



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS  
GENÉTICOS VEGETAIS**

**EMILY VERÔNICA ROSA DA SILVA FEIJÓ**

**CARACTERIZAÇÃO ECOGEOGRÁFICA, MORFO-  
AGRONÔMICA, MOLECULAR E FITOQUÍMICA DE  
ACESSOS DE *Lippia origanoides* Kunth. OCORRENTES NO  
ESTADO DA BAHIA**

Feira de Santana – BA  
2018

**EMILY VERÔNICA ROSA DA SILVA FEIJÓ**

**CARACTERIZAÇÃO ECOGEOGRÁFICA, MORFO-  
AGRONÔMICA, MOLECULAR E FITOQUÍMICA DE  
ACESSOS DE *Lippia origanoides* Kunth. OCORRENTES NO  
ESTADO DA BAHIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angélica Maria Lucchese

Feira de Santana – BA

2018

### Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

F328c Feijó, Emily Verônica Rosa da Silva  
Caracterização ecogeográfica, morfo-agronômica, molecular e fitoquímica de acesso de *Lippia origanoides* Kunth. ocorrentes no Estado da Bahia./ Emily Verônica Rosa da Silva Feijó, 2018.  
166f.: il.

Orientador: Lenaldo Muniz de Oliveira  
Coorientadora: Angélica Maria Lucchese

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana.  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2018.

1.Lippia. 2.Verbenaceae. 3.Planta medicinal nativa. 4.Recursos genéticos vegetais. I.Oliveira, Lenaldo Muniz de,orient. II.Lucchese, Angélica Maria, coorient. III.Universidade Estadual de Feira de Santana. IV.Título.

CDU: 582.949.1

**BANCA EXAMINADORA**

*Ariana Reis Messias F. de Oliveira*

**Profa. Dra. Ariana Reis Messias Fernandes  
(Instituto Federal Baiano)**

*Alessandra Selbach Schnadelbach*

**Profa. Dra. Alessandra Selbach Schnadelbach  
(Universidade Federal da Bahia)**

*Antonio de Oliveira Costa Neto*

**Prof. Dr. Antônio de Oliveira Costa Neto  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)**

*Marilza Neves do Nascimento Ribeiro*

**Profa. Dra. Marilza Neves do Nascimento Ribeiro  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)**

*Lenaldo Muniz de Oliveira*

**Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)  
Orientador e Presidente da Banca**

**Feira de Santana – BA**

**2018**

*Ao meu esposo Gledson, minha mãe Generosa e toda minha família, pela paciência e apoio durante a realização desse trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço em primeiro lugar ao Deus Trino, que me chamou a existência e sempre fez em minha vida “o inacreditável”. Apesar de todas as dificuldades que passei nessa etapa, sei que o seu propósito é maior, e tudo isso contribuiu para o meu bem!
- Agradeço ao meu esposo, Gledson, por me auxiliar em tudo o que precisei sempre com muito amor, e principalmente, paciência.
- Agradeço a minha família, minha mãe, irmãos e sogros, pelo apoio e incentivo constante ao longo da vida, especialmente durante o doutorado.
- Agradeço a Professora Larissa pela carta de recomendação, e também a Ariana por ter me indicado o Professor Lenaldo como orientador.
- Agradeço ao Professor Lenaldo pela oportunidade que ele me deu, a excelente orientação, confiança, e principalmente, compreensão quando eu mais precisei.
- Agradeço a Professora Angélica pela co-orientação, ajuda, compreensão e muitas contribuições feitas na realização desse trabalho.
- Agradeço aos professores Cássio van dem Berg, Tânia Regina dos Santos Silva e Maurício Lôrdelo pela ajuda, disponibilidade e contribuições, fundamentais para o sucesso dessa pesquisa.
- Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade e apoio.
- Agradeço aos colegas, Anderson e Marisol, pela ajuda nas coletas e experimentos.
- Agradeço a Vanessa e Taiara, pela ajuda na realização dos experimentos de campo e análises estatísticas.
- Agradeço a minha amiga Bárbara, que me auxiliou na parte de caracterização molecular e foi minha amiga para todas as horas.
- Agradeço aos amigos Iasmim, João e Luma por toda ajuda que me deram.
- Agradeço aos técnicos do Lamol, Daniele e Evandro, e as técnicas do Lapron, Edna e Serly, por todo auxílio e trabalho prestados.
- Agradeço a Neta, por ter me recebido no pensionato da melhor forma possível, e também a todas moradoras do pensionato pela amizade e companhia.
- Agradeço aos colegas de turma, pelas trocas de experiências e amizade, especialmente a Carla e Keyla.
- Agradeço a Fapesb pela concessão da bolsa, permitindo que eu realizasse esse sonho.
- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Finance Code 001)
- Agradeço a força e apoio que recebi dos meus grandes amigos para a vida toda, Luíza, Lucas, Alezânia, Sara, Soraia e Erlande.
- Enfim, agradeço a todos os envolvidos que contribuíram de forma direta ou indireta na realização dessa pesquisa. Muito obrigada!

*Tu és digno, Senhor e Deus nosso, de receber a glória, a honra e o poder, porque todas as coisas tu criaste, sim por causa da tua vontade vieram a existir e foram criadas.*

*Apocalipse, 4.11*

*Pois, Nele [Jesus], foram criadas todas as coisas, nos céus e sobre a terra, as visíveis e invisíveis, sejam tronos, soberanias, poderes ou autoridades. Tudo foi criado por meio Dele e para Ele. Ele é antes de todas as coisas. Nele, tudo subsiste.*

*Colossenses, 1.16:17*

*Envias o Teu Espírito, e toda a vida é recriada, e, assim, renovas a face da terra.*

*Salmos, 104.29*

## RESUMO GERAL

*Lippia organoides* Kunth. é uma planta medicinal que ocorre no Brasil, do Maranhão até Minas Gerais, sendo conhecida como "salva-de-marajó e "alecrim-d'angola". A importância medicinal da espécie é devido a presença de óleos essenciais, que tiveram diversas ações biológicas comprovadas, como a ação antimicrobiana, antiviral e antioxidante. A produção fitoquímica diferenciada da espécie abre várias possibilidades de aplicação da mesma. Apesar disso, o conhecimento sobre a variabilidade da espécie é escasso e sua obtenção é feita por extrativismo, situação que pode levar a erosão genética. Assim como nos demais recursos genéticos vegetais, são relevantes medidas de caracterização e conservação de germoplasma de *L. organoides*. O objetivo geral desse trabalho foi caracterizar aspectos ecogeográficos, morfo-agronômicos, moleculares e fitoquímicos de acessos da espécie *L. organoides* Kunth. ocorrentes no Estado da Bahia. No capítulo I foi realizada a caracterização ecogeográfica e fitoquímica de 19 acessos da espécie e averiguada a relação entre as características ambientais com a composição química dos óleos essenciais. Os resultados mostraram que a espécie ocorre predominante na Caatinga, áreas antropizadas e zonas do clima Tropical Brasil Central. *L. organoides* foi encontrada em solos com níveis nutricionais distintos. Foram identificados quimiotipos conhecidos da espécie, como aqueles ricos em carvacrol, timol e E-nerolidol, além de genótipos ricos em cânfora, elemenol, E-cariofileno, linalol e acetato de linalol, ainda desconhecidos para a espécie. No capítulo II foi realizada a caracterização morfo-agronômica de 12 acessos da espécie coletados em diferentes regiões e mantidos em ambiente de cultivo. Foram verificadas variações na cor das pétalas e formato foliar e diferenças significativas para as variáveis quantitativas comprimento da folha, largura da folha, relação comprimento/largura, área foliar, massa fresca e seca de folhas, teor e rendimento de óleos essenciais. Nas análises de agrupamento os acessos foram separados em quatro grupos de acordo com a proximidade geográfica. Os acessos LO010, LO007 e LO012 apresentaram os maiores valores na produção de óleo essencial. No capítulo III foram analisados os níveis de diversidade e estruturação genética e o relacionamento das populações de *L. organoides* ocorrentes no Estado da Bahia, através do uso de marcadores moleculares ISSR. De acordo com os parâmetros de diversidade avaliados o nível de diversidade genética é baixo na região percorrida e as populações mais diversas estão situadas na Chapada Diamantina. Os resultados do *Fst* (0,19) e AMOVA (31%) indicaram estruturação genética interpopulacional de moderada a alta. O dendrograma gerado, a análise no STRUCTURE e

PCoA indicaram a possibilidade de separação das 18 populações em quatro grupos. No capítulo IV foi determinada a composição química dos óleos essenciais de 12 genótipos de *L. origanoides*, coletados em lugares distintos e cultivados sob as mesmas condições edafoclimáticas. Os resultados permitiram classificar os genótipos em quatro grupos de acordo com os compostos majoritários: grupo 1- timol e carvacrol, grupo 2 - cânfora, grupo 3 - E-cariofileno e grupo 4 - cinamato de metila. A mesma formação foi vista pela análise das variáveis canônicas. Os dados obtidos nessa pesquisa evidenciam a diversidade intraespecífica de *L. origanoides* na área percorrida, tanto nos aspectos morfoagronômico, genético e fitoquímico, além de mostrar em quais condições ambientais a espécie ocorre espontaneamente. Com base nessas informações é possível desenvolver estratégias de conservação e uso eficaz desse recurso genético vegetal.

**Palavras-chave:** *Lippia*. Verbenaceae. Planta Medicinal Nativa. Recursos Genéticos Vegetais.

## ABSTRACT

*Lippia origanoides* Kunth. is a medicinal plant occurring in Brazil, from Maranhão to Minas Gerais, where is known as "salva-de-marajó" and "alecrim-d'angola". Its medical importance is related to the presence of essential oils that are proved to present diverse biologic actions, such as antimicrobial, antiviral and antioxidant activity. The differentiated phytochemical production of this species allows many applications. However, the knowledge about its variability is scarce and it is obtained by extractivism, which can lead to genetic erosion. Thus, as in other plant genetic resources, measures of characterization and conservation of *L. origanoides* germplasm are relevant. The main aim of this work was to characterize ecogeographic, morpho-agronomic, molecular, and phytochemical aspects of *L. origanoides* Kunth. samples occurring in the state of Bahia. In the first chapter, we present the ecogeographic and phytochemical characterization of 19 samples, analyzing the relationship among environmental characteristics and chemical composition of essential oils. The results showed that the species occurs predominantly in Caatinga, anthropic areas and Tropical Central Brazil climate zones. *L. origanoides* was found in soils with distinct nutritional levels. Chemotypes previously known for this species were identified, such as carvacrol, thymol and E-nerolidol. Besides, we also found genotypes rich in camphor, elemenol, E-caryophyllene, linalol and linalol acetate, which were still unknown for the species. In the second chapter, we performed the morpho-agronomical characterization of 12 cultivated samples that were collected from different regions. Variation in petals color, leaf format and significant differences for quantitative variables of leaf length and width, width/length ratio, leaf area, fresh and dry mass, as well as the content and yield of essential oils were verified. In grouping analysis, samples were segregated in four groups according to its geographic proximity. The samples LO010, LO007 and LO012 showed the highest values in essential oils production. In the third chapter, levels of diversity and genetic structure, as well as relationship among *L. origanoides* populations occurring in Bahia state were evaluated through ISSR molecular markers. According to the analyzed diversity parameters, there is a low level of genetic diversity in the evaluated region and the most diverse populations are in Chapada Diamantina. Results of *Fst* (0,19) and AMOVA (31%) indicated moderate to high inter-population genetic structuring. The dendrogram, STRUCTURE analysis and PCoA indicated the possibility of distributing the 18 populations in four groups. In the fourth chapter, the composition of essential oils of 12 genotypes of *L. origanoides* from distinct places and cultivated under

similar climate and soil conditions was determined. The results allow to classify genotypes in four groups according to its majoritarian compounds: group 1- thymol and carvacrol; group 2 – camphor; group 3 - E-caryophyllene and group 4 – methyl cinnamate. The same formation was found in the analysis of canonical variables. The data obtained in this research evidenced the intraspecific diversity of *L. origanoides* in the area covered, both in the morphoagronomic, genetic and phytochemical aspects, besides showing in which environmental conditions the species occurs spontaneously. Based on this information, it is possible to develop conservation strategies and effective use of this plant genetic resource.

**Key-words:** *Lippia*. Verbenaceae. Native Medicinal Plant. Vegetal Genetic Resources.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1. Coordenadas geográficas e altitude dos sítios de coleta dos acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados nos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, Bahia, 2018.....50
- Tabela 2. Temperatura média anual, pluviosidade média anual e classificação dos solos de dezenove sítios de ocorrência natural de *Lippia origanoides* Kunth. nos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, Bahia, 2018.....52
- Tabela 3. Análise química do solo dos diferentes sítios de coleta dos acessos de *Lippia origanoides* Kunth. nos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, Bahia, 2018.....58
- Tabela 4. Índice de Kovats e percentual dos compostos identificados dos óleos essenciais obtidos de populações naturais de *Lippia origanoides* Kunth. coletadas nos Estados da Bahia e Pernambuco, classificados como quimiotipo rico em carvacrol. Feira de Santana, Bahia, 2018.....62
- Tabela 5. Índice de Kovats e percentual dos compostos identificados dos óleos essenciais obtidos de populações naturais de *Lippia origanoides* Kunth. coletadas nos Estados da Bahia e Pernambuco, classificados como quimiotipo rico em timol e quimiotipo rico em E-nerolidol. Feira de Santana, Bahia, 2018.....64
- Tabela 6. Índice de Kovats e percentual dos compostos identificados dos óleos essenciais obtidos de populações naturais de *Lippia origanoides* Kunth. coletadas nos Estados da Bahia e Pernambuco, que não se enquadram entre os quimiotipos já descritos. Feira de Santana, Bahia, 2018.....67

Tabela 7. Correlação de Pearson do primeiro componente principal (CP1) com as variáveis ambientais e edáficas (pH em água, P – fósforo, K – potássio, Ca – cálcio, Mg – magnésio, Al – alumínio, H\_Al – acidez trocável, Na – sódio, SB – soma de bases trocáveis, CTC – capacidade de troca catiônica, V – saturação por bases, MO – matéria orgânica) obtidas nos sítios de coleta dos 18 acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados nos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, Bahia, 2018.....73

## **CAPÍTULO II**

Tabela 1. Número de identificação, coordenadas geográficas, altitude e municípios dos sítios de coleta dos 12 acessos da coleção de germoplasma de *Lippia origanoides* Kunth. Feira de Santana, Bahia, 2018.....85

