no valor médio da distância dentro do grupo e o nível máximo permitido (Θ), para que a distância média intragrupo fosse inferior a qualquer distância intergrupo. O valor de Θ foi definido pelo valor máximo da medida de dissimilaridade encontrado no conjunto das menores distâncias envolvendo cada acesso. Para o estabelecimento dos grupos, o cálculo da distância entre o indivíduo k e o grupo formado pelos indivíduos ij é dada por (CRUZ, 2008):

$$d_{(ij)k} = d_{ik} + d_{jk}$$

A inclusão ou não do indivíduo k no grupo é feita, considerando-se o seguinte:

$$\text{Se } \frac{d(\text{grupo})k}{n} \leq \Theta \quad \text{inclui-se o indivíduo } k \text{ no grupo.}$$

$$\text{Se } \frac{d(\text{grupo})k}{n} > \Theta \quad \text{o indivíduo } k \text{ não é incluído no grupo.}$$

Sendo n o número de indivíduos que constitui o grupo original.

2.6 Projeção da divergência genética em gráficos cartesianos

A dissimilaridade entre os acessos foi avaliada com base em suas distâncias relativas na dispersão gráfica. As coordenadas de cada acesso foram obtidas da matriz de dissimilaridade (Complemento Aritmético do Índice de Jaccard, para dados isoenzimáticos e Distância Euclidiana Média

para dados agronômicos) e projetadas em espaço bidimensional, conforme metodologia proposta por Cruz (2008).

2.7 Correlação entre as estimativas de divergência genética obtidas por meio de padrões isoenzimáticos e caracteres agronômicos

A concordância entre as estimativas de divergência genética foi avaliada pela correlação entre as matrizes de dissimilaridade (Jaccard – bandas isoenzimáticas; Distância Euclidiana Média – caracteres agronômicos), com base no teste de Mantel (CRUZ, 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Modo de reprodução

Os resultados demonstraram que a *L. sidoides* apresenta, em média, 3106 ± 886 grãos de pólen por flor e uma relação média de 1553 grãos de pólen para cada óvulo, em uma flor (TAB. 3.). De acordo com Cruden (1977), essa relação classifica a espécie como alógama facultativa. Resultados semelhantes foram encontrados por Ramírez (2007), ao trabalhar com *Amasonia campestris*, espécie medicinal da mesma família de *L. sidoides*; por Kriek *et al.* (2008), trabalhando com *Alpinia zerumbet* e por Bertoni (2003), com *Zeyheria montana*. Para o último autor, esse conhecimento do sistema reprodutivo é de extrema relevância, pois interfere no nível de variabilidade genética de uma espécie e determina as interações ecológicas que favorecem a dispersão de pólen ou semente. Segundo Borém e Miranda (2009), espécies alógamas são caracterizadas pela grande heterogeneidade de seus indivíduos, consequência da alta heterozigose. Assim, a variabilidade genética de uma espécie pode ser favorecida pela alogamia.

Araújo *et al.* (2011), trabalhando com *Allamanda blanchetii*, e Almeida (2007), com *Ocimum sanctum*, verificaram que as suas espécies apresentam autogamia facultativa. Almeida (2007) ainda admite que esse modo de

reprodução beneficia a espécie, que possui as vantagens da autopolinização e da polinização cruzada.

Tabela 3 - Número de óvulos e de grãos de pólen por flor e da relação pólen/óvulo (P/O) de *Lippia sidoides* Cham.

Variáveis	Óvulos	Grãos de pólen por flor	P/O
Média	2	3105,90	1552,95
Máximo	2	5040	2520
Mínimo	2	1424	712
Desvio-padrão	0	885,80	442,90
Coefficiente de Variação (%)	0	28,52	28,52

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

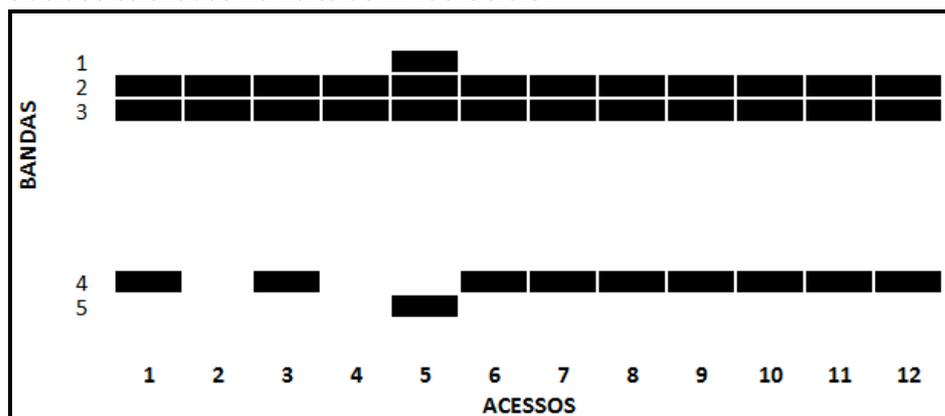
Os resultados desta pesquisa são importantes para a identificação do sistema reprodutivo de *L. sidoides*, porém novos trabalhos mais específicos serão necessários para analisar outros aspectos da biologia reprodutiva da espécie, como a morfologia floral, a identificação e o comportamento de visitantes florais.

3.2 Divergência genética por padrões isoenzimáticos

Os zimogramas dos sistemas Isocitrato-desidrogenase (IDH), Malato-desidrogenase (MDH) e Chiquimato-desidrogenase (SKDH) revelaram uma elevada variabilidade, quanto ao número de bandas.

Para o sistema IDH, o acesso que apresentou o maior número de bandas foi o ICA-05, com quatro. Com exceção de ICA-02 e ICA-04, que apresentaram apenas duas bandas, todos os demais apresentaram três bandas, sendo que as bandas IDH-2 e IDH-3 foram reveladas em todos os acessos estudados (FIG. 1.).

Figura 1 - Zimograma de Isocitrato-desidrogenase (IDH) de 12 acessos de *L. sidoides* cultivados no norte de Minas Gerais:



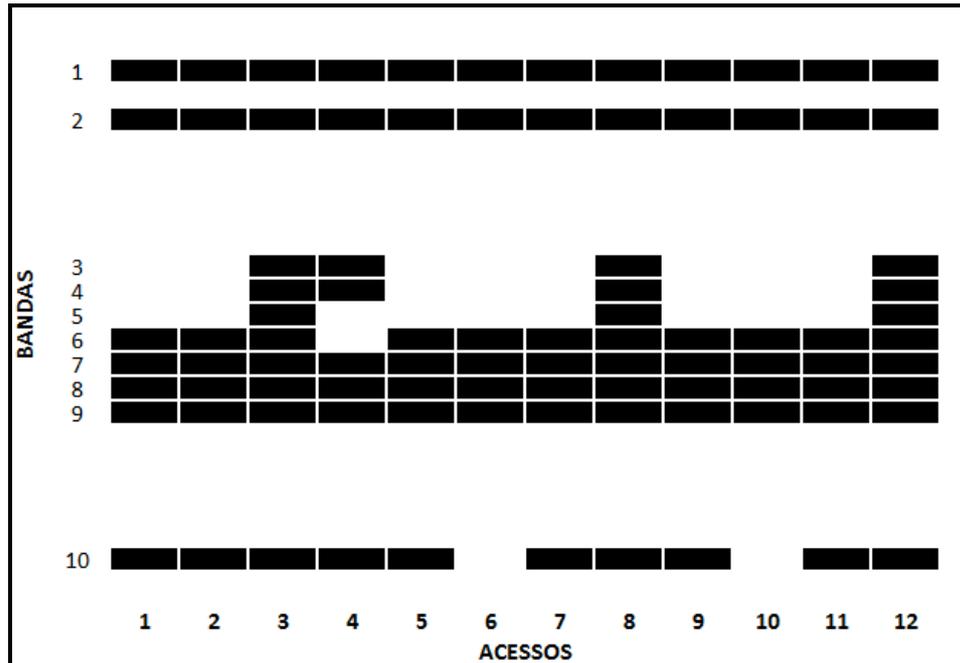
Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Nota: 1) ICA-01; 2) ICA-02; 3) ICA-03; 4) ICA-04; 5) ICA-05; 6) ICA-06

7) ICA-07; 8) ICA-08; 9) ICA-09; 10) ICA-10; 11) ICA-11; 12) ICA-12

Em relação ao sistema MDH, foi possível a visualização de 10 bandas, porém apenas cinco apresentaram polimorfismo. Os acessos ICA-03, ICA-08 e ICA-12 foram os únicos que apresentaram as 10 bandas. Com exceção de ICA-04, todos os demais apresentaram a banda MDH-6 (FIG. 2.).

Figura 2 - Zimograma de Malato-desidrogenase (MDH) de 12 acessos de *L. sidoides* cultivados no norte de Minas Gerais:

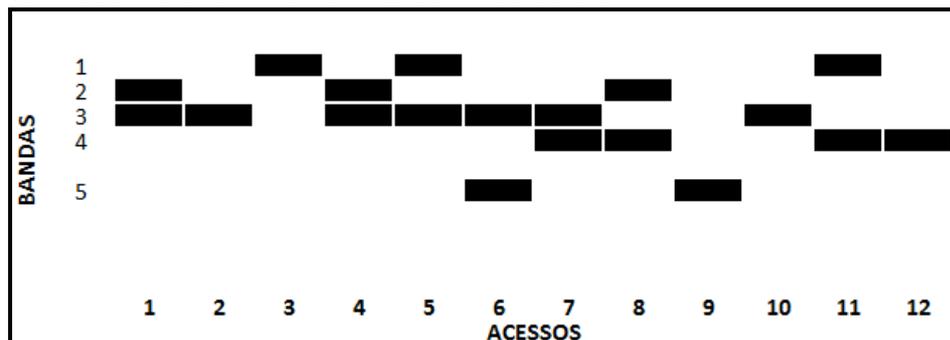


Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Nota: 1) ICA-01; 2) ICA-02; 3) ICA-03; 4) ICA-04; 5) ICA-05; 6) ICA-06
7) ICA-07; 8) ICA-08; 9) ICA-09; 10) ICA-10; 11) ICA-11; 12) ICA-12

O sistema SKDH foi o único que não apresentou bandas monomórficas (FIG. 3.). Sete acessos revelaram duas bandas, enquanto os outros cinco, apenas uma. Os únicos acessos que apresentaram, exatamente, as mesmas bandas foram: ICA-01 e ICA-04 (SKDH-2 e SKDH-3) e ICA-02 e ICA-10 (SKDH-3). A banda SKDH-5 foi revelada apenas pelos acessos ICA-06 e ICA-09.

Figura 3 - Zimograma de Chiquimato-desidrogenase (SKDH) de 12 acessos de *L. sidoides* cultivados no norte de Minas Gerais



Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Nota: 1) ICA-01; 2) ICA-02; 3) ICA-03; 4) ICA-04; 5) ICA-05; 6) ICA-06
7) ICA-07; 8) ICA-08; 9) ICA-09; 10) ICA-10; 11) ICA-11; 12) ICA-12

Em estudo realizado por Lopes *et al.* (2003), trabalhando com acessos de *Polygonum punctatum*, os autores verificaram elevado polimorfismo, apresentado pelos sistemas IDH, MDH e SKDH, entre os acessos avaliados, o que evidencia a importância desses sistemas isoenzimáticos para a análise de divergência genética. Porém, em outro trabalho com *Ipomoea batatas*, em análise realizada com raízes, os sistemas MDH e SKDH não apresentaram polimorfismo, sendo descartados pelos autores (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Resultado semelhante foi encontrado por Jugran *et al.* (2011), avaliando a diversidade genética, baseada em amostras de folhas, de *Hedychium spicatum*, espécie medicinal Indiana. Os autores trabalharam com oito enzimas e apenas a MDH não apresentou polimorfismo.

De acordo com as medidas de dissimilaridade, foi possível criar a matriz de dissimilaridade (TAB. 4), cujos valores variaram entre 0,067 e 0,526, sendo que, quanto menor esse valor, maior será a semelhança entre os acessos comparados. Com base nessa tabela, observa-se que os acessos mais similares foram ICA-08 e ICA-12, diferindo apenas em uma banda enzimática do sistema chiquimato-desidrogenase. Porém esses acessos, provenientes de Juramento e de Buenópolis, respectivamente, além da distância geográfica, têm origem em regiões com vegetação e clima divergentes. O par mais divergente foi representado pelos acessos ICA-05 e ICA-08, que apresentaram um total de 10 bandas divergentes. Essa

divergência também é representada pelas condições geográficas, sendo o ICA-05 proveniente de região de Mata Atlântica e o ICA-08, de Cerrado.

Tabela 4 - Medidas de dissimilaridade, entre 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham., obtidas a partir do complemento aritmético do índice de Jaccard.

ACESSOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-	0,167	0,375	0,286	0,333	0,231	0,154	0,313	0,231	0,167	0,286	0,375
2		-	0,400	0,308	0,231	0,250	0,167	0,438	0,250	0,182	0,308	0,400
3			-	0,375	0,412	0,438	0,375	0,188	0,333	0,400	0,267	0,133
4				-	0,438	0,467	0,400	0,313	0,467	0,429	0,500	0,375
5					-	0,400	0,333	0,526	0,400	0,357	0,333	0,500
6						-	0,231	0,471	0,167	0,091	0,357	0,438
7							-	0,313	0,231	0,167	0,154	0,267
8								-	0,375	0,438	0,313	0,067
9									-	0,250	0,231	0,333
10										-	0,308	0,400
11											-	0,267
12												-

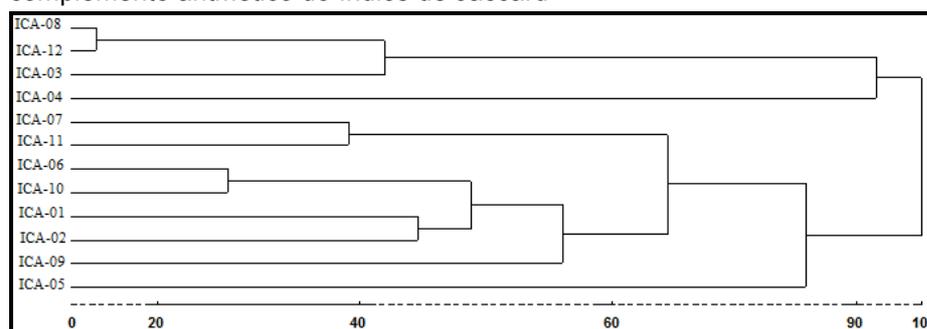
Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Nota: 1) ICA-01; 2) ICA-02; 3) ICA-03; 4) ICA-04; 5) ICA-05; 6) ICA-06

7) ICA-07; 8) ICA-08; 9) ICA-09; 10) ICA-10; 11) ICA-11; 12) ICA-12

De acordo com o agrupamento pelo método UPGMA, os acessos podem ser divididos em cinco grupos (FIG. 4.): I- ICA-08, ICA-12 e ICA-03; II- ICA-04; III- ICA-07 e ICA-11; IV- ICA-06, ICA-10, ICA-01, ICA-02 e ICA-09; V- ICA-05.

Figura 4 - Agrupamento de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. pelo método da ligação média não ponderada (UPGMA), baseado na caracterização isoenzimática, de acordo com a dissimilaridade do complemento aritmético do índice de Jaccard



Fonte: MELO, 2012.

Na análise de agrupamento de Tocher, adotou-se como referencial para a formação dos grupos a maior distância no conjunto das menores distâncias entre cada acesso. Esse referencial, denominado de Θ , foi de 0,28571. Com base nessa medida, foi possível realizar o agrupamento dos acessos pelo método de otimização de Tocher. Os resultados geraram três grupos (TAB. 5.): o grupo I (ICA-08, ICA-12, ICA-03, ICA-11 e ICA-07) e o grupo II (ICA-06, ICA-10, ICA-01, ICA-02 e ICA-09), contendo cinco acessos cada, e o grupo III, representado pelos dois acessos ICA-05 e ICA-04.

Tabela 5 - Análise de agrupamento, pelo método de Tocher, a partir dos dados isoenzimáticos dos 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham.

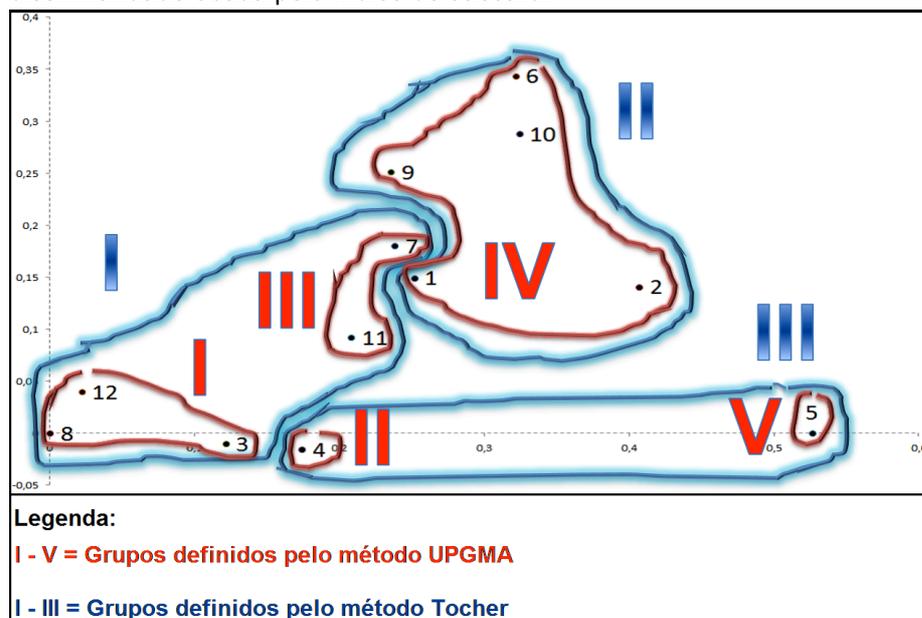
GRUPOS	ACESSOS				
I	ICA-08	ICA-12	ICA-03	ICA-11	ICA-07
II	ICA-06	ICA-10	ICA-01	ICA-02	ICA-09
III	ICA-05	ICA-04			

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Na FIG. 5., pode-se observar a dispersão gráfica dos acessos, baseada nas medidas de dissimilaridade, no sistema de eixos cartesianos. A FIG. 5. ainda ilustra a grande dispersão dos acessos, mostrando uma significativa variabilidade dos acessos, pela análise isoenzimática. Com

exceção do ICA-04, todos os demais acessos foram agrupados de forma semelhante pelos dois métodos (UPGMA e Tocher). Como exemplo, destacam-se a alta divergência entre os acessos ICA-05 e ICA-08 e o agrupamento dos acessos ICA-06, ICA-10, ICA-01, ICA-02 e ICA-09. Esses resultados foram confirmados tanto pelo UPGMA quanto pelo agrupamento de Tocher.

Figura 5 - Dispersão gráfica e agrupamento de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham., com base nas coordenadas estimadas a partir da matriz de dissimilaridade obtida pelo índice de Jaccard:



Fonte: MELO, 2012.