Tabela 2. Características morfológicas qualitativas de flores, caules e folhas dos acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados no Estado da Bahia e pertencentes ao Banco de Germoplasma da UEFS. Feira de Santana, Bahia, 2018.....89

Tabela 3. Médias das variáveis, comprimento foliar (CF), largura foliar (LF), razão entre comprimento e largura foliar (C/L), área foliar (AF), teor de óleo essencial (TOE) e rendimento de óleo essencial (ROE) dos acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados no Estado da Bahia. Feira de Santana, Bahia, 2018.....91

Tabela 4. Matriz de dissimilaridade entre os acessos de *Lippia origanoides* Kunth., coletados no Estado da Bahia, baseada na distância generalizada de Mahalanobis obtidos a partir de dez caracteres morfológicos. Feira de Santana, Bahia, 2018.....94

## **CAPÍTULO III**

Tabela 1. Dados de coleta de 18 populações de *Lippia origanoides* Kunth. coletadas em municípios dos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, Bahia, 2018.....109

Tabela 2. Nome, sequência, temperatura de anelamento ( $^{\circ}\text{C}$ ) e número de bandas polimórficas dos primers testados para a análise das 18 populações silvestres de *Lippia origanoides* Kunth. Feira de Santana, Bahia, 2018.....113

Tabela 3. Número de loci polimórficos ( $NLp$ ), percentual de loci polimórficos ( $\%Lp$ ), heterozigosidade média esperada ( $He$ ), índice de diversidade de Shannon ( $I$ ), locus exclusivos ( $LE$ ) e grupo genético ( $GG$ ) para 18 populações silvestres de *Lippia origanoides* Kunth. Feira de Santana, Bahia, 2018.....115

#### **CAPÍTULO IV**

Tabela 1. Número de identificação, coordenadas geográficas, altitude e municípios dos sítios de coleta dos 12 acessos da coleção de germoplasma de *Lippia origanoides* Kunth. Feira de Santana, Bahia, 2018.....133

Tabela 2. Percentual dos compostos encontrados nos óleos essenciais obtidos de 12 genótipos de *Lippia origanoides* Kunth. Feira de Santana, Bahia, 2018.....136

## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Indivíduos da espécie *Lippia origanoides* Kunth. A) Indivíduo no ambiente natural. B) Detalhe da inflorescência. Feira de Santana, Bahia, 2018.....24

### CAPÍTULO I

Figura 1. Mapa de distribuição dos acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados em diferentes municípios dos Estados da Bahia e Pernambuco e biomas correspondentes. Feira de Santana, Bahia, 2018.....53

Figura 2. Mapa de distribuição dos acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados em diferentes municípios dos Estados da Bahia e Pernambuco e tipos de vegetação nos sítios de coleta. Feira de Santana, Bahia, 2018.....54

Figura 3. Mapa de distribuição dos acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados em diferentes municípios dos Estados da Bahia e Pernambuco e tipos de clima correspondentes. Feira de Santana, Bahia, 2018.....56

Figura 4. Ordenação dos componentes a partir da Análise de Componentes Principais (ACP), gerada a partir de 13 variáveis químicas dos solos coletados nos 19 sítios de coleta de *Lippia origanoides* Kunth. nos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, Bahia, 2018.....60

Figura 5. Ordenação dos componentes pela Análise de Componentes Principais (ACP), gerada a partir de 11 variáveis obtidas da análise química dos óleos essenciais oriundos de 18 acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados nos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, Bahia, 2018.....69

Figura 6. Dendrograma formado pelo método Ward, gerado a partir de 11 variáveis

obtidas da análise química dos óleos essenciais oriundos de 18 acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados nos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, Bahia, 2018.....71

## **CAPÍTULO II**

Figura 1. Etapas da propagação e plantio dos acessos da espécie *Lippia origanoides* Kunth. A) Estacas apicais utilizadas na propagação das plantas matrizes. B) Mudanças mantidas na casa de vegetação. C) Muda transplantada para o local definitivo do experimento. D) Plantas com seis meses de idade, após o plantio em local definitivo. Feira de Santana, Brasil, 2018.....86

Figura 2. Principais variações morfológicas entre indivíduos pertencentes a diferentes acessos da espécie *Lippia origanoides* Kunth. coletados nos Estados da Bahia e Pernambuco. A) Face foliar adaxial, B) Face foliar abaxial, C) Coloração do caule, D) Coloração das pétalas. Feira de Santana, Bahia, 2018.....90

Figura 3. Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 12 acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados no Estado da Bahia, obtido pelo método UPGMA, com base em dez caracteres morfológicos, utilizando-se a distância generalizada de Mahalanobis. Feira de Santana, Bahia, 2018.....93

Figura 4. Dispersão gráfica dos escores em relação aos eixos representativos das variáveis canônicas (VC1, VC2) relativos aos dez caracteres avaliados em 12 acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados no Estado da Bahia. Feira de Santana, Bahia, 2018.....95

Figura 5. Contribuição relativa (%) das características avaliadas para a divergência entre os 12 acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados no Estado da Bahia. Feira de Santana, Bahia, 2018.....97

## **CAPÍTULO III**

Figura 1. Valores de delta (K) segundo correção de Evanno (2005), mostrando os picos de atribuição (K) para 18 populações silvestres de *Lippia origanoides* Kunth. (Maior valor de K = 4, e os demais picos, K = 2, K = 8 e K = 12). Feira de Santana, Bahia, 2018.....117

Figura 2. Quatro possibilidades de proporção de mistura Bayesiana, gerada a partir de dados do software STRUCTURE para 18 populações silvestres de *Lippia origanoides* Kunth. coletadas na Bahia e Pernambuco. 1 = LO2818; 2 = LO2825; 3 = LO2826; 4 = LO2835; 5 = LO2847; 6 = LO2849; 7 = LO2853; 8 = LO2859; 9 = LO2863; 10 = LO2864; 11 = LO2865; 12 = LO2866; 13 = LO2867; 14 = LO2868; 15 = LO2870; 16 = LO2871; 17 = LO2872; 18 = LO2880. Feira de Santana, Bahia, 2018.....118

Figura 3. Dendrograma Neighbor-Joining baseado na matriz de distância genética de Nei para 18 populações de *Lippia origanoides* Kunth., evidenciando a formação de quatro grupos. 1 = LO2818; 2 = LO2825; 3 = LO2826; 4 = LO2835; 5 = LO2847; 6 = LO2849; 7 = LO2853; 8 = LO2859; 9 = LO2863; 10 = LO2864; 11 = LO2865; 12 = LO2866; 13 = LO2867; 14 = LO2868; 15 = LO2870; 16 = LO2871; 17 = LO2872; 18 = LO2880. Feira de Santana, Bahia, 2018.....121

Figura 4. Gráfico de dispersão baseado na análise de Coordenadas Principais (PCoA) para as 18 populações de *Lippia origanoides* Kunth. 1 = LO2818; 2 = LO2825; 3 = LO2826; 4 = LO2835; 5 = LO2847; 6 = LO2849; 7 = LO2853; 8 = LO2859; 9 = LO2863; 10 = LO2864; 11 = LO2865; 12 = LO2866; 13 = LO2867; 14 = LO2868; 15 = LO2870; 16 = LO2871; 17 = LO2872; 18 = LO2880. Feira de Santana, Bahia, 2018.....122

## CAPÍTULO IV

Figura 1. Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 12 genótipos de *Lippia origanoides* Kunth., obtido pelo método UPGMA, com base na composição química dos

óleos essenciais, utilizando-se a distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ). Feira de Santana, Bahia, 2018.....138

Figura 2. Dispersão gráfica dos escores em relação aos eixos representativos das variáveis canônicas (VC1, VC2, VC3) relativos aos 20 caracteres avaliados em 12 genótipos de *Lippia origanoides* Kunth. após cultivo padronizado. Feira de Santana, Bahia, 2018.....139

Figura 3. Contribuição relativa (%) dos compostos avaliados para a divergência entre os 12 acessos de *Lippia origanoides* Kunth. após o cultivo padronizado. Feira de Santana, Bahia, 2018.....140

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>20</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Família Verbenaceae e o gênero <i>Lippia</i> Linn. ....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 <i>Lippia origanoides</i> Kunth.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 Conservação de Recursos Genéticos Vegetais.....</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Caracterização de germoplasma.....</b>	<b>27</b>
2.4.1 Caracterização morfo-agronômica.....	28
2.4.2 Caracterização molecular.....	29
2.4.3 Caracterização fitoquímica.....	30
<b>2.5 Caracterização ecogeográfica.....</b>	<b>32</b>
<b>2.6 Referências.....</b>	<b>33</b>
<b>3. CAPÍTULO I. ESTUDO ECOGEOGRÁFICO E FITOQUÍMICO DE POPULAÇÕES SILVESTRES DE <i>Lippia origanoides</i> KUNTH. COLETADAS NOS ESTADOS DA BAHIA E PERNAMBUCO.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Introdução.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2 Materiais e métodos.....</b>	<b>46</b>
3.2.1 Coleta e identificação dos acessos.....	46
3.2.2 Caracterização ambiental.....	47
3.2.3 Análise química do solo.....	47
3.2.4 Extração e análise química dos óleos essenciais.....	48
3.2.5 Análises estatísticas.....	49
<b>3.3 Resultados e discussão.....</b>	<b>49</b>
3.3.1 Caracterização ambiental.....	49
3.3.2 Caracterização fitoquímica.....	60
3.3.3 Relação entre as características ambientais e a diversidade química.....	72
<b>3.4 Conclusão.....</b>	<b>75</b>
<b>3.5 Referências.....</b>	<b>76</b>
<b>4. CAPÍTULO II. CARACTERIZAÇÃO MORFO-AGRONÔMICA DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE <i>Lippia origanoides</i> KUNTH.</b>	

<b>COLETADOS NO ESTADO DA BAHIA, BRASIL .....</b>	<b>80</b>
<b>4.1 Introdução.....</b>	<b>83</b>
<b>4.2 Materiais e métodos.....</b>	<b>84</b>
4.2.1 Coleta e formação da coleção de germoplasma da espécie.....	84
4.2.2 Propagação.....	85
4.2.3 Caracterização morfo-agronômica.....	86
4.2.4 Análises estatísticas.....	87
<b>4.3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>88</b>
<b>4.4 Conclusão.....</b>	<b>97</b>
<b>4.5 Referências.....</b>	<b>98</b>
<b>5. CAPÍTULO III. DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES SILVESTRES DE <i>Lippia origanoides</i> KUNTH. POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR.....</b>	<b>102</b>
<b>5.1 Introdução.....</b>	<b>106</b>
<b>5.2 Materiais e métodos.....</b>	<b>107</b>
<b>5.2.1 Material vegetal.....</b>	<b>107</b>
5.2.2 Extração e amplificação de DNA.....	110
5.2.3 Análise de dados.....	111
<b>5.3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>112</b>
5.3.1 Diversidade Genética.....	112
5.3.2 Estrutura genética populacional.....	115
5.3.3 Padrões de organização da estrutura genética.....	116
<b>5.4 Propostas de manejo de germoplasma de <i>Lippia origanoides</i> Kunth. com base nos resultados.....</b>	<b>123</b>
<b>5.5 Referências.....</b>	<b>123</b>
<b>6. CAPÍTULO IV. VARIABILIDADE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE <i>Lippia origanoides</i> KUNTH. COLETADOS NO ESTADO DA BAHIA.....</b>	<b>128</b>
<b>6.1 Introdução.....</b>	<b>131</b>
<b>6.2 Material e métodos.....</b>	<b>132</b>

6.2.1 Material vegetal.....	132
6.2.2 Extração e análise da composição química dos óleos essenciais.....	134
6.2.3 Análises estatísticas.....	134
<b>6.3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>135</b>
<b>6.4 Conclusão.....</b>	<b>143</b>
<b>6.5 Referências.....</b>	<b>144</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>148</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os recursos genéticos vegetais são compreendidos como a parcela da diversidade vegetal com possibilidade de uso atual ou futuro. Estão relacionados ao suprimento das necessidades básicas da humanidade, na provisão de alimentos, produção de combustíveis e meios terapêuticos (NASS, 2007). A importância das plantas medicinais como fonte, ou modelo, para a síntese de moléculas com ações biológicas é inquestionável, mas frequentemente, esse recurso não tem sido explorado da maneira adequada. Tratando-se das espécies medicinais nativas a situação é ainda mais grave, devido à falta de informações básicas sobre essas espécies.

A espécie *Lippia origanoides* Kunth. tem apresentado resultados promissores com várias atividades biológicas comprovadas, como atividade antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, repelente, entre outras (BITTARA et al., 2009; MENESES et al., 2009; NERIO et al., 2009; ARANGO et al., 2012). Além disso, os estudos mostram que a diversidade química da espécie é alta, com a identificação frequente de novos quimiotipos (STASHENKO et al., 2010; TOZIN et al., 2015). Dessa forma, *L. origanoides* destaca-se pela ampla variedade de aplicações biológicas, sendo uma promissora espécie para ser utilizada nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética.

Assim como ocorre com outras espécies medicinais nativas, *L. origanoides* ainda é obtida através do extrativismo. Essa prática aumenta a chance de erosão genética e prejudica a determinação do padrão de qualidade dos metabólitos secundários. O padrão de qualidade é feito através de medidas que apontam possíveis fraudes e contaminações na matéria prima vegetal de interesse, e principalmente por meio de procedimentos que indiquem a existência e quantidade das substâncias ativas presentes nas amostras vegetais, sendo extremamente importante para assegurar o uso adequado de espécies medicinais que apresentam quimiotipos (SIMÕES, 2002).

*L. origanoides* ocorre abundantemente no Nordeste brasileiro, sendo encontradas populações naturais em locais variados no Estado da Bahia (SALIMENA e MÚLGURA, 2015). O conhecimento das características ambientais predominantes dos sítios de ocorrência natural da espécie auxilia no desenvolvimento de estratégias de conservação, indicando zonas prioritárias para serem conservadas e locais para coleta de germoplasma diferenciado, bem como gera dados importantes que auxiliam no cultivo adequado da espécie (MENDES et al.,

2015; MEIRA, 2016). Essas informações são obtidas por meio de estudos de caracterização ecogeográfica. Diversas questões acerca de espécies silvestres de interesse medicinal, como *L. origanoides*, têm sido respondidas por meio de pesquisas ecogeográficas (DANNER et al., 2010; PARRA-QUIJANO et al., 2012; MENDES et al., 2015).

Conhecer a diversidade e estrutura genética de populações silvestres da espécie por meio de caracterização molecular é pré-requisito para que a conservação de germoplasma da mesma seja eficiente, pois é necessário que a diversidade genética da espécie esteja representada na coleção o mais próximo da sua totalidade. Além disso, a caracterização de acessos da coleção de germoplasma por meio de descritores morfo-agronômicos, e tratando-se de plantas medicinais e aromáticas, de marcadores fitoquímicos são importantes, porque evidenciam a existência de acessos promissores que poderão ser utilizados em projetos de melhoramento genético, com a finalidade de cultivar indivíduos com elevada produção de metabólitos secundários e com características morfológicas e agronômicas apropriadas ao cultivo (NASS, 2007).

Diante da abundância da espécie no Estado da Bahia, com a finalidade de auxiliar na sua conservação, cultivo e melhoramento genético, é pertinente a realização de um estudo de caracterização entre os diferentes acessos de *L. origanoides*. O objetivo dessa tese é caracterizar aspectos ecogeográficos, moleculares, morfo-agronômicos e fitoquímicos de acessos da espécie *Lippia origanoides* ocorrentes no Estado da Bahia.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Família Verbenaceae e o gênero *Lippia* Linn.

As plantas medicinais caracterizam-se por apresentarem um ou mais grupos de princípios ativos que lhes conferem várias propriedades terapêuticas, sendo encontradas em diversas famílias de plantas. Dentre as diferentes famílias botânicas, destaca-se a Verbenaceae pela elevada e variada produção de metabólitos secundários (SIMÕES e SPITZER, 2007).

Verbenaceae compreende 36 gêneros e 1000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e temperadas do Hemisfério Norte (SOUZA e LORENZI, 2005). No Brasil foram encontrados 16 gêneros e 281 espécies pertencentes a esse táxon (FLORA DO BRASIL 2022, 2019). Na família são encontradas espécies com diferentes hábitos, do herbáceo até ao arbóreo (SALIMENA-PIRES e GIULIETTI, 1998). De acordo com Judd et al. (2002), os principais gêneros da família Verbenaceae são *Verbena* L., *Lippia* Linn., *Citharexylum* L., *Stachytarpheta* Vahl, *Glandularia* JF Gmel. e *Duranta* Cham.

O gênero *Lippia* Linn. reúne cerca de 200 espécies arbustivas com distribuição pantropical (SALIMENA, 2002), sendo que cerca de 86 espécies ocorrem no Brasil (FLORA DO BRASIL 2022, 2019). Os principais centros de diversidade específica do gênero estão localizados no Brasil e no México (SALIMENA-PIRES, 1998). A região da Cadeia do Espinhaço, nos estados da Bahia, Minas Gerais e Goiás, é o local com maior ocorrência de espécies do gênero no país (OLIVEIRA et al., 2007). Na medicina popular espécies desse gênero têm sido usadas no tratamento de afecções respiratórias, inflamações, problemas digestivos, micoses e como antisséptico geral e cicatrizante (OLIVEIRA et al., 2007; GOMES et al., 2011). O uso de plantas pertencentes ao gênero *Lippia* na medicina popular segue um padrão geral, utilizando-se principalmente folhas ou partes aéreas, preparadas na forma de infusão ou decocção e administração por via oral (SILVA et al., 2015).

Os óleos essenciais obtidos de espécies do gênero *Lippia* têm sido amplamente testados cientificamente, devido ao potencial dos princípios ativos, e os resultados encontrados vêm confirmando as atividades terapêuticas afirmadas na medicina popular (SOARES e TAVARES-DIAS, 2013). A espécie mais estudada do gênero, *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, já teve diversas atividades biológicas comprovadas cientificamente, como antiviral,

antimicrobiana, analgésica, entre outras (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005; DUARTE et al., 2005; HENNEBELLE et al., 2008). Além da *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, diversas espécies de *Lippia* tiveram suas propriedades confirmadas. *Lippia dulcis* Trev. possui as ações anti-espasmódica e anti-inflamatória comprovadas (GORNEMANN et al., 2008). *Lippia citriodora* Kunth. teve as ações bactericida, anti-inflamatório, antipirético, analgésico e antioxidante confirmadas (ANSARI et al., 2012; EL-HAWARY et al., 2012). As ações bactericida, antipirética e cicatrizante foram constatadas para *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2016). *Lippia sidoides* Cham. demonstrou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GUIMARÃES et al., 2014). Todos esses dados mostram o potencial terapêutico do gênero *Lippia*, evidenciando a sua importância como fonte de biomoléculas, para utilização como recurso medicinal.

## **2.2 *Lippia origanoides* Kunth.**

Entre as espécies do gênero *Lippia* tem se destacado *Lippia origanoides* Kunth. (Figura 1), que tem como sinônimos *Lippia affinis* Schauer, *Lippia berteri* Spreng., *Lippia candicans* Hayek, *Lippia elegans* Cham., *Lippia graveolens* H.B.K., *Lippia glandulosa* Schauer, *Lippia martiana* var. *martiana*, *Lippia matogrossensis* Moldenke, *Lippia microphylla* Cham., *Lippia obscura* Briq., *Lippia pendula* Rusbi, *Lippia polycephala* Briq., *Lippia rigida* Schauer, *Lippia salviaefolia* Cham., *Lippia schomburgkiana* Schauer, *Lippia sidoides* Cham., *Lippia velutina* Schauer (SALIMENA e MÚLGURA, 2015; O'LEARY et al., 2012). No gênero *Lippia* tem havido dificuldades no que tange a identificação botânica, devido a semelhanças morfológicas entre espécies diferentes e variações morfológicas intraespecíficas, contudo, tem sido sugerido a existência de apenas uma espécie e, nesse caso, os nomes científicos em vigor tornam-se sinônimos do nome mais antigo, como aconteceu com *L. origanoides* (PASCUAL et al., 2001; O'LEARY et al., 2012).

Com ocorrência na América do Sul e Mesoamérica, essa planta apresenta hábito arbustivo, podendo atingir até 3 m de altura, folhas muito aromáticas e inflorescências axilares. No Brasil, a espécie ocorre do Maranhão até Minas Gerais, sendo popularmente conhecida como "salva-de-Marajó" e "alecrim-d'Angola" (SALIMENA-PIRES e GIULIETTI, 1998; O'LEARY et al., 2012; PINTO et al., 2013). O chá das folhas é usado popularmente no tratamento de diarreia, cólicas em bebês, indigestão, flatulência, febre, náuseas, complicações

menstruais, azia e como antisséptico para a boca, garganta e feridas (OLIVEIRA et al., 2007).



Figura 1. Indivíduos da espécie *Lippia origanoides* Kunth. A) Indivíduo no ambiente natural. B) Detalhe da inflorescência. Feira de Santana, Bahia, 2018.

O óleo essencial em *L. origanoides*, é produzido em tricomas glandulares que ocorrem na superfície de folhas, brácteas, sépalas e pétalas (TOZIN et al., 2015). Atualmente a espécie apresenta oito quimiotipos conhecidos, que variam de acordo com os componentes majoritários do óleo essencial (STASHENKO et al., 2010; VEGA-VELA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014). A existência de outros quimiotipos tem sido sugerida por novas pesquisas (TOZIN et al., 2015).

Muitos trabalhos comprovaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial e dos extratos de *L. origanoides* contra vários microorganismos, como *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh (BITTARA et al., 2009), espécies do gênero *Candida* Berkh. (OLIVEIRA et al., 2007), *Mycobacterium tuberculosis* Zopf. (BUENO-SÁNCHEZ et al., 2009), *Leishmania chagasi* Ross., *Trypanosoma cruzi* Chagas (ESCOBAR et al., 2010), *T. cinnabarinus* Chagas (SIVIRA et al., 2010), entre outros. A espécie demonstrou atividade antiviral contra os vírus causadores da dengue e da febre amarela (MENESES et al., 2009). A atividade antioxidante e anti-inflamatória do óleo essencial também foi comprovada (ARANGO et al., 2012; VERAS et al., 2013). Os resultados foram positivos no uso do óleo essencial de *L. origanoides* no tratamento de gengivite e placa dentária (LOBO et al., 2011). Estudos comprovaram a atividade repelente de *L. origanoides* contra *Tribolium castaneum* (H.) e *Sitophilus zeamais*

Mots. (NERIO et al., 2009; OLIVERO-VERBEL et al., 2009). A espécie apresentou efeito protetor de DNA contra genotoxicidade induzida por bleomicina (VICUÑA et al., 2010). A ação nematostática e nematicida de *Lippia organoides* frente à *Meloidogyne javanica* (Treub.) foram constatadas por Moreira (2017). Devido ao extenso uso popular e as diversas ações biológicas comprovadas, a espécie está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS), (BRASIL, 2009).

### 2.3 Conservação de Recursos Genéticos Vegetais

Define-se como recursos genéticos vegetais a parte da biodiversidade vegetal que tem utilidade atual ou possibilidade de uso no futuro. Os recursos genéticos vegetais integram a base alimentar da humanidade, além de atender inúmeras de suas necessidades, como combustível, indumentária e fármacos, tornando indispensável à conservação desses recursos em condições adequadas, resultando na sustentação de sua integridade genética (COSTA & SPEHAR, 2012). De acordo com Nass (2007), as principais ameaças aos recursos genéticos vegetais são: poluição ambiental, exploração exacerbada, modificações ambientais, introdução de espécies danosas, danos aos habitats pelo uso da terra e colapso das comunidades nos habitats.

A conservação dos recursos genéticos vegetais é de extrema importância na manutenção de fontes de genes no melhoramento genético de espécies e sobrevivência da população mundial (COSTA & SPEHAR, 2012). Nesse cenário, a conservação de plantas medicinais, tem grande destaque, visto que esses recursos vegetais representam o tipo de terapia disponível para suprir as necessidades fundamentais de saúde de aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento no mundo (BRASIL, 2006). Entre os diversos países, o Brasil é o detentor da maior biodiversidade, que em associação a rica diversidade étnica e cultural possui elevado conhecimento tradicional relacionado ao uso de plantas medicinais, apresentando o potencial necessário para realização de estudos científicos, que resultaram no desenvolvimento de novas tecnologias e produtos terapêuticos (BRASIL, 2006).

Existem basicamente duas formas de conservação dos recursos genéticos vegetais. A primeira é a conservação *in situ*, em que os vegetais são mantidos no habitat natural da espécie (NODARI e GUERRA, 2007). Nesse caso, devido à permanência no próprio habitat, as relações dos vegetais com o meio ambiente são mantidas, permitindo a ocorrência de

eventos que desencadeiam o processo evolutivo. Além disso, a conservação *in situ* ocasiona a conservação de outras espécies vegetais e animais associados à área resguardada, permite o manutenção de populações viáveis das espécies, e também de espécies com sementes recalcitrantes (NASS, 2007). Entretanto, nessa forma de conservação o germoplasma vegetal pode ser perdido por fatalidades ou fenômenos ambientais, como incêndios, inundações e outros. No Brasil as Unidades de Conservação são áreas que visam à conservação dos recursos genéticos vegetais pela via da conservação *in situ*, mas, as ações executadas têm sido ineficazes para evitar a erosão genética, conseqüentemente, pouco tem sido feito em termos de caracterização genética de espécies nativas (NODARI e GUERRA, 2007).

A segunda forma de conservação de recursos genéticos vegetais é a conservação *ex situ*, que se caracteriza pela manutenção do germoplasma fora do hábitat originário, normalmente em bancos ativos de germoplasma (BAGs) (NODARI e GUERRA, 2007). Essas unidades se caracterizam por salvaguardar grande número de acessos, os quais representam a variabilidade genética da espécie ou gênero, e são mantidos para conservação e melhoramento das espécies (VEIGA et al., 2012).

Toda coleção de germoplasma tem início pela obtenção do mesmo, que ocorre por meio de coleta ou introdução, sendo esta oriunda da doação ou intercâmbio (NASS, 2007). Posteriormente, na coleção, o germoplasma passa por diversos processos importantes, como caracterização, avaliação e regeneração, que permitirão o uso eficaz desse recurso. Comumente, os bancos ativos de germoplasma estão situados em áreas públicas de instituições de pesquisa, ensino e extensão agropecuária, locais em que ocorrem pesquisas para melhoramento vegetal (VEIGA et al., 2012).

No Brasil, existe um banco de germoplasma central, o Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN, criado em 1974 em Brasília, além de bancos ativos de germoplasma em diversas unidades de pesquisa nos outros estados da Federação (NODARI e GUERRA, 2007). Entretanto, diante da biodiversidade brasileira, o número de bancos de germoplasma é insuficiente, o que pode acarretar na perda da variabilidade de diversas espécies, principalmente nativas. No caso de plantas medicinais, o número de instituições que têm atividades atreladas à conservação de germoplasma é opostamente proporcional à riqueza da biodiversidade do país (SCHEFFER et al., 1999). Além do número reduzido, em muitas instituições as coleções de germoplasma de plantas medicinais não são organizadas com a metodologia adequada para a montagem da coleção, tendo seu uso comprometido.

Tratando-se da perda de germoplasma de plantas medicinais, outro fator preocupante é o dano causado pelo extrativismo, que é a forma de obtenção mais comum de amostras vegetais de espécies medicinais que não são cultivadas. Essa prática tem levado, frequentemente, a diminuição extremada das populações naturais de espécies medicinais, tanto através da exploração vigorosa ou devido à incompreensão dos processos de perpetuação das espécies (NODARI e GUERRA, 2007).

Diante desse cenário difícil o CENARGEN tem procurado instaurar programas para estabelecer bancos ativos de germoplasma de espécies medicinais e aromáticas no país. Por meio da execução de planos de ação, definidos especificamente para regiões que possuem precedência de conservação, serão efetuadas operações integradas e sequentes de pesquisa para a coleta, conservação e caracterização destes recursos. Este empenho em estruturar uma rede de bancos de germoplasma ocasionará a utilização acertada do material genético e o seu registro, disponibilizando-o à pesquisa, bem como o resguardo dos materiais autóctones submetidos à alta pressão extrativista com risco de erosão genética.

#### **2.4 Caracterização de Germoplasma**

Apesar da importância de conservar os recursos genéticos vegetais, tal esforço não terá utilidade efetiva no tempo atual e futuro se não for realizada a caracterização adequada desse material (NASS, 2007). Existe uma controvérsia na literatura científica sobre as definições dos termos “caracterização” e “avaliação” de germoplasma. Pelo contexto da maioria dos trabalhos desenvolvidos sobre a temática, o termo “caracterização” tem sido usado para definição de ambas às práticas, não sendo feitas alusões ao termo “avaliação”. Portanto, o presente trabalho segue essa mesma linha terminológica.