Nota: 1) ICA-01; 2) ICA-02; 3) ICA-03; 4) ICA-04; 5) ICA-05; 6) ICA-06; 7) ICA-07; 8) ICA-08; 9) ICA-09; 10) ICA-10; 11) ICA-11; 12) ICA-12

3.3 Divergência genética por meio de caracteres agrônômicos

Para evitar que a estimativa da Distância Euclidiana Média fosse alterada com a mudança da escala de medições, procedeu-se à padronização dos dados, passando todos para a mesma unidade (TAB. 6.). Na TAB. 7, são apresentadas as estimativas de dissimilaridade, baseadas na distância Euclidiana Média, entre os acessos. Observa-se que a menor divergência (0,245) foi entre os acessos ICA-02 e ICA-09, enquanto a maior

(2,732) se encontra entre ICA-10 e ICA-12. O acesso ICA-12 foi um dos que apresentaram as maiores médias para as características de produção de fitomassa fresca e seca e de óleo essencial. De acordo com Borém e Miranda (2009), cruzamentos entre indivíduos não aparentados podem promover vigor híbrido (heterose). Com base nas estimativas de dissimilaridade, a segunda maior divergência (2,557) se encontra entre os acessos ICA-05 e ICA-12. Nota-se que, conforme os dados isoenzimáticos, a segunda maior divergência também é apresentada pelos acessos em questão. Considerando-se que o ICA-05 apresentou as maiores médias para teor de timol, torna-se interessante o estudo desses dois acessos, visando ao melhoramento genético em teor de timol, uma vez que esse composto químico define a qualidade do óleo essencial da espécie nas aplicações farmacológicas, por conferir atividade antimicrobiana.

Tabela 6 - Médias padronizadas de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. em relação a oito caracteres agrônômicos.

ACESSOS	Fitomassa Fresca	Fitomassa Seca	Óleo Essencial	Teor de Óleo	Altura da Planta	Número de Folhas	Diâmetro do Caule	Teor de Timol
ICA-01	1,96	2,31	2,54	3,79	3,01	0,90	3,40	0,29
ICA-02	0,92	1,02	1,16	3,70	2,51	1,21	2,34	0,10
ICA-03	1,31	1,43	1,31	2,72	3,64	1,62	2,21	0,03
ICA-04	1,62	1,87	2,39	3,50	4,60	2,11	3,67	2,06
ICA-05	0,52	0,61	0,69	5,11	1,20	0,47	1,99	3,17
ICA-06	1,88	2,11	2,52	3,77	3,52	1,91	2,95	0,11
ICA-07	2,13	2,56	3,24	4,34	3,16	1,31	4,07	0,11
ICA-08	0,86	0,95	0,67	2,55	3,86	1,22	2,93	0,13
ICA-09	1,20	1,43	1,34	3,44	2,78	1,28	2,56	0,15
ICA-10	0,17	0,20	0,03	1,26	0,78	0,31	1,05	0,91
ICA-11	3,10	3,09	2,28	2,46	3,79	3,28	4,47	0,04
ICA-12	3,54	3,49	2,72	2,86	3,52	3,58	4,02	0,06

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Tabela 7 - Medidas de dissimilaridade, entre 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham., obtidas a partir da Distância Euclidiana Média.

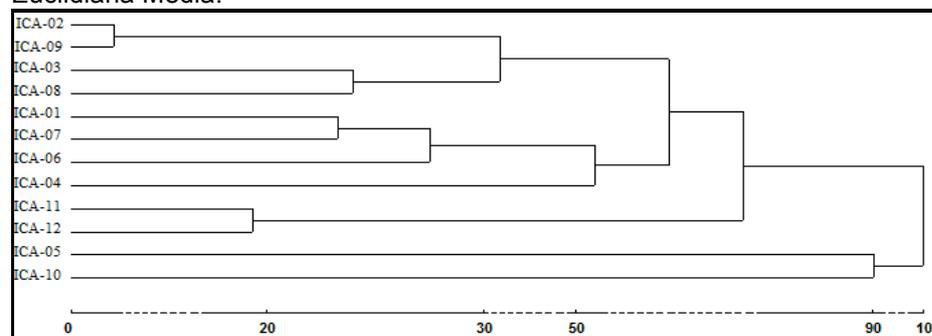
ACESSOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-	0,878	0,883	0,976	1,643	0,440	0,439	1,072	0,693	1,987	1,182	1,257
2		-	0,590	1,304	1,268	0,856	1,224	0,687	0,245	1,350	1,669	1,789
3			-	1,0880	1,631	0,706	1,227	0,452	0,437	1,525	1,360	1,512
4				-	1,650	0,848	1,052	1,169	1,141	2,278	1,120	1,335
5					-	1,728	1,910	1,617	1,371	1,697	2,482	2,557
6						-	0,596	0,995	0,665	2,043	1,027	1,086
7							-	1,407	1,060	2,387	1,123	1,151
8								-	0,603	1,481	1,534	1,762
9									-	1,449	1,452	1,579
10										-	2,590	2,732
11											-	0,365
12												-

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Nota: 1) ICA-01; 2) ICA-02; 3) ICA-03; 4) ICA-04; 5) ICA-05; 6) ICA-06; 7) ICA-07; 8) ICA-08; 9) ICA-09; 10) ICA-10; 11) ICA-11; 12) ICA-12

De acordo com o dendrograma apresentado na FIG. 6., podem-se formar cinco grupos com os acessos estudados. São eles: I- ICA-02, ICA-09, ICA-03 e ICA-08; II- ICA-01, ICA-07, ICA-06 e ICA-04; III- ICA-11 e ICA-12; IV- ICA-05; V- ICA-10.

Figura 6 - Agrupamento de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham. pelo método da ligação média não ponderada (UPGMA), baseado na caracterização agrônômica, de acordo com a dissimilaridade da Distância Euclidiana Média.



Fonte: MELO, 2012.

No agrupamento dos acessos pelo método de otimização de Tocher, o valor de Θ foi de 1,349488. Três grupos foram formados (TAB. 8.): o grupo I contendo 10 acessos; o II, o acesso ICA-05; e o grupo III, formado pelo acesso ICA-10, que apresentou, em quase todos os caracteres, médias inferiores às dos outros acessos.

Tabela 8 - Análise de agrupamento, pelo método de Tocher, a partir dos caracteres agronômicos dos 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham.

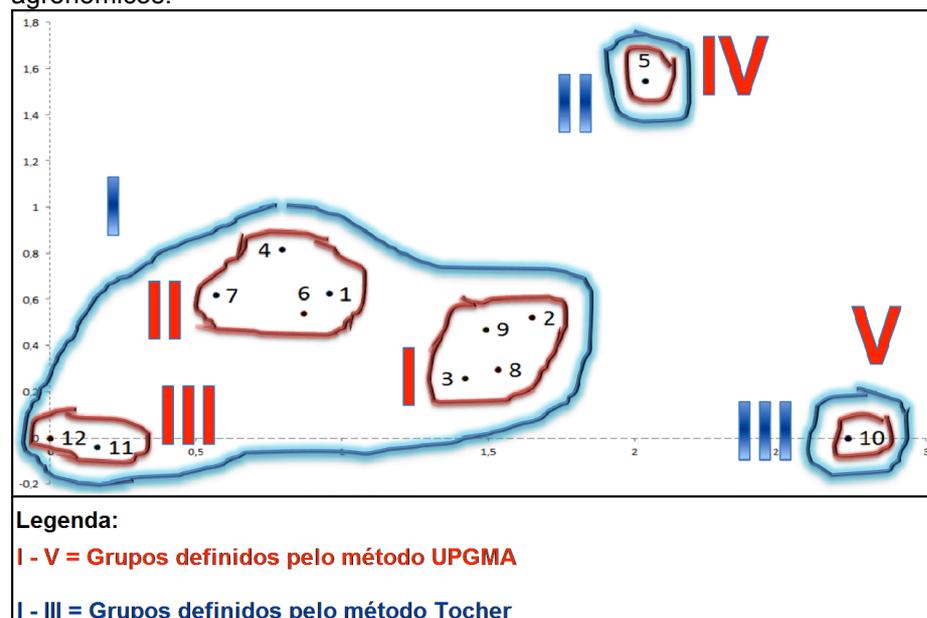
GRUPOS	ACESSOS									
I	ICA-02	ICA-09	ICA-03	ICA-08	ICA-06	ICA-01	ICA-07	ICA-04	ICA-11	ICA-12
II	ICA-05									
III	ICA-10									

Fonte: Montes Claros, 2012. Elaborado pelo autor.