A caracterização é uma tarefa básica na manipulação das coleções de germoplasma, e consiste praticamente em obter dados para descrever, identificar e diferenciar acessos de uma mesma espécie, gerando informações que serão proveitosas para a conservação e aproveitamento dos recursos genéticos (BURLE e OLIVEIRA, 2010). Os dados relacionados aos acessos distintos devem ser minuciosamente detalhados, para assegurar seu uso. De acordo com Nass (2007), entre os benefícios práticos da caracterização de germoplasma estão a descoberta de acessos duplicados, a formação de coleções nucleares, a identificação das formas de reprodução predominantes nos acessos e a existência de variabilidade intrínseca em acessos individuais. Entretanto, sem a caracterização adequada o uso da variabilidade presente nas coleções é dificultado.

#### 2.4.1 Caracterização morfo-agronômica

Geralmente a caracterização morfo-agronômica é o passo inicial para ponderar se existe variabilidade nos acessos de uma espécie. Esse estágio compreende na anotação de caracteres botânicos, facilmente visíveis ou mensuráveis que se evidenciam substancialmente em todos os ambientes (NASS, 2007). No que se refere às plantas medicinais, essa caracterização é importante porque permite o entendimento de adaptações das estruturas secretoras ocasionadas pela pressão ambiental, e também de diferentes características dos vários órgãos das plantas, que irão subsidiar posteriormente algumas estratégias de cultivo (SCHEFFER et al., 1999).

Diversas espécies medicinais já demonstraram variações morfo-agronômicas em estudos de comparação de diferentes acessos, incluindo espécies do gênero *Lippia* Linn. Blank et al. (2006) avaliaram características agronômicas e morfológicas de acessos de *Lippia gracilis* Schauer ocorrentes nos estados de Sergipe e Bahia. Ao final do estudo os autores sugeriram um cruzamento entre um dos acessos de Sergipe, que apresentou a copa com formato de taça, e outro acesso da Bahia, que apresentou o teor de óleo essencial mais elevado, resultando em um cultivar com formato de copa de taça e alto teor de óleo essencial.

Camêlo et al. (2011) avaliaram 72 acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. a partir de caracteres morfo-agronômicos. Os resultados mostraram diferenças morfológicas nos acessos para as variáveis: comprimento de ramo, diâmetro de copa, cor de caule, folhas, pétalas, hábito de crescimento, comprimento e largura de folha e relação comprimento/largura de folha. Também houve diferenças para as características agronômicas, como teor e rendimento de óleo essencial. Trabalhando com a mesma espécie, Jannuzzi et al. (2011) avaliaram o comportamento agronômico de 17 acessos da coleção de germoplasma da Universidade de Brasília. Os resultados mostraram uma correlação positiva entre a produção de biomassa foliar e rendimento de óleo essencial, rico em citral.

Do mesmo modo, Castro et al. (2011) avaliaram diferentes acessos de mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.) quanto a produção de massa fresca da parte aérea, massa seca, altura e área foliar. Os autores verificaram que, dos cinco acessos avaliados, quatro apresentaram comportamento semelhante em relação à produção de massa seca da parte aérea. Castro et al. (2016) caracterizaram quatro acessos e duas cultivares de manjeriço. As características agronômicas avaliadas foram eficientes na caracterização de germoplasma e

evidenciaram a divergência genética entre os acessos e cultivares de manjeriço. O propósito desses estudos é averiguar se essas modificações são ocasionadas por divergência genética ou apenas adaptações de natureza ambiental (SCHEFFER et al., 1999), permitindo a seleção dos acessos propícios para o melhoramento genético da espécie.

#### 2.4.2 Caracterização molecular

Com o surgimento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do ácido desoxirribonucleico (DNA), culminando com o surgimento dos marcadores moleculares na década de 1980 (GUIMARÃES et al., 2009). Marcadores moleculares podem ser conceituados como qualquer fenótipo molecular procedente de um polimorfismo de sequência de DNA, referente a um sítio conhecido ou anônimo do genoma, comumente nomeados através de siglas que tentam resumir a forma pela qual esse polimorfismo é revelado (NASS, 2007). Os diferentes tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA (VIDOR et al., 2002). Cada marcador tem sua particularidade, diferenciando-se entre si pela repetibilidade e complexidade da técnica, custo, tempo consumido, nível de polimorfismo detectado entre indivíduos, quantidade exigida de material biológico, tipo de segregação (dominante ou co-dominante), entre outros (MARTINS, 2007). Todos esses fatores devem ser avaliados no momento da escolha do marcador molecular utilizado no desenvolvimento de pesquisas.

Disponível desde 1994, a técnica de marcador molecular ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) é constituída por marcadores semiarbitrários, ampliados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) na presença de um oligonucleotídeo complementar para um microssatélite designado (ZIETKIEWICZ, RAFALSKI e LABUDA, 1994). Essa técnica rápida e de fácil manuseio superou a maioria das restrições dos demais marcadores, harmonizando a grande parte dos benefícios das técnicas SSR (*Single Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), com a universalidade do RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), como melhor reprodutibilidade das bandas. Além disso, não requer dados preliminares da sequência genômica e implica em menor dispêndio para execução, sendo apropriado para a realização de estudos sobre diversidade genética, filogenia e biologia evolutiva (REDDY et al., 2002). O uso dos marcadores ISSR tem sido eficiente em estudos de

diversidade com espécies do gênero *Lippia* L., como *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (MANICA-CATTANI et al., 2009) e *Lippia integrifolia* (Gris.) (IANNICELLI et al., 2016).

Existem poucos estudos sobre os aspectos genéticos de *L. origanoides*. No trabalho de Vega-Vela e Sanches (2012) observou-se que houve diminuição na variabilidade genética das populações da espécie crescidas em maiores altitudes ao longo da Bacia do Rio Chicamocha no Nordeste da Colômbia. Em outra pesquisa, Vega-Vela et al. (2013) avaliaram a variabilidade e diversificação genética através de marcadores ISSR e da análise química do óleo essencial entre uma população de *L. origanoides* localizada no Norte e outra no Nordeste da Colômbia. Os resultados obtidos mostraram uma alta variabilidade genética nas duas populações, porém houve pouca divergência entre as duas populações, apesar da distância entre elas.

No México foram desenvolvidas duas pesquisas sobre a diversidade genética da espécie. Martínéz-Natarén et al. (2014) avaliaram a diversidade e estrutura genética de 14 populações silvestres de *L. origanoides* distribuídas em quatro regiões com características climáticas distintas. A diversidade genética geral foi moderada e a sua relação com as características ambientais não ficou esclarecida. Vargas-Mendoza et al. (2016) estudando a espécie, tentaram elucidar a relação entre pressão ambiental e a seleção de loci específicos, bem como avaliar a diversidade genética através de marcadores ISSR em 22 populações naturais de *L. origanoides*. Novamente, a diversidade genética não foi alta, e apenas dois loci foram associados com quatro variáveis ambientais.

Apesar das diversas aplicações biológicas confirmadas e da abundância de *L. origanoides* no Estado da Bahia, o conhecimento acerca da diversidade genética da espécie na região é escasso, sendo pertinente conhecer a diversidade genética e sua distribuição entre as populações naturais de *L. origanoides* nesse território, para que a coleta de germoplasma da espécie seja bem sucedida.

#### 2.4.3 Caracterização fitoquímica

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é definida como sendo todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que tem finalidade terapêutica ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos (BRASIL, 2006). Essas substâncias são produzidas pelo metabolismo secundário dos vegetais e, por isso, são

chamadas de metabólitos secundários, sendo classificadas de acordo com as características físico-químicas específicas.

De acordo com Santos (2007), os metabólitos secundários possuem diversas funções ecológicas que permitem a adequação da planta ao meio-ambiente, como defesa contra herbívoros e microorganismos, a proteção contra raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, bem como sua participação em alelopatias. A produção dos metabólitos secundários é regida por fatores intrínsecos, a constituição genética de cada espécie, porém, também sofre variações de acordo com diversos fatores bióticos e abióticos que circundam o vegetal (MORAES, 2009).

A ciência que identifica, classifica e quantifica os metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais é a fitoquímica. Nas espécies vegetais medicinais a caracterização fitoquímica faz-se fundamental para separar os acessos quanto à presença ou não de substâncias específicas e princípios ativos, bem como para quantificar as substâncias de interesse (NASS, 2007). Essas discrepâncias podem ser utilizadas no desenvolvimento de variedades mais úteis para uso terapêutico (SCHEFFER et al., 1999). Jannuzzi et al. (2011), avaliando 17 acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, apontaram o acesso originário de Varjão-DF, para ser utilizado no melhoramento da espécie, devido ao alto teor de citral que apresentou. Silva Júnior et al. (2015) estudando acessos da espécie *Mikania glomerata* Spreng., caracterizaram um acesso oriundo de Palhoça-SC que apresentou teor de óleo essencial de 0,73%, em oposição a média de 0,12% e baixa produção de cumarinas, fato incomum em espécies desse gênero. Um exemplo bem-sucedido de uso da diversidade entre acessos em melhoramento genético de espécies medicinais foi o desenvolvimento de um cultivar de manjeriço, pelo Programa de Melhoramento Genético da Universidade Federal de Sergipe. O grupo realizou ensaios de avaliação de comportamento de acessos de manjeriço, a fim de identificar materiais de alta produção de óleo essencial rico em linalol. Por fim, foi desenvolvida a cultivar de manjeriço Maria Bonita, com alto teor e rendimento de óleo essencial, rico em linalol e adaptado para cultivo no Nordeste brasileiro (BLANK et al., 2007).

Nas espécies do gênero *Lippia* Linn. é muito comum a ocorrência de metabólitos secundários classificados como óleos essenciais (TOZIN et al., 2015). Segundo Moraes (2009), óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, constituídos por moléculas de natureza terpênica, apresentam odor marcante e agradável, em temperatura ambiente apresentam aspecto oleoso, tendo como

principal característica a volatilidade. Nas plantas, os óleos essenciais estão envolvidos, comumente, em diversas funções que incluem a volatilidade, como atração de polinizadores, defesa contra predadores e inibição da germinação de sementes (KNAAK e FIUZA, 2010). Além disso, os óleos essenciais também estão relacionados com a fotoproteção vegetal (FARIAS et al., 2017). A ocorrência de quimiotipos ou raças químicas é frequente em plantas ricas em óleos essenciais, caracterizados como vegetais botanicamente idênticos, mas que diferem quimicamente por um ou mais compostos que ocorrem de forma majoritária na mistura (SIMÕES e SPITZER, 2007).

A ocorrência de quimiotipos em *L. origanoides* foi estudada por diversos pesquisadores. De acordo com o estudo de Stashenko et al. (2010) realizado na Colômbia, foram identificados três quimiotipos, que são classificados de acordo com os principais compostos presentes no óleo essencial: o quimiotipo A tem como constituintes majoritários o p-cimeno/ $\alpha$  e  $\beta$ -felandreno/limoneno, o quimiotipo B apresenta o carvacrol como majoritário, enquanto o quimiotipo C apresenta o timol numa porcentagem acima de 50%. No trabalho de Veja-Vela et al. (2013), além dos quimiotipos já citados, foram encontrados os quimiotipos D (timol, abaixo de 30%), E (eucaliptol/ $\alpha$ -felandreno), F (p-cimeno/eucaliptol/timol metil éter) e G (timol metil éter/ p-cimeno/timol/ $\gamma$ -terpineno). Avaliando a influência de diferentes estações sobre a produção de óleo na espécie no Pará, Ribeiro et al. (2014) encontraram um quimiotipo que apresenta o cinamato de metila e o E-nerolidol como constituintes principais. Tozin et al. (2015) encontraram o E-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e  $\sigma$ -cadineno como os constituintes majoritários do óleo essencial extraído das folhas de *L. origanoides*, em São Paulo, indicando a possibilidade de novos quimiotipos para a espécie. Dessa forma, pode-se supor que ainda são necessários mais estudos que tenham por objetivo conhecer a variabilidade fitoquímica de *L. origanoides*.

## 2.5 Caracterização ecogeográfica

O conhecimento acerca das características ambientais dos locais de ocorrência natural das espécies vegetais e dos sítios de obtenção de acessos podem ser úteis de diversas formas e essas informações são obtidas através de estudos de caracterização ecogeográfica. A ecogeografia é a ciência que estuda a distribuição geográfica dos seres vivos, procurando entender padrões de organização espacial e processos que resultaram em tais padrões (FUTUYMA, 1992; OLIVEIRA et al., 2008). Os estudos ecogeográficos representam

importantes ferramentas para aumentar a efetividade da conservação *in situ*, pois permitem o conhecimento prévio de áreas prioritárias de conservação (NASS, 2007). Esse tipo de pesquisa pode indicar possíveis zonas de coleta de germoplasma com características desejáveis por meio de predições. No trabalho de Boldt (2014) foi realizada uma investigação da existência de associação preditiva entre teor de óleo e variáveis ecogeográficas da origem de acessos de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.). Os resultados mostraram que explorar a associação preditiva entre o teor de óleo e as características ecogeográficas do local de origem do germoplasma aumenta as chances de encontrar genótipos com alto teor de óleo. Segundo Parra-Quijano et al. (2012) a caracterização ecogeográfica pode auxiliar também no cultivo das espécies analisadas, tanto na delimitação de cultivos, quanto na escolha adequada de acessos adaptados para certas localidades ou condições ambientais específicas. A elucidação de problemas na coleção de germoplasma, como complicações de propagação e regeneração de amostras, entre outros, podem ser solucionados por meio do conhecimento do ambiente de origem dos acessos (PARRA-QUIJANO et al., 2012; MENDES et al., 2015).

Estudos de caracterização ecogeográfica também foram desenvolvidos com outras espécies medicinais, como *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (MARTINS et al., 2009), *Plinia* sp. (DC.) Kausel (DANNER et al., 2010), *Varronia curassavica* Jacq. (MENDES et al., 2015) e *Lippia aff. rotundifolia* Cham. (MEIRA, 2016), caracterizando os locais de ocorrência espontânea das mesmas, gerando subsídios ao cultivo e sugerindo possíveis acessos mais promissores.