Os dois métodos de agrupamento (UPGMA e Tocher), tanto para a caracterização isoenzimática quanto para a agronômica, apresentaram relativa semelhança na formação dos grupos de acessos de *L. sidoides*. Observa-se também que o método UPGMA formou grupos dentro daqueles formados pelo método de Tocher. Assim, a utilização concomitante desses dois métodos é importante, por permitir a divisão dos acessos em grupos (formados pela técnica de Tocher) e subgrupos (formados pela técnica UPGMA). Vale ressaltar que essa união se torna cada vez mais relevante quando o estudo envolve muitos acessos, uma vez que os subgrupos complementam a discussão sobre a formação dos grupos.

A representação gráfica das medidas de dissimilaridade dos caracteres agronômicos em sistema cartesiano encontra-se na FIG. 7.

Figura 7 - Dispersão gráfica e agrupamento de 12 acessos de *Lippia sidoides* Cham., com base nas coordenadas estimadas a partir da matriz de dissimilaridade obtida pela Distância Euclidiana Média de caracteres agronômicos.



Fonte: MELO, 2012.

Nota: 1) ICA-01; 2) ICA-02; 3) ICA-03; 4) ICA-04; 5) ICA-05; 6) ICA-06; 7) ICA-07; 8) ICA-08; 9) ICA-09; 10) ICA-10; 11) ICA-11; 12) ICA-12

De acordo com as FIG. 5 e 7, percebe-se que acessos de uma mesma região apresentaram significativa divergência genética. Como exemplo, os acessos ICA-10, ICA-11 e ICA-12, provenientes do município de Buenópolis, estão mais próximos, geneticamente, de outros acessos do que de si mesmos (FIG. 5.). Esses resultados evidenciam alta variabilidade dentro das populações e, conseqüentemente, sugerem a necessidade de estudos de genética de populações. Esses resultados são semelhantes aos observados em *Machaerium villosum* (BOTREL; CARVALHO, 2004), em *Stryphnodendron adstringens* (GLASENAPP, 2007), em *Copaifera langsdorffii* (MARTINS *et al.*, 2008) e em *Caryocar brasiliensis* (MELO JÚNIOR *et al.*, 2004). Esses últimos autores sugerem que esses altos índices de diversidade se referem à existência de seleção em favor dos heterozigotos e, conseqüentemente, baixa endogamia nas populações.

A presente pesquisa é um estudo inicial e novos trabalhos ainda devem ser realizados para melhor descrição das populações amostradas.

3.4 Correlação entre as estimativas de divergência genética

A correlação entre as matrizes de dissimilaridade, obtidas pelo índice de Jaccard (padrões isoenzimáticos) e pela Distância Euclidiana Média (caracteres agronômicos), se mostrou baixa (0,1124) e não significativa ($p > 0,05$), indicando que, estatisticamente, as duas estimativas de divergência genética não se correlacionam. De acordo com Vieira *et al.* (2005), esse resultado pode ser explicado pelo fato de que grande parte da variação detectada pelos marcadores moleculares é do tipo não adaptativa, não sendo sujeita à seleção, ao contrário dos caracteres agronômicos, que estão sujeitos à seleção natural e à influência do ambiente.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, afirma-se que *Lippia sidoides* é uma espécie alógama facultativa.

Observa-se grande variabilidade genética entre os acessos amostrados.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A.C.; DUZI, A.; ZERBINI JÚNIOR, F.M.; ROBINSON, I.P.; MICALES, J.A.; OLIVERIA, J.R.; DIAS, L.A.S.; SCORTICHINI, M.; PEREIRA, M.C.B.; BONDE, R.B.; ALONSO, S.K.; JUNGHANS, T.G.; BRUNE, W.; **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006, 627 p.

ALMEIDA, O.S. **Biologia floral tendências reprodutivas e efeito alelopático da tulase (*Ocimum sanctum* L.)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Vitória da Conquista, UESB, 2007. 88 p.

ALMEIDA, A.C.; SOBRINHO, E.M.; PINHO, L.; NERY, P.S.S.; MARTINS, E.R.; DUARTE, E.R.; SANTOS, H.O.; BRANDI, I.V.; CANGUSSU, A.S.; COSTA, J.P.R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural**, Santa Maria, 2009.

ALVES, M.C.S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1083-1086, Brasília, DF, 2004.

ARAÚJO, L. D. A.; QUIRINO, Z.G.M.; MACHADO, I.C. Fenologia reprodutiva e polinização de *Allamanda blanchetii*. **Revista Brasileira de Botânica**, V.34, n.2, p.211-222, São Paulo, 2011.

ARRIGONI-BLANK, M. F. SILVA-MANN, R. P.; CAMPOS, D. A.; SILVA, P. A.; ANTONIOLLI, A. R.; CAETANO, L. C. SANTANA, A. E. G.; BLANK, A. F. Morphological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L. Poit) germplasm. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 298-303, João Pessoa, 2005.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. Cultura de tecidos e transformação de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI, p. 261-296, 1998.

ATLAS DE ZONEAMENTO AGROCLIMÁTICO DO ESTADO DE MG. **Mapa de precipitação total anual**. Plano diretor de agricultura irrigada do Estado de Minas Gerais. Escala 1:3.500.000. 2002.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FUNEP, 237p. 2006.

BENINCASA, M.M.P. **Análise do crescimento de plantas**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42 p.

BERTONI, B. W. **Propagação, variabilidade genética e química de *Zeyheria montana* Mart.** Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, São Paulo. 2003. 165p.

BLANK, A. F.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; SANTOS NETO, A. L.; ALVES, P. B.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. C. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjerição e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 113-116, Brasília. 2004.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 5.ed. rev. e ampl – Viçosa : UFV, 2009. 529p.

BOTELHO, M. A.; BEZERRA-FILHO, J. G.; CORREIA, L. L.; FONSECA, S. G. C.; MONTENEGRO, D.; GAPSKI, R.; BRITO, G. A. C.; HEUKELBACH, J. A novel mouthrinse without alcohol based on *Lippia sidoides* essential oil: a double-blinded randomized controlled trial. **Journal of Applied Oral Science**, v. 15, p. 175-180, Bauru. 2007a.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 3, p.349-356, Ribeirão Preto. 2007b.

BOTREL, M.C.G.; CARVALHO, D. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasileira de Botânica**. 4:621-627. 2004.

BROWN, A.H.D., BRIGGS, J.D. Sampling strategies for genetic variation in ex situ collections of endangered plant species. In: Falk, D.A., Holsinger, K.E. (eds.) **Genetics and conservation of rare plants**. New York: Oxford Univ. Press, p.99-119. 1991.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, Technique & Documentation**. 2.ed. France: Lavoisier Publishing, 1119 p. 1999.

CALDEIRA JÚNIOR, C.F.; ROCHA, S.L.; SANTOS, W.G. dos; PAULA, T.O.M. de; SANTOS, A.M.; ARAÚJO, C.B.; MARTINS, E.R.; LOPES, P.S.N. Ecogeografia e etnobotânica do *Caryocar brasiliensis* no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl. 1, p. 477-479, 2007.

CAMPOS TELLES, M.P.; COELHO, A.S.G.; LÁZARO, J.C.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; VALVA F. D'AYALA. Genetic diversity and population of *Eugenia dysenterica* DC. ("cagaita" – Myrtaceae) in Central Brazil: Spatial analysis and implications for conservation and management. **Conservation Genetics**, v.4, p.685-695, 2003.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos**. 2006. 83f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

CARVALHO JÚNIOR, W.G.O.; MELO, M.T.P.; MARTINS, E.R. Comprimento da estaca no desenvolvimento de mudas de alecrim-pimenta. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.7, p. 2199-2202, out, 2009b.

CARVALHO JÚNIOR, W.G.O.; MELO, M.T.P.; MARTINS, E.R. Influência do horário de coleta de estacas e da nebulização intermitente na propagação vegetativa de alecrim-pimenta. **Centro Científico Conhecer – ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Goiânia, vol.5, n.8, 2009a.

CARVALHO JÚNIOR, W.G.O.; MELO, M.T.P.; MARTINS, E.R. Fenologia do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em área de Cerrado, no norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.2, p.223-229, 2011.

CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M.I.L.; BANTIM, M.B.; RABELO, E.F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. Mem. **Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 98, n.4, p. 569-571, Rio de Janeiro. 2003.

CARVALHO, M.F.; ALBUQUERQUE JUNIOR, C.L.; GUIDOLIN, A.F.; FARIAS, F.L. Aplicação da análise multivariada em avaliações de divergência genética através de marcadores moleculares dominantes em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p.339-346, Botucatu, 2009.

CASTRO, H.G., CASALI, V.W.D., BARBOSA, L.C.A., CECON, P.R. Rendimento de tanino em dois acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala* D.C.) em diferentes épocas de colheita em Viçosa-MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.1, n.2, p.29-33, Botucatu, 1999.

CAVALCANTI, E.S.B.; MORAIS, S.M.; LIMA, M.A.A.; SANTANA, E.W.P. - Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. Mem. **Instituto Oswaldo Cruz**, 98: 541-544. Rio de Janeiro, 2004.

CORRÊA JÚNIOR, C. Influência das adubações orgânica e química na produção de camomila *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert e do seu óleo essencial (p.129-163) In: **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. v.1. coord. MING, L.C., SCHEFFER, M.C., CORRÊA JÚNIOR, C., BARROS, I.B.I., MATTOS, J.K.A Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1998. 217p.

CORREIA, J.R. Solos, paisagem e conservação da biodiversidade do Cerrado. In: IORIS, E. **Plantas Mediciniais do Cerrado: perspectivas**

comunitárias para a saúde, o meio ambiente e o desenvolvimento sustentável. Mineiros, p127-48. 1999.

COSTA, S.M.; LEMOS, T.L.; PESSOA, O.D.; PESSOA, C.; MONTENEGRO, R.C.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. **Journal of Natural Products.** 64: 792-795. 2001.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 15, n. 4, p. 304-309, João Pessoa, 2005.

CRUDEN, R.W. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution**, n. 31, p. 32-46, 1977.

CRUZ, C.D. **Programa GENES: Diversidade Genética.** Viçosa. Ed. UFV. 2008. 278p.

DANNER, M.A.; CITADIN, I.; SASSO, S.A.Z.; TOMAZONI, J.C. Diagnóstico ecogeográfico da ocorrência de jaboticabeiras nativas no sudoeste do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura.** vol.32, n.3, p. 746-753. Jaboticabal, 2010.

EHLERT, P. A. D.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; PAULA, J. W. A.; CAMPOS, D. A.; ALVIANO, C. S. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 2, p. 79-80, Botucatu, 2006.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. **Propagação de plantas frutíferas.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 102 p. 2007.

FERNANDES, L.P.; CANDIDO, R.C.; OLIVEIRA, W.P. Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. **Food Bioprod Process.** 2011.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética.** Embrapa, Cenargem, Brasília, DF. 220p. 1995.

FIGUEIREDO, L. S.; BONFIM, F. P. G.; FERRAZ, E. O.; CASTRO, C. E.; SOUZA, M. F.; MARTINS, E. R. Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) em leite com umidade controlada. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 33-36, 2009a.

FIGUEIREDO, L.S.; BONFIM, F.P.G.; SIQUEIRA, C.S.; FONSECA, M.M.; SILVA, A.H.; MARTINS, E.R. Efeito da época de colheita na produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.2, p.154-158, 2009b.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G. R.; NASCIMENTO, N. R. F.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 59, p. 934 – 940, 2007.

GIACOMETTI, D. Conservación de recursos fitogenéticos. In: CONTRERAS, A., ESQUINAS ALCÁZAR, J. (ed.). **Anales Simposio Recursos Fitogenéticos**. Valdivia, Chile: UACH-IBPGR, p.167-173. 1984.

GIRÃO, V.C.C., NUNES-PINHEIRO, D.C.S., MORAIS, S.M., GIOSO, M.A. Efeito protetor do extrato etanólico de *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) nas gengivites marginais de cães. **Ciência Animal**, v. 11, n. 1, p.13-17, Goiânia. 2001.

GLASENAPP, J.S. **Estrutura genética e fenóis totais de populações naturais de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. 2007. 84 p.

GOEDERT, C.O. Histórico e Avanços em Recursos Genéticos no Brasil. In: NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos Vegetais e Biotecnologia, 2007.