## 2.6 Referências

- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v. 76, p. 374 - 378, 2005.
- ANSARI, M.; LARIJANI, K.; SABER-TEHRANI, M. Antibacterial activity of *Lippia citriodora* herb essence against MRSA *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 1, p. 16 - 19, 2012.
- ARANGO, O. B.; PANTOJA, D. D.; SANTACRUZ, L. C. H., HURTADO, A. M. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia organoides* H.B.K) del alto patia. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 10, n. 2, p. 79 - 86, 2012.
- BITTARA, F.; RODRÍGUEZ, D.; SANABRIA, M.; MONROY, J.; RODRÍGUEZ, J. L. Evaluación de fungicidas y productos vegetales en el combate de la sarna polvorienta de la papa. **Interciencia**, v. 34, p. 265 - 269, 2009.

BLANK, A. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de *Lippia gracillis*. **Anais...** Congresso brasileiro de Horticultura, 2006.

BLANK, A. F.; SOUZA, E. M.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; PAULA, J. W. A.; ALVES, P. B. Novas Cultivares Maria Bonita: cultivar de manjeriço tipo linalol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 12, p. 1811 - 1813, 2007.

BOLDT, A. S. **Coleções nucleares e associação do teor de óleo de cártamo com variáveis ecogeográficas por inteligência computacional**. 2014. 67 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica**. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos**. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, 2009.

BUENO-SÁNCHEZ, J. G.; MARTÍNEZ-MORALES, J. R.; STASHENKO, E. E.; RIBÓN, W. Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. **Biomédica**, v. 29, n. 1, p. 51 - 61, 2009.

BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review**, Geneva, 1998.

BURLE, M. L.; OLIVEIRA, M. S. P. **Manual de curadores de germoplasma - vegetal: caracterização morfológica**. (Documentos/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 378). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 15 p.

CAMÊLO, L. C. A.; BLANK, A. F.; EHLERT, P. A. D.; CARVALHO, C. R. D.; ARRIGONI-BLANK, M. J.; MATTOS, F. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de erva cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. **Sciétia Plena**, v. 7, n. 5, p. 2011 - 2019, 2011.

CASTRO, H. G.; SANTOS, G. R.; MOMENTÉ, V. G.; SILVA, D. J. H.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I. Estudo da divergência genética por características morfológicas entre acessos de mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.) coletados no Estado do Tocantins em diferentes épocas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 24 - 29, 2011.

CASTRO, H. G.; VELOSO, R. A.; CARDOSO, D. P.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; CHAGAS, L. F. B. Caracterização botânica-agronômica e do óleo essencial de acessos de manjeriço. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 4, p. 01 - 06, 2016.

COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R. Base genética da diversidade In: COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R.; SERENO, J. R. B. **Conservação de Recursos Genéticos no Brasil**. Brasília, Embrapa, 2012, p. 28 - 59.

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

DUARTE, M. C. T. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305 - 311, 2005.

EL-HAWARY, S. S. A.; YOUSIFA, M. F.; ABDEL, A. A.; LAMIA, M.; ABD-HAMEED, M. Bioactivities, phenolic compounds and *in vitro* propagation of *Lippia citriodora* Kunth. cultivated in Egypt. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, v. 50, n. 1, p. 1 - 6, 2012.

ESCOBAR, P.; LEAL S. M.; HERRERA, L. V.; MARTINEZ J. R.; STASHENKO E. E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia spp* essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 184 - 190, 2010.

FARIAS, A. V.; FERNANDES, F. S.; SANTOS, R. A.; SOUZA, E. S.; SOUZA, J. V. B.. Phytochemical study and photoprotection analysis of extracts and essential oils of *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 4, p. 614 - 620, 2017.

**Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15170>>. Acesso em: 10 Jan. 2019

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética: CNPq, 1992. 646 p.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64 - 77, 2011.

GÖRNEMANN, T. ; NAYAL, R. ; PERTZ, H. H. ; MELZIG, M. F. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 166 - 169, 2008.

GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. J.; SCLIUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 30, n. 253, p. 24 - 34, 2009.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, R. M.; ZACARONI, A. B.; SANTOS, G. R. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: Composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 2, p. 267 - 275, 2014.

HENNEBELLE, T. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 116, p. 211 - 222, 2008.

IANNICELLI, J.; LA TORRE, M. P.; COVIELLA, A.; AGUIRRE, E. D.; ELECHOSA, M. A. ; VAN BAREN, C. M. ; PACHECO, M. G.; ESCANDÓN, A. S. Propagation *in vitro* of *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hier. and detection of genetic instability through ISSR markers

of *in vitro*-cultured plants. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 115, n. 1, p. 67 - 76, 2016.

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**, v. 13, n. 3, p. 258 - 264, 2011.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics: A phylogenetic approach**, Sunderland, UK, Sauer, 2<sup>o</sup> ed., 2002.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology & Conservation**, v. 5, n. 2, p.120 - 132, 2010.

LOBO, P. L. D.; CARVALHO, C. B. M.; NASCIMENTO, D. F.; FONSECA, S. G. C.; JAMACARU, F. V. F.; MORAES, M. E. A. Dose–response evaluation of a novel essential oil against *Mutans streptococci* in vivo. **Phytochemistry**, v. 18, n. 7, p. 551 - 556, 2011.

MANICA-CATTANI, M. F., ZACARIA, J., PAULETTI, G., ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biologia**, v. 69, n. 2, p. 375 - 380, 2009.

MARTÍNEZ-NATARÉN, D. A.; PARRA-TABLA, V.; FERRER-ORTEGA, M. M.; CALVO-IRABIÉN, L. M. Genetic diversity and genetic structure in wild populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) and its relationship with the chemical composition of the essential oil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, p. 535 - 547, 2014.

MARTINS, F. L. C. M. **Análise molecular de espécies perenes e anuais do Gênero Dicerandra (Lamiaceae) baseada em marcadores ISSR**. 2007. 73 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

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 Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 24 - 32, 2009.

MEIRA, M. R. **Ecogeografia e diversidades genética e química de *Lippia aff. rotundifolia* Cham**. 2016. 159 f. Tese (Doutorado em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

MENDES, A. D. R.; NASCIMENTO, C. R.; QUEIROZ, T. B.; PINTO, V. B.; MARTINS, E. R. Ecogeografia de populações de erva-baleeira (*Varronia curassavica*) no Norte e Vale do Jequitinhonha em Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 3, p. 418 - 424, 2015.

MENESES, R.; TORRES, F. A.; STASHENKO, E. E.; OCAZONEZ R. E. Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. **Salud UIS**, v. 41, p. 236 - 243, 2009.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 4050 - 4063, 2009.

MOREIRA, J. J. **Avaliação do potencial do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. no controle de *Meloidogyne javanica* em plantas de alface.** 2017. 37f. Monografia (Graduação de Tecnologia em Agroecologia) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2017.

NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858 p.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL J.; STASHENKO, E. E. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). **Journal of Stored Products Research**, v. 45, p. 212 – 214, 2009.

NODARI, R. O. ; GUERRA, M. P. **Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal.** In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. cap. 2, p. 29 - 45.

O'LEARY, N; DENHAM, S. S.; SALIMENA, F.; MÚLGURA, M. E. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum*. (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, p. 197 - 219, 2012.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236 - 240, 2007.

OLIVEIRA, J. P.; PELOSO, M. J. D.; MORAIS, O. P.; SILVA, H. T.; FONSECA, J. R.; MELO, L. C.; SILVA, S. C. Distribuição ecogeográfica de acessos tradicionais de feijoeiro comum. **Comunicado Técnico, Embrapa**, 153, 2008.

OLIVERO-VERBEL, J.; CABALLERO-GALLARDO, K.; JARAMILLO-COLORADO, B.; STASHENKO, E.E. Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, Herbst. **Salud UIS**, v. 41, p. 244 - 250, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Conselho Executivo. Medicina tradicional y asistencia sanitaria moderna. Foro Mundial de la Salud; **Revista internacional de Desarrollo Sanitario**, v. 12, n. 1, p. 120, 1991.

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

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201- 214, 2001.

PINTO, C. P. ; RODRIGUES, V. D. ; PINTO, F.P. ; PINTO, R. P. ; UETANABARO, A. P. T. ; PINHEIRO C. S. R. ; GADEA, S. F. M. ; SILVA, T. R. S. ; LUCCHESI, A. M. . Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semi-arid region traditionally used as antiseptic and anti-infective. **Agents Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p.1 - 6, 2013.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9 - 17, 2002.

RIBEIRO, A. F.; ANDRADE, E. H. A.; SALIMENA, F. R. G.; MAIA, J. G. S. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia organoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 249 - 259, 2014.

SALIMENA-PIRES, F. R. & GIULIETTI, A. M. Flora da serra do cipó, Minas Gerais: Verbenaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 17, p. 155 - 186, 1998.

SALIMENA-PIRES, F. R. *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae) do Brasil. In: Congresso latino-americano de botânica, 7. México **Anais...** Sociedade Latino Americana de Botânica, 299 p., 1998.

SALIMENA, F. R. G. Novos sinônimos e tipificação em *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v. 40, p. 121 - 125, 2002.

SALIMENA, F. R. G.; MULGURA, M. 2015. ***Lippia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21449>>.

SANTOS, R. I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários.** In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 6<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. cap. 16, p. 403 - 434.

SCHEFFER, M. C.; MING, L. C.; ARAÚJO, A. J. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Eds). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro.** Brasília: Editora da Embrapa - Sede / DF, 1999. 24p.

SILVA, F. S.; MENEZES, P. M. N.; SÁ, P. G. S.; OLIVEIRA, A. L. S.; SOUZA, E. A. A.; BAMBERG, V. M.; OLIVEIRA, H. R.; OLIVEIRA, S. A.; ARAÚJO, R. E.; UETANABARO, A. P. T.; SILVA, T. R. S. ; ALMEIDA, J. R. G. S.; LUCCHESI, A. M. Pharmacological Basis for Traditional Use of the *Lippia thymoides*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1 - 10, 2015.

SILVA, F. S. ; MENEZES, P. M. N. ; SÁ, P. G. S. ; OLIVEIRA, A. L. S. ; SOUZA, E. A. A. ; ALMEIDA, J. R. G. S. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. **Journal Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 25 - 34, 2016.

SILVA JÚNIOR, A. A.; RITTER, M. R.; ZAMBONIM, F. M.; DESCHAMPS, F. C.; T. C. ACENCO F. A.; BERTOLDI, F. C. Um novo ecótipo de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) rico em óleo essencial no Sul do Brasil. **Revista Fitos**, v. 9, n. 1, p. 19 - 28, 2015.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos Voláteis**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ªed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. Cap. 18, p. 467 - 495.

SIVIRA, A.; SANABRIA, M. E; VALERA, N; VÁSQUEZ, C. Toxicity of ethanolic extracts from *Lippia origanoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 3, p. 375 - 379, 2011.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109 - 123, 2013.

SOUZA, N. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática – guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira baseado em AP G II**. São Paulo, Instituto Plantarum, 2005.

STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J. R.; RUIZ, C. A.; ARIAS, G.; DURAN, C.; SALGAR, W. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 93 - 103, 2010.

TOZIN, L. R. S.; MARQUES, M. O. M.; RODRIGUES, T. M. Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in the Brazilian Cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 943 - 953, 2015.

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

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

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

VEIGA, R. F. A.; BARBOSA, W.; TOMBOLATO, A. F. C.; VALLS, J. F. M. Bancos de Germoplasma: importância e organização In: COSTA, A.M.; SPEHAR, C.R.; SERENO, J. R. B. **Conservação de Recursos Genéticos no Brasil**. Brasília, Embrapa, 2012, p. 104 - 124.

VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J. G. M. ; COUTINHO, H. D. M. ; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible mechanism of action. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 179 - 185, 2013.

VICUÑA, G. C.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, p. 343 - 349, 2010.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): o sabor. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 415 - 420, 2002.

ZIETKIWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p.176-183, 1994.

### 3 CAPÍTULO I

**Estudo ecogeográfico e fitoquímico de populações silvestres de *Lippia origanoides*  
Kunth. coletadas nos Estados da Bahia e Pernambuco.**

**Estudo ecogeográfico e fitoquímico de populações silvestres de *Lippia origanoides*  
Kunth. coletadas nos Estados da Bahia e Pernambuco.**

Emily Verônica Rosa da Silva Feijó; Lenaldo Muniz de Oliveira; Angélica Maria Lucchese

**RESUMO** - Existe um crescente interesse econômico na espécie aromática *Lippia origanoides* Kunth. devido às várias ações biológicas comprovadas atribuídas a ela. As possibilidades de uso dessa planta são decorrentes da presença de óleos essenciais em suas folhas, flores e caules, sendo conhecidos oito quimiotipos diferentes para a espécie. Essa variação fitoquímica encontrada na espécie pode ser ocasionada pelos fatores ambientais que circundam as plantas e, apesar do interesse em torno da espécie, o conhecimento acerca das características ambientais em que *L. origanoides* naturalmente ocorre é insuficiente. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os ambientes de ocorrência natural de populações de *L. origanoides* coletadas no Estado da Bahia e Pernambuco, averiguar se existem variações na composição química do óleo essencial produzido pelas diferentes populações da espécie e avaliar possíveis interações entre fatores ambientais e variação fitoquímica. Ao total foram percorridos 19 sítios, sendo 18 no Estado da Bahia e 01 no Estado de Pernambuco, nos quais foram obtidas coordenadas geográficas e amostras foliares e de solo. A partir das coordenadas geográficas obtidas foi realizada a caracterização ambiental de cada sítio, por meio de arquivos vetoriais disponibilizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, obtendo-se dados de temperatura média anual, pluviosidade média anual, classe de solos, bioma, vegetação e clima. As amostras de solos seguiram para análise química onde foram determinadas as concentrações dos elementos P, K, Ca, Mg, Al, Na e os valores concernentes as variáveis pH (em água), relação Ca:Mg, acidez potencial (H+Al), soma de bases (SB), capacidade de troca de cátions (CTC), saturação por bases (V) e matéria orgânica (MO). As amostras foliares foram secas e posteriormente utilizadas na extração de óleo essencial através de hidrodestilação e análise da composição química por meio de CG-FID e CG-EM. Os resultados mostraram que a espécie ocorre predominante em locais pertencentes ao bioma Caatinga, áreas antropizadas e zonas do clima Tropical Brasil Central. Quanto às características edáficas ocorre em solos com níveis nutricionais distintos. O estudo permitiu a identificação dos quimiotipos ricos em carvacrol, timol e E-nerolidol, já conhecidos de *L. origanoides* além de genótipos com óleos essenciais com altas porcentagens de cânfora, elemenol, E-cariofileno, linalol e acetato de linalol, indicando a ocorrência de novos quimiotipos para a espécie. A diversidade química na espécie parece ser influenciada

conjuntamente pela concentração de Al e valores V presentes nos solos em que as populações foram encontradas e pela diversidade genética.

**Palavras-chave:** Plantas Medicinais e Aromáticas Nativas. Ambiente Natural. Verbenaceae. Ecogeografia.

**Ecogeographic and phytochemical study of wild populations of *Lippia origanoides* Kunth. collected in Bahia and Pernambuco states.**

**Abstract** – There is an increasing economic interest in the aromatic species *Lippia origanoides* Kunth. due to its biologic activities. The presence of essential oils in its leaves, flowers, stem allow the use of this plant, in which nine chemotypes are recognized. This phytochemical variation can be a result of environmental factors around the plant, and despite all the interest about the plant, the knowledge about environmental characteristics in which *L. origanoides* naturally occurs is insufficient. Thus, the aim of this work was to characterize environments where *L. origanoides*, collected in the states of Bahia and Pernambuco, naturally occurs, investigate if there are variations in the chemical composition of essential oils and evaluate possible interactions among environmental factors and phytochemical variation. In total, 19 sites were collected, from which 18 were in Bahia and 01 in Pernambuco, obtaining geographic coordinates, leaves and soil samples. Based on the geographic coordinates obtained, the environmental characterization of each site was carried out using vector files provided by the IBGE, obtaining data of mean annual temperature, annual average rainfall, soil class, biome, vegetation and climate. Soil samples were analyzed for determining concentrations of elements P, K, Ca, Mg, Al, Na and values concerning pH (in water), Ca:Mg ratio, potential acidity (H+Al), sum of bases (SB), ion exchange capacity (CTC), base saturation (V) and organic matter (MO). Leaf samples were dried and posteriorly used in the extraction of essential oil by hydrodistillation and chemical composition analysis by GC/FID and GC/MS techniques. The results showed that the specie occurs predominantly in Caatinga, anthropic areas and Tropical Central Brazil climate zones. Additionally, it occurs in soils with distinct nutritional levels. The study allowed to identify chemotypes rich in carvacrol, thymol and E-nerolidol, already known for *L. origanoides*, besides genotypes with essential oils with high percentages of camphor, elemenol, E-caryophyllene, linalool and linalool acetate, indicating the occurrence of new chemotypes in this specie. The chemical diversity of this species seems to be influenced by either concentration of Al and V values in the soil and genetic diversity.

**Key-words:** Medicinal and Aromatic Native Plants. Natural Environment. Verbenaceae. Ecogeographic.

### 3.1 Introdução

*Lippia* Linn. é um dos maiores gêneros da família Verbenaceae, com várias espécies distribuídas na região Neotropical e África. Entre as espécies desse gênero tem se destacado *Lippia origanoides* Kunth., que se distribui da Guiana até a Argentina, na América do Sul, podendo ser encontrada também na Mesoamérica (O'LEARY et al., 2012). No Brasil, a espécie ocorre do Maranhão até Minas Gerais, é popularmente conhecida como "salva-de-Marajó e "alecrim-d'Angola", sendo usada principalmente no tratamento de distúrbios no aparelho digestivo e para antisepsia de mucosas e feridas (OLIVEIRA et al., 2007).

Vários trabalhos comprovam ações biológicas do óleo essencial da espécie, como a atividade antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2007; ESCOBAR et al., 2010), antiviral (MENESES et al., 2009) e antioxidante (TELES et al., 2014a, 2014b) entre outras.

Assim como outras espécies do mesmo gênero, *L. origanoides* produz óleo essencial através de tricomas glandulares (TOZIN et al., 2015). A espécie apresenta ampla variação fitoquímica, com oito quimiotipos já descritos, diferenciando-se de acordo com os constituintes majoritários do óleo essencial, sendo eles os quimiotipos A (p-cimeno/ $\alpha$  e  $\beta$ -felandreno/limoneno), B (carvacrol), C (timol, acima de 50%), D (timol, abaixo de 30%), E (eucaliptol/  $\alpha$ -felandreno), F (p-cimeno/eucaliptol/ timol metil éter), G (timol metil éter/p-cimeno/timol/ $\gamma$ -terpineno) além do quimiotipo rico em cinamato de metila/E-nerolidol (STASHENKO et al., 2010; VEGA-VELA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014). Recentemente, Tozin et al. (2015) confirmaram a plasticidade química desta espécie, descrevendo a composição química de duas populações de *L. origanoides* e apontando para variações entre os indivíduos das populações, com quatro tipos principais diferentes de óleos essenciais, conforme os compostos majoritários das folhas:  $\alpha$ -humuleno, E-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno/E-cariofileno e E-cariofileno/ $\delta$ -cadineno.

Essa variação fitoquímica na espécie é resultado da variabilidade genética intraespecífica, conjuntamente com a influência exercida pelos fatores ambientais a qual as diferentes populações estão expostas (STASHENKO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2014). Estudos têm sido realizados tentando elucidar a interferência ambiental sobre a composição química dos óleos de *L. origanoides*, mas as informações obtidas ainda são incipientes, sabe-se, todavia, que ambientes distintos podem ocasionar a produção de óleos essenciais com composições químicas diferenciadas na espécie (STASHENKO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2014; MARTÍNEZ-NATARÉN et al., 2014; VARGAS-MENDOZA et al., 2016).

Conhecer as particularidades da ambiência natural da espécie, por meio de um estudo ecogeográfico, pode auxiliar no entendimento da atuação do meio sobre a composição química dos óleos essenciais. A ecogeografia é o ramo da ciência que pesquisa a ocorrência e adaptação das espécies vegetais quanto aos fatores geográficos, edáficos e climáticos (MEIRA, 2016). De acordo com Parra-Quijano et al. (2012), os estudos ecogeográficos também geram subsídios para o cultivo adequado das espécies vegetais.

Assim como a maior parte das espécies nativas, ainda não existem formas de cultivo preconizadas para a espécie *L. origanoides*, sendo explorada de forma extrativista. Essa prática pode levar à erosão genética na espécie, fazendo-se necessárias medidas com a finalidade de conservar esse recurso genético vegetal. Algumas pesquisas sobre os efeitos de fatores ambientais individuais, como aridez e adubação, têm sido realizadas com a espécie, buscando-se a sua domesticação, bem como o aumento da produção de óleo essencial e da síntese de determinados constituintes (PARRA e LÓPEZ, 2008; TELES et al., 2014a; TELES et al., 2014b).

Estudos ecogeográficos foram realizados com espécies medicinais brasileiras, como *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (MARTINS et al., 2009), *Plinia cauliflora* (DC) Kausel (DANNER et al., 2010) *Varronia curassavica* Jacq. (MENDES et al., 2015) e *Lippia aff. rotundifolia* Cham. (MEIRA, 2016), produzindo informações que subsidiam o cultivo dessas espécies, além de indicar locais com genótipos de interesse devido à produção fitoquímica diferenciada (BOLDT, 2014). No Estado da Bahia, populações de *L. origanoides* ocorrem de forma silvestre (SALIMENA e MÚLGURA, 2015), sendo desconhecida a existência de variação fitoquímica entre essas populações, bem como quais são as características ambientais preponderantes nos sítios de ocorrência natural da espécie.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os ambientes de distribuição espontânea de populações de *L. origanoides* no Estado da Bahia, averiguar se existem variações na composição química do óleo essencial produzido pelas diferentes populações da espécie, bem como entender possíveis interações entre esses fatores edafoclimáticos e a composição química dos óleos essenciais.

## **3.2 Materiais e métodos**

### **3.2.1 Coleta e identificação dos acessos**

As expedições de coleta ocorreram no segundo semestre de 2014, após levantamento realizado na rede pública de Herbários, por meio de um banco de dados conjunto, quando foram identificados possíveis locais de ocorrência de *L. origanoides*. As expedições ocorreram no Estado da Bahia, foram coletados acessos nas cidades de Santa Terezinha, Palmeiras, Rio de Contas, Nova Itarana, Mucugê, Utinga, Morro do Chapéu, Jequié, Santa Luz, Riachão do Jacuípe, Santa Bárbara, Quixabeira, Jaguarari, Sento Sé, Casa Nova, Santa Brígida, Tucano e Jeremoabo. Também foi coletado um acesso na cidade de Floresta, Estado de Pernambuco, totalizando 19 acessos. Nos locais de coleta procedeu-se a marcação das coordenadas geográficas (latitude, longitude e altitude) com a ajuda de um GPS da marca Garmin, modelo Vista HCX.

Durante as coletas foram obtidos ramos floridos para confecção das exsicatas e posterior identificação botânica, realizada pela Dra. Tânia Regina dos Santos Silva, professora titular do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Todas as exsicatas foram incorporadas ao Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS).

### 3.2.2 Caracterização ambiental

A partir das coordenadas geográficas obtidas em cada localidade amostrada foi possível realizar a caracterização ambiental de cada sítio, por meio de arquivos vetoriais disponibilizados pelo IBGE, referente a cada característica ambiental de interesse (IBGE, 2013). Os ambientes foram caracterizados quanto ao bioma, vegetação, clima, precipitação média anual e temperatura média anual. O processamento dos dados e produção dos mapas temáticos foram realizados por meio do programa ArcGis.

### 3.2.3 Análise química do solo

Para a análise química do solo foram obtidas amostras em cada localidade de coleta, na camada 0 – 20 cm de profundidade, sendo realizadas cinco amostragens por local, formando uma amostra composta. A análise química foi realizada no Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado no município de Cruz das Almas, Bahia. Foram determinadas as concentrações dos elementos P, K, Ca, Mg, Al, Na e também os valores concernentes as variáveis pH (em água), relação Ca:Mg (Ca:Mg), acidez potencial

(H+Al), soma de bases (SB), capacidade de troca de cátions (CTC), saturação por bases (V) e matéria orgânica (MO).

#### 3.2.4 Extração e análise química dos óleos essenciais

Durante as coletas nos diferentes sítios percorridos, foram obtidas, por meio de coleta manual, amostras foliares para posterior extração de óleo essencial e estudo da composição química. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos porosos (nylon), para futura secagem. A secagem foi realizada a temperatura ambiente nas dependências do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e a extração dos óleos essenciais no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos da mesma instituição (LAPRON). A extração foi realizada através da hidrodestilação em Aparelho de Clevenger, utilizando-se 100 g de massa foliar seca por repetição, utilizando-se três repetições por acesso. O tempo de extração foi de três horas (SILVA, 2012) e, finalizado esse período, os óleos essenciais de cada acesso foram separados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Após a extração foi adicionado sulfato de sódio anidro para retirar água residual dos óleos essenciais extraídos, seguido da pesagem em balança de precisão para determinar o teor dos óleos essenciais, com base na massa seca utilizada. Posteriormente, os óleos essenciais foram armazenados em recipientes de vidro escuro e mantidos no freezer até a análise da composição química. Apenas o acesso oriundo de Jaguarari não teve material vegetal suficiente para extração de óleo essencial e posterior análise química.

A análise da composição química dos óleos essenciais foi realizada por Cromatografia Gasosa, empregando-se Cromatógrafo a gás com Detector de Ionização em Chama (CG/DIC) e Cromatógrafo a gás acoplado a Espectrômetro de Massas (CG/EM). Na análise por CG/DIC foi utilizado Cromatógrafo Varian® CP-3380, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm, com espessura do filme de 0.25  $\mu\text{m}$ ), temperatura do injetor de 220°C e do detector de 240°C, hélio como gás de arraste (1 mL min<sup>-1</sup>), com programa de temperatura do forno de: 60°C a 240°C (3°C min<sup>-1</sup>), 240°C (20 min). As análises por CG/EM foram realizadas em Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas GC/MS-QP 2010 Shimadzu®, coluna capilar DB-5ms (30 m x 0,25 mm, com espessura de filme 0.25  $\mu\text{m}$ ), temperatura do injetor 220°C, gás de arraste hélio (1 mL/min), temperatura da interface de 240°C, temperatura da fonte de ionização de 240°C, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização: 0,7kV e programa de temperatura do

forno: 60°C a 240°C (3°C/min), 240°C (20 min). Antes da injeção, aproximadamente 0,025 g de cada amostra de óleo essencial foi pesada em balança analítica e diluída em 2 mL do solvente diclorometano. O volume de 0,2 µL desta solução foi injetado, sob as mesmas condições supracitadas, no CG/DIC e no CG/EM, com razão de split de 1:100. Os componentes foram identificados através da comparação dos espectros de massas obtidos com os da biblioteca do equipamento (NIST21 e NIST107) e da literatura (ADAMS, 2007), bem como através do índice de Kovats (IK), obtido pela co-injeção da amostra a ser analisada com uma série homóloga de n-alcenos (C8-C24). Os resultados estão expressos em percentual relativo de cada constituinte (média das repetições), calculado através do método da normalização nos cromatogramas das amostras.

### 3.2.5 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se testes estatísticos multivariados e univariados. Na estatística multivariada foi realizada a análise dos componentes principais (ACP) dos dados da análise química dos solos e da análise da composição química dos óleos essenciais, utilizando-se de matrizes de correlação. Entretanto, devido ao elevado número de variáveis nulas, antes de aplicar a ACP nos dados fitoquímicos foi aplicado o critério de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO), para excluir as variáveis nulas e que pouco contribuíram na construção dos componentes principais. Por fim, foram selecionadas 11 variáveis para realizar a análise de componentes principais (ACP). Também foi realizada, com os dados fitoquímicos, uma análise de agrupamento utilizando o método Ward, com base na distância Euclidiana.

Feito a análise de componentes principais (ACP) com os dados fitoquímicos, e obtido o componente principal, aplicou-se a análise univariada, a partir desse componente, por meio da correlação de Pearson, com as variáveis ambientais (temperatura, pluviosidade, altitude) e variáveis químicas dos solos. Todas as análises estatísticas foram efetuadas no software R.

## 3.3 Resultados e Discussão

### 3.3.1 Caracterização ambiental

Foram coletados 19 acessos de *L. origanoides*, sendo 18 encontrados no Estado da Bahia e um no Estado de Pernambuco. As coordenadas geográficas dos locais de coleta se

encontram na Tabela 1. As populações da espécie ocorreram naturalmente em beiras de estradas e rodovias, organizadas em populações com tamanhos variados. A abundância da espécie variou muito na área percorrida, sendo comum a ocorrência mais frequente de populações próximas e densas em algumas regiões, como na Chapada Diamantina, enquanto um grande distanciamento ocorreu entre as populações encontradas em outras regiões, como no Nordeste do Estado da Bahia.