GONÇALVES, A.C.; VIEIRA, F.A.; REIS, C.A.F.; CARVALHO, D. Conservação de *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae) baseada na estrutura genética de populações naturais. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.34, n.1, p.95-101, 2010

GUARINO, L. Assessing the treath of genetic erosion. In: Guarino, L.; Rhao, V.R.; Reid, R. (eds.). *Collecting plant genetic diversity - technical guidelines*. Rome: **IPGRI-IUCN-FAO**, 1995. p.67-69.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre:UFSC. 2003.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES J. R.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.

HUNT, R. **Basic growth analysis: plant growth analysis for beginners**. London: U. Hyman, 1989. 112p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de biomas do Brasil**: Primeira aproximação. Rio de Janeiro: IBGE. Escala 1:5.000.000. 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de clima do Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE. Escala 1:5.000.000. 2002.

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

JUGRAN, A.; BHATT, I.D.; RAWAT, S.; GIRI, L.; RAWAL, R.S.; DHAR, U. Genetic diversity and differentiation in *Hedychium spicatum*, a valuable medicinal plant of Indian Himalaya. **Biochemical Genetics**, 49:806-818, 2011.

KRIECK, C.; FINATTO, T.; MÜLLER, T. S.; GUERRA, M. P.; ORTH, A. I. Biologia reprodutiva de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm. (Zingiberaceae) em Florianópolis, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.2, p.103-110, 2008.

LEMONS, T. L. G.; MATOS, F. J.A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A. Antimicrobial activity of essential oil of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v. 4, n. 2, p. 82-84, 1990.

LOPES, R.C.; CASALI, V.W.D.; BARBOSA, L.C.A.; CECON, P.R. Caracterização isoenzimática de oito acessos de Erva-de-bicho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 433-437, 2003.

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

MACAMBIRA, L.M.A.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; CRAVEIRO, A.A.; BRAZ-FILHO, R. Naphtoquinoids from *Lippia sidoides*. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 310-312, 1986.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. 25: 429-438. 2002.

MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M.G. (coord.) **Fisiologia vegetal**. 2ª ed. São Paulo: EDUSP. v.1, p. 333-50. 1985.

MARTINS, E.R. **Conservação da poaia (*Psychotria ipecacuanha*): coleta, ecogeografia, variabilidade genética e caracterização reprodutiva**. Tese

(Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense – Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, 2000. 108p.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 2000. 220 p.

MARTINS, E.R.; OLIVEIRA, L.O.; MAIA, J.T.L.S.; VIEIRA, I.J.C. Estudo ecogeográfico da poaia (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 11(1) p. 24-32. Botucatu. 2009.

MARTINS, K.; SANTOS, J.D.; GAIOTTO, F.A.; MORENO, M.A.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinoideae) em fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.1, p.61-69, 2008.

MATOS, F. J. A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. – Farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 79, n.3/4, p. 84-87, São Paulo.1998.

MAXTED, N., K. PAINTING E L. GUARINO. **Ecogeographic surveys**. Material de formação. International Plant Genetic Resources Institute, Itália. 54p. 1997.

MEDEIROS, M.G.F. de; SILVA, A.C.; CITÓ, A.M.G.L.; BORGES, A.R.; LIMA, S.G.; LOPES, J.A.D.L.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**. 60, 237–241. 2011.

MELO JÚNIOR, A.F.; de CARVALHO, D.; PÓVOA, J.S.R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**, n.66, p.56-65, 2004.

MELO, M. T. P.; CARVALHO JÚNIOR, W. G. O.; SOUZA, M. F.; FIGUEIREDO, L.S.; MARTINS, E.R. Produção de fitomassa e teor de óleo essencial de folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em diferentes espaçamentos de plantio. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.13, n.2, p.230-234, 2011a.

MELO, M.T.P.; RIBEIRO, J.M.; MEIRA, M.R.; FIGUEIREDO, L.S.; MARTINS, E.R. Teor de óleo essencial de alecrim-pimenta em função do horário de colheita. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.7, p.1166-1169, 2011b.

MELO JÚNIOR, A.F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J.S.R.; BEAZORTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis** 66:56-65. 2004.

MENDONÇA, V.L.; FONTELES, M.C.; AGUIAR, L;M.B.A; CRAVEIRO, AA . Toxidade e alergenicidade do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham para

utilização em cosméticos, aerosol e cosméticos, 12(67), **encarte técnico ano XII**, n 67, p10-16. 1990.

MING, L. C. Adubação orgânica no cultivo de *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Br. Verbenaceae. In: MING, L.C., SCHEFFER, M.C., CORRÊA JÚNIOR, C., BARROS, I.B.I., MATTOS, J.K.A. **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Botucatu: UNESP. p.165-191. 1998.

MING, L. C.; SILVA, S. M. P.; SILVA, M. A. S.; HIDALGO, A. F.; MARCHESE, J. A.; CHAVES, F. C. M. Manejo e cultivo de plantas medicinais: algumas reflexões sobre perspectivas e necessidades no Brasil. In: **Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais**. Cuiabá: Unicen, p.149-156. 2003.

MONTEIRO, M. V. B.; de MELO LEITE, A. K. R.; BERTINI, L. M.; de MORAIS, S. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 378–382, 2007.

MOREIRA, J.A.N., SANTOS, J.W., OLIVEIRA, S.R.M. **Abordagens e metodologias para avaliação de germoplasma**. Brasília: EMBRAPA-CNPA, 1994. 115p.

MOREIRA, J.S.; ALMEIDA, R.G.; TAVARES, L.S.; SANTOS, M.O.; VICCINI, L.F.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; RAPOSO, N.R.B.; DIAS, S.C.; FRANCO, O.L. Identification of Botryticidal Proteins with Similarity to NBS–LRR Proteins in Rosemary Pepper (*Lippia sidoides* Cham.) Flowers. **Protein Journal** 30:32–38. 2011

OLIVEIRA, T.C. **Caracterização e comportamento de acessos de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* cham.) mantidos em banco ativo de germoplasma em São Cristóvão – SE**. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. 2008. 100p.

OLIVEIRA, J.E.Z.; AMARAL, C.L.F.; CASALI, V.W.D. Recursos genéticos e perspectivas do melhoramento de plantas medicinais. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Petrolina-PE: Embrapa Semiárido / Brasília-DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999

OLIVEIRA, F. P.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 510-516, João Pessoa. 2006.

OLIVEIRA, G. L.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R.; COSTA, C. A. Enraizamento de estacas de *Lippia sidoides* Cham. utilizando diferentes

tipos de estacas, substratos e concentrações do ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 4, p. 12-17, Botucatu. 2008a.

OLIVEIRA, L.O., MARTINS, E.R. **O desafio das plantas medicinais brasileiras: I - o caso da poaia (*Cephaelis ipecacuanha*)**. Campos dos Goytacazes: UENF-FENORTE, 1998. 73p.