Tabela 1. Coordenadas geográficas e altitude dos sítios de coleta dos acessos de *Lippia origanoides* Kunth. nos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, Bahia, 2018.

<b>População/Sigla de identificação</b>	<b>Longitude (O)</b>	<b>Latitude (S)</b>	<b>Altitude (m)</b>
Santa Terezinha/STE	39° 32' 14,8"	12° 35' 46,8"	140
Nova Itarana/NIT	39° 56' 05,6"	12° 58' 22,0"	526
Jequié/JEQ	40° 03' 28,6"	13° 45' 54,0"	346
Rio de Contas/RCO	41° 51' 47,3"	13° 28' 53,8"	1065
Palmeiras/PAL	41° 29' 12,6"	12° 26' 47,7"	809
Mucugê/MUC	41° 23' 08,6"	12° 59' 42,3"	975
Utinga/UTI	41° 05' 40"	12° 04' 54"	863
Morro do Chapéu/MCH	40° 59' 38,3"	11° 36' 19,5"	941
Riachão do Jacuípe/RJA	39° 26' 12,6"	11° 46' 54,6"	193
Santaluz/SLU	39° 24' 50,0"	11° 12' 30,4"	348
Quixabeira/QUI	40° 07' 39,1"	11° 20' 03,9"	396
Jaguarari/JAG	40° 13' 58"	10° 05' 20,4"	543
Floresta/FLO	38° 09' 09,1"	08° 41' 0,6"	437
Santa Brígida/SBR	38° 15' 43,9"	09° 50' 16,4"	397
Jeremoabo/JER	38° 17' 54,4"	10° 13' 35,7"	227
Tucano/TUC	38° 49' 23,7"	11° 01' 25,5"	354
Santa Bárbara/SBA	38° 58' 15,5"	12° 01' 04,5"	270
Sento Sé/SSE	41° 53' 06"	09° 44' 45"	400
Casa Nova/CNO	40° 58' 15"	09° 09' 43"	417

Os acessos amostrados se encontram entre as coordenadas 08° 41' 0,6" e 13° 45' 54,0" de latitude e 38° 15' 43,9" e 41° 53' 6" de longitude. Verifica-se que as populações de *L. origanoides* foram encontradas em locais com altitudes contrastantes, não apresentando uma faixa de altitude específica. O acesso encontrado no local com maior altitude foi em RCO,

com 1.065 m, enquanto que o acesso coletado na menor altitude foi em STE, com 140 m, concordando com O'Leary et al. (2012), que afirmaram que a espécie ocorre comumente em altitudes de 160 a 1800 m. Entretanto, na Colômbia, *L. origanoides* foi encontrada em locais com altitude mais alta, variando de 200 a 2500 m (STASHENKO et al., 2010; VEGA-VELA e SANCHÉZ, 2012).

A temperatura média anual dos sítios de coleta apresentou variação entre 22 a 27°C em todos os locais amostrados (Tabela 2), onde 26,30% dos sítios apresentavam temperatura média de 22°C (NIT, JEQ, UTI, MCH e SBA), 42% dos sítios mostraram temperatura entre 23 a 24°C (STE, RCO, PAL, MUC, RJA, SLU, TUC e JAG), 21% dos locais exibiram temperatura entre 25 e 26°C (FLO, QUI, SBR e JER) e 10,5% dos sítios apresentaram temperatura média de 27°C (SSE e CNO).

A pluviosidade média anual oscilou entre 500 a 1000 mm nas áreas amostradas (Tabela 2). Os sítios com a pluviosidade mais baixa (10,52%) foram os de FLO e CNO, com apenas 500 mm anuais; 57,89% dos sítios apresentaram pluviosidade entre 600 e 700 mm (NIT, UTI, MCH, RJA, SLU, QUI, SBR, JER, TUC, SSE e JAG), 26,31% dos sítios apresentaram pluviosidade entre 800 a 900 (STE, JEQ, RCO, PAL e SBA). O local com a pluviosidade mais alta foi em MUC, com 1000 mm.

A maioria dos acessos ocorre em localidades com temperatura e pluviosidade com valores característicos da região do Semiárido, onde a temperatura média anual varia de 23 a 27°C e a pluviosidade média é menor que 800 mm, evidenciando a adaptação da espécie por lugares áridos, como já foi reportado por outros autores (PARRA e LOPÉS, 2008; O'LEARY et al., 2012). Entretanto, deve-se ressaltar que *L. origanoides* possui plasticidade suficiente para ocorrer em lugares mais úmidos, visto a ocorrência natural da espécie em lugares com pluviosidade de 800 a 1000 mm. Os sítios de ocorrência da espécie com maior umidade estão localizados na zona sub-úmida que circunda a região semiárida ou são microclimas que surgem devido à presença de serras e montanhas.

A classificação dos solos mostrou que *L. origanoides* ocorre em tipos distintos de solos (Tabela 2). Foram identificados cinco tipos diferentes entre os 19 sítios percorridos, sendo os mais ocorrentes aqueles classificados como Planossolo (31,57%), Latossolo (31,05%) e Neossolo (21,05%). Foram encontrados ainda solos dos tipos Luvisolo e Argissolo. A ocorrência preponderante da espécie em solos geralmente mal drenados (Planossolos), intemperizados e pouco férteis (Latosolos), e com pouca profundidade

(Neossolos) reforçam a adaptação de *L. origanoides* para áreas áridas, onde esses tipos de solos são encontrados facilmente.

Tabela 2. Temperatura média anual, pluviosidade média anual e classificação dos solos de dezenove sítios de ocorrência natural de *Lippia origanoides* Kunth. nos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, Bahia, 2018.

Acessos	Temperatura média (°C)	Pluviosidade (mm)	Classe de Solo
STE	23	800	Planossolo háplico
NIT	22	600	Latossolo amarelo
JEQ	22	800	Luvissole crômico
RCO	23	800	Neossolo litólico
PAL	23	900	Latossolo vermelho
MUC	23	1000	Neossolo litólico
UTI	22	700	Latossolo amarelo
MCH	22	600	Neossolo litólico
RJA	24	600	Planossolo háplico
SLU	23	600	Planossolo háplico
QUI	26	600	Latossolo amarelo
FLO	25	500	Luvissole crômico
SBR	26	700	Planossolo háplico
JER	26	700	Neossolo litólico
TUC	24	600	Planossolo háplico
SBA	22	800	Planossolo háplico
SSE	27	600	Argissolo vermelho-amarelo
CNO	27	500	Latossolo vermelho-amarelo
JAG	24	700	Latossolo amarelo

A espécie é mais ocorrente no Bioma Caatinga, com 73,68% dos sítios de coleta ocorrendo no domínio desse bioma (Figura 1). Esse resultado está de acordo com O'Leary et al. (2012) que afirma a ocorrência natural da espécie, frequentemente, em áreas pertencentes aos biomas Caatinga e Cerrado. Os demais sítios (26,31%) foram encontrados na região de ecótono, entre os biomas Mata Atlântica e Caatinga (Figura 1). Outros pesquisadores também localizaram populações da espécie em áreas de Mata Atlântica (SALIMENA e MÚLGURA, 2015). Todavia, nesse bioma, com maior incidência de precipitação, a espécie é encontrada

em fitofisionomias tipicamente mais xeromórficas, como campo cerrado e cerrado *stricto sensu* (TOZIN et al., 2015).

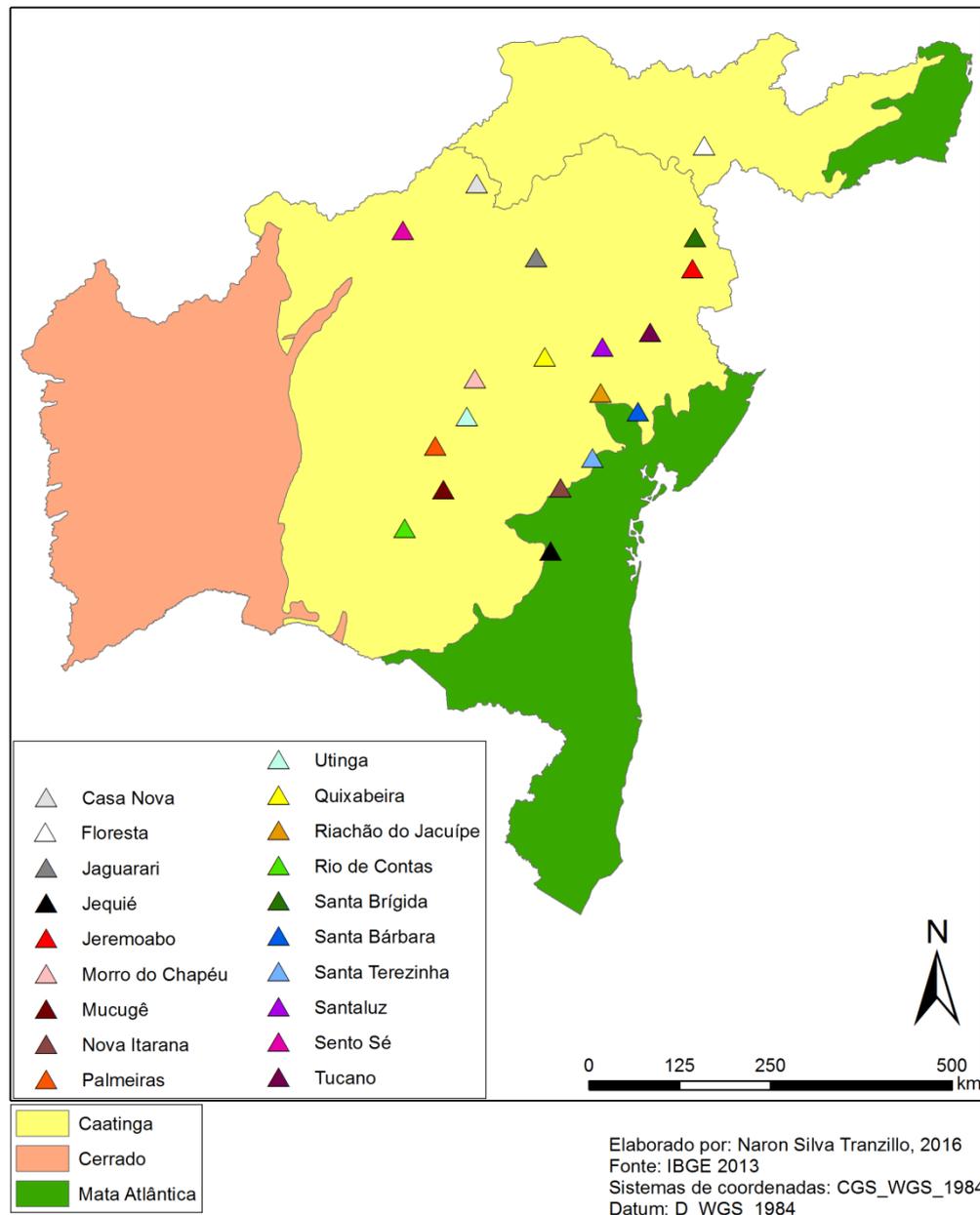


Figura 1. Mapa de distribuição dos acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados em diferentes municípios dos Estados da Bahia e Pernambuco e biomas correspondentes. Feira de Santana, Bahia, 2018.

Quanto ao tipo de vegetação, a maioria das populações naturais de *L. origanoides* (57,89%) localiza-se em áreas antropizadas, enquanto que os demais acessos (42,10%) ocorreram no tipo de vegetação classificado como savana (Figura 2). As espécies vegetais associadas aos ambientes antropizados têm como características a facilidade de sobrevivência

e dispersão nos ambientes perturbados pela ação degradadora humana. Outras espécies do gênero *Lippia* Linn. crescem espontaneamente em ambientes antropizados, como *Lippia aff rotundifolia* Cham. e *Lippia gracilis* Schauer (MEIRA, 2016; BRANDÃO, 2016).