OLIVEIRA, L.O.; MARTINS, E.R. A quantitative assessment of genetic erosion in ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). **Genetic Resources and Crop Evolution** 49:607-617. 2002.

OLIVEIRA, A.C.B.; SEDIYAMA, M.A.N.; SEDIYAMA, T.; FINGER, F.L.; CRUZ, C.D. Variabilidade genética em batata-doce com base em marcadores isoenzimáticos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 576-582, 2002.

OLIVEIRA, O. R.; TERAQ, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; INNECCO, R.; ALBUQUERQUE, C. C. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 94-100, 2008b.

PIRES, M.J.P.; GRIPP, A. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais em banco ativo de germoplasma. **Acta Amazônica**. 18: 61-73. Manaus. 1988.

POGGIANI, F.; SUITER, W. Importância da nebulização intermitente e efeito do tratamento hormonal na formação de raízes em estacas de eucalipto. **IPEF**, Piracicaba, n. 9, p. 119-29, 1974.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: E. Rodrigues, 327 p. 2001.

RAMÍREZ, N. Biología reproductiva de *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke (Verbenaceae) en los llanos centrales de Venezuela. **Acta Botánica Venezolana**, 30 (1): 385-414. 2007.

RADÜNZ, L. L.; MELO, E. C.; BERBERT, P.A.; DE GRANDI, A. M.; ROCHA, R. P. Efeito da temperatura do ar de secagem sobre a qualidade do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham). **R. Bras. Armaz.**, Viçosa, V.27, n.2, p09-13, 2002a.

RADÜNZ, L.L.; MELO, E.C.; MARTINS, P.M.; SANTOS, R.H.S.; SANTOS, R.R.; MACHADO, M.C. Secagem de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*, Cham.) em secador de leito fixo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.5, n.1, p.79-82, Botucatu. 2002b.

REIS, F.B. **Bioconservação de pescado (surubim *Pseudoplatystoma* sp) com utilização da bactéria láctica bacteriocinogênica de extratos vegetais de alecrim pimenta**. Dissertação (Mestrado em Biociências

Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto – SP. 2009. 95p. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-28022010-202600/> Acesso em: 27 jun. 2010.

REIS, M.S.; MARIOT, A. Diversidade Natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2a ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2000. p. 39-60.

REIS, M.S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre:UFSC. 2003.

RIBEIRO, A.C.; GONTIJO, P.T.G.; ALVAREZ V., V.H. (Ed.) **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais — 5ª aproximação**. Viçosa, Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 359p. 1999.

RIBEIRO JÚNIOR, J.I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: UFV, 301p. 2001.

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Universidade Federal de Viçosa:UFV, p.329-380, 2006.

RODRIGUES, I.S.C.; TAVARES, V.N.; PEREIRA, S.L.S.; COSTA, F.N. Antiplaque and antigingivitis effect of *Lippia Sidoides*: a double-blind clinical study in humans. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 17, n. 5, 2009.

SANTOS, M. J. L.; MACHADO, I. C. Biologia floral e heterostilia em *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (Clusiaceae). **Acta Botânica Brasileira**, 12(3): 451-464. São Paulo. 1999.

SCHEFFER, M.C. Influência da adubação orgânica sobre a biomassa, o rendimento e a composição do óleo essencial de *Achillea millefolium* L. mil-folhas. In: MING, L.C., SCHEFFER, M.C., CORRÊA JÚNIOR, C., BARROS, I.B.I., MATTOS, J.K.A. **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Botucatu: UNESP, p1-22. 1998.

SCHEFFER, M.C.; MING, L.C.; ARAÚJO, A.J. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: **Simposio sobre Recursos Genéticos do Semiárido**. Embrapa -Semi-Arido, Petrolina, PE (in press). 1998.

SHAW, C.R.; PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes - A compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, 4: 297–320. 1970.

SIQUEIRA, V.M.; CONTI, R.; ARAÚJO, J.M.; SOUZA-MOTTA, C.M. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**. 53:89–95. 2011

SILVA, M.I.G.; GONDIM, A.P.S.; NUNES I.F.S.; SOUSA F.C.F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16: 455-462, João Pessoa. 2006.

SILVA, E.F.; MARTINS, L.S.S.; OLIVEIRA, V.R. Diversity and genetic structure in cajá tree (*Spondias mombin* L.) populations in northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 1, p. 171-181, 2009a.

SILVA, A.C.; SALES, N.L.P.; ARAUJO, A.V.; CALDEIRA JUNIOR, C.F. Efeito in vitro de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz: isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, 2009b.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. **Plantas Medicinais e Aromáticas: Pós colheita e óleos essenciais**. Viçosa: UFV, 135p, 2000.

SMITH, S.E., JOHNSON, D.W., CONTA, D.M., HOTCHKISS, J.R. Using climatological, geographical, and taxonomic information to identify sources of mature plant salt tolerance in alfafa. **Crop Science**, 34:690-694. 1994

SOUZA, M. F.; GOMES, P. A.; SOUZA JUNIOR, I. T.; FONSECA, M. M.; SIQUEIRA, C. S.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R. Influência do sombreamento na produção de fitomassa e óleo essencial em alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 108-110, 2007.

SOUZA, G.A.; MARTINS, E.R. Análise de risco de erosão genética de populações de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.6, p.42-47, Botucatu. 2004.

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae): A literature review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 471-485, 1996.

TOMLINSON, T. R.; AKERELE, O. **Medicinal plants: their role in health and biodiversity**. Philadelphia, University of Pennsylvania, 1998. 221p.

VELÁSQUEZ-ARENAS, R.; IMERY-BUIZA, J. Fenología reproductiva y anatomía floral de las plantas *Aloe vera* y *Aloe saponaria* (Aloaceae) en Cumaná, Venezuela **Revista de Biología Tropical** (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) Vol. 56 (3): 1109-1125. 2008

VIEIRA, E.D.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; BENIN, G.; ZIMMER, P.D.; SILVA, J.A.G.; MARTINS, A.F.; BERTAN, I.; SILVA, G.O.; SCHMIDT, D.A.M. Comparação entre medidas de distância genealógica, morfológica e molecular em aveia, em experimentos com e sem a aplicação de fungicida. **Bragantia**, Campinas, v.64, n.1, p.51-60, 2005.

VIEIRA, R. F.; SILVA, S. R. **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas, Resultados da 1ª reunião técnica**. EMBRAPA/IBAMA, CNPq, Brasília, 2002. 184 p.

WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T.B.; BIANCHETTI, L.B. Princípios sobre coleta de germoplasma vegetal. In: NASS, L.L. (ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 858p. 2007.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia desynerica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Vegetal), ESALQ, Piracicaba-SP, 2002. 130p.