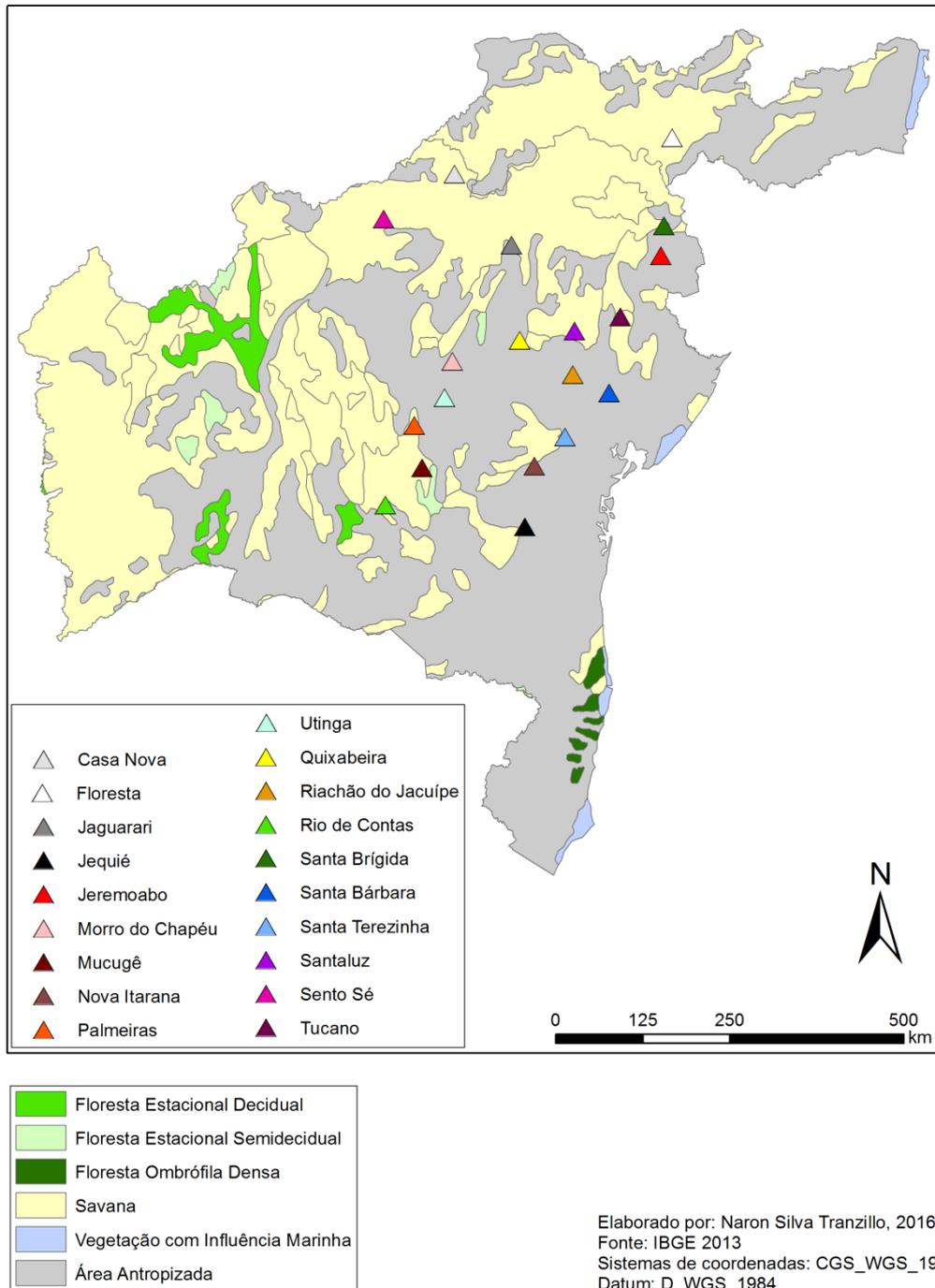
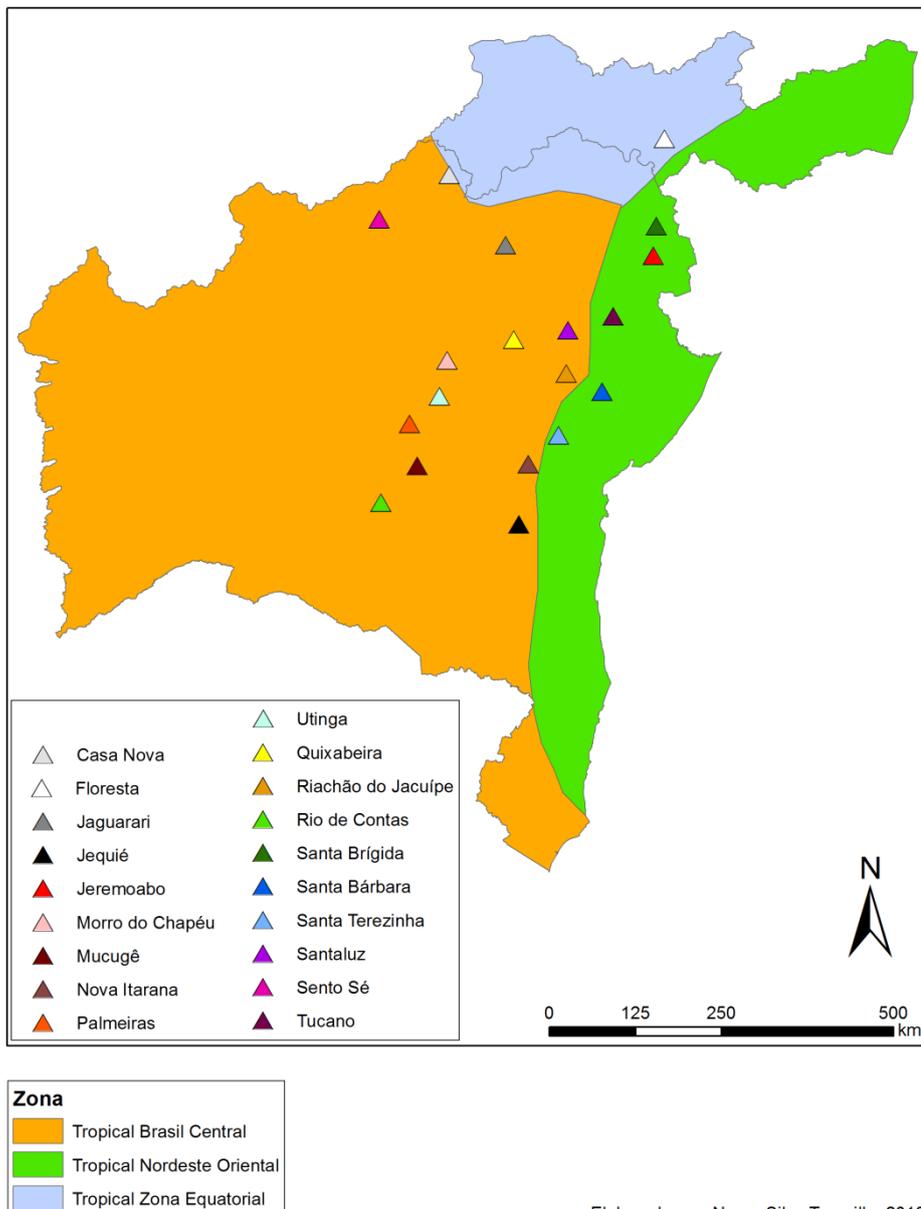


Figura 2. Mapa de distribuição dos acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados em diferentes municípios nos Estados da Bahia e Pernambuco e tipos de vegetação nos sítios de coleta. Feira de Santana, Bahia, 2018.

Em relação ao clima dos sítios de coleta, 68,42% estão localizados em zonas do clima Tropical Brasil Central (Figura 3), caracterizado por um período de estiagem que varia de 6 a 8 meses e com temperatura acima de 18°C em todos os meses do ano. Plantas da espécie foram coletadas em zonas com esse mesmo tipo de clima em outros estudos (CALVACANTI et al., 2004; PINTO et al., 2013). Do total de sítios percorridos, 26,31% das populações coletadas estão em zonas de clima do tipo Tropical Nordeste Oriental, caracterizado por temperaturas acima de 18°C em todo o ano e período de estiagem de 4 a 5 meses. Ainda foi encontrado um acesso de *L. origanoides* na área de ocorrência do tipo climático Tropical Zona Equatorial, em FLO, que apresenta temperatura maior que 18°C em todo o ano e três meses de estiagem.



Elaborado por: Naron Silva Tranzillo, 2016  
 Fonte: IBGE 2013  
 Sistemas de coordenadas: CGS\_WGS\_1984  
 Datum: D\_WGS\_1984

Figura 3. Mapa de distribuição dos acessos de *Lippia organoides* Kunth. coletados em diferentes municípios nos Estados da Bahia e Pernambuco e tipos de clima correspondentes. Feira de Santana, Bahia, 2018.

O resultado da análise química dos solos dos diferentes sítios de coleta pode ser vista na tabela 3. Os valores obtidos para a maior parte das características foi muito variável, não sendo possível identificar nenhuma condição específica dos solos para a ocorrência de *L. organoides*. Os valores de pH variaram de 4,4, nos sítios de RCO, PAL e UTI, até 6,6 em MUC. A concentração de fósforo oscilou do valor mínimo de 2 mg/dm<sup>3</sup>, em RCO e UTI, e

máximo de 76 mg/dm<sup>3</sup> no sítio de SBA. O cálcio foi menos abundante nos sítios de UTI e RCO, com concentração de 0,09 Cmol/dm<sup>3</sup>, e mais alto no sítio de MUC, com concentração de 5,87 Cmol/dm<sup>3</sup>. A concentração de alumínio foi elevada nos sítios de STE, SLU, JEQ, JER, MCH, RCO, UTI e PAL variando de 0,4 a 1,1 Cmol/dm<sup>3</sup>. Os valores da capacidade de troca catiônica (CTC) variaram de 1,37 Cmol/dm<sup>3</sup> no sítio de FLO até 9,71 Cmol/dm<sup>3</sup> no sítio de NIT. A saturação de bases (V) apresentou ampla variação, com os menores valores nos sítios de UTI e RCO com 9%, enquanto os sítios de JAG, SSE, QUI e RJA possuem esse índice oscilando de 85 a 97%. Os níveis de matéria orgânica (MO) variaram de 3g/kg no sítio de FLO até 35g/kg no sítio de MUC.

Os dados sugerem que a espécie apresenta plasticidade necessária para sobreviver em locais com características edáficas diferentes. Espécies menos restritivas, com maior plasticidade, podem se restringir a ambientes pobres, onde conseguem ter pleno desenvolvimento sem precisar competir por recursos com outras espécies mais restritivas se estivessem em ambientes ricos. Possivelmente, essa estratégia seja aplicada a *L. organoides*, explicando a ocorrência comum da espécie em áreas semiáridas com solos pobres e secos (DELGADO-OSPINA et al., 2012). Segundo Cardoso e Lomônaco (2003), espécies com potencial plástico suficiente para ocorrer em ambientes edáficos distintos tem a formação de ecotipos/variedades favorecida em detrimento de espécies que apresentam restrições, o que explica a ocorrência de elevado número de quimiotipos em *L. organoides* (O'LEARY et al., 2012; VEJA-VELA et al., 2013).

Tabela 3. Análise química do solo dos diferentes sítios de coleta dos acessos de *Lippia origanoides* Kunth. nos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, Bahia, 2018.

<b>Acessos</b>	<b>pH</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Ca+Mg</b>	<b>Al</b>	<b>Na</b>	<b>H+Al</b>	<b>SB</b>	<b>CTC</b>	<b>V</b>	<b>MO</b>
	(água)	mg/dm <sup>3</sup>					Cmol./dm <sup>3</sup>					%	g/kg
<b>STE</b>	5,0	6	0,13	1,19	0,40	1,59	0,4	0,26	2,87	1,97	4,84	41	12,0
<b>NIT</b>	5,4	6	0,72	4,57	1,81	6,38	0,1	0,05	2,56	7,15	9,71	74	22,0
<b>JEQ</b>	4,9	3	0,33	1,16	0,48	1,64	0,6	0,05	3,98	2,02	6,00	34	15,0
<b>RCO</b>	4,4	2	0,06	0,09	0,06	0,15	0,9	0,01	2,26	0,22	2,48	9	8,0
<b>PAL</b>	4,4	5	0,10	0,47	0,15	0,62	1,1	0,07	5,32	0,79	6,11	13	29,0
<b>MUC</b>	6,6	5	0,07	5,87	0,96	6,83	0,0	0,02	0,84	6,93	7,76	89	35,0
<b>UTI</b>	4,4	2	0,06	0,09	0,06	0,15	0,9	0,01	2,26	0,22	2,48	9	8,0
<b>MCH</b>	4,5	4	0,05	0,51	0,11	0,62	0,8	0,02	4,71	0,69	5,40	13	21,0
<b>RJA</b>	5,7	6	0,19	2,63	2,71	5,34	0,0	0,42	1,05	5,96	7,00	85	11,0
<b>SLU</b>	5,0	12	0,11	3,75	1,56	5,31	0,4	0,31	2,75	5,73	8,48	68	16,0
<b>QUI</b>	5,9	3	0,38	3,04	2,20	5,24	0,0	0,11	1,05	5,73	6,78	85	10,0
<b>JAG</b>	6,5	23	0,51	4,02	1,50	5,52	0,0	0,05	0,20	6,08	6,28	97	9,0
<b>FLO</b>	5,2	6	0,08	0,40	0,27	0,67	0,2	0,00	0,62	0,76	1,37	55	3,0
<b>SBR</b>	5,8	9	0,12	1,55	1,33	2,88	0,0	0,11	0,63	3,11	3,74	83	5,0
<b>JER</b>	4,6	6	0,27	1,27	0,35	1,62	0,7	0,02	2,72	1,91	4,63	41	16,0
<b>TUC</b>	5,6	5	0,31	1,39	0,83	2,22	0,0	0,03	0,92	2,55	3,48	73	5,0
<b>SBA</b>	5,8	76	0,21	3,11	1,37	4,48	0,0	0,06	1,07	4,74	5,81	82	15,0
<b>SSE</b>	6,5	5	0,38	3,19	0,91	4,10	0,0	0,03	0,19	4,52	4,70	96	9,0
<b>CNO</b>	5,5	10	0,28	1,70	0,22	1,92	0,0	0,01	1,43	2,21	3,64	61	9,0

A análise de componentes principais (ACP) permite reduzir o número de variáveis a um pequeno número de índices explicativos (componentes principais), facilitando a

identificação das características com maior variação e a representação do conjunto de dados num plano. A ACP condensou as variáveis químicas dos solos amostrados nos dois primeiros componentes principais (Figura 4). O primeiro componente explicou 54,95% da variabilidade para todas as amostras. As características com maior carga fatorial no primeiro componente (PC1) foram soma de bases (SB), saturação por bases (V), pH em água e concentração dos elementos Ca, Mg e Al. O segundo componente (PC2) explicou 18,78% da variação, com a contribuição das características, matéria orgânica (MO), capacidade de troca de cátions (CTC) e acidez trocável (H<sub>Al</sub>). No total os dois componentes principais explicaram 73,73% da variância de todos os atributos, sendo esse valor considerado confiável para esse tipo de análise.

As populações de QUI, SBA, JAG, SSE, SBR e TUC ficaram plotadas no primeiro quadrante (Figura 4), todas apresentaram solos com menor acidez, alta concentração de Mg e valores altos de V. No segundo quadrante ficaram as populações de CNO, FLO, RCO e UTI com solos mais ácidos, baixos valores de P, CTC, SB e MO. O terceiro quadrante foi formado pelas populações de STE, JER, JEQ, MCH e PAL que apresentaram solos com as maiores concentrações de Al, baixos valores de Ca, Mg, SB e V. Por fim as populações de RJA, MUC, SLU e NIT ficaram no quarto quadrante e apresentaram solos com altos valores de SB, CTC e V. De acordo com a ACP, percebe-se que os sítios ficaram dispersos sem que houvesse a formação de grandes grupos coesos, mesmo entre sítios geograficamente próximos, devido à grande variação nas variáveis químicas analisadas (Figura 4). Essa variação nos solos próximos deve-se ao fato que o solo é resultado da influência mútua de fatores de formação independentes, sendo os principais o clima, organismos, relevo, material de origem e tempo, que mudam amplamente de uma localidade para outra (ARAÚJO et al., 2014).

Diante dos resultados, compreende-se que os valores de SB, V, pH e a concentração Ca, Mg e Al não são fatores determinantes para ocorrência de *L. organoides*, visto que essas variáveis foram as que mais diferiram nos sítios em que a espécie foi encontrada. Estudos com a espécie têm demonstrado que ela se desenvolve com níveis baixos de nutrientes, principalmente quando comparada a outras espécies do gênero (DELGADO-OSPINA et al., 2012). Além disso, avaliações da influência da fertilização na produção de biomassa na espécie mostraram que a produção de biomassa não é alterada pela adubação, seja orgânica ou mineral (TELES et al., 2014a; TELES et al., 2014b).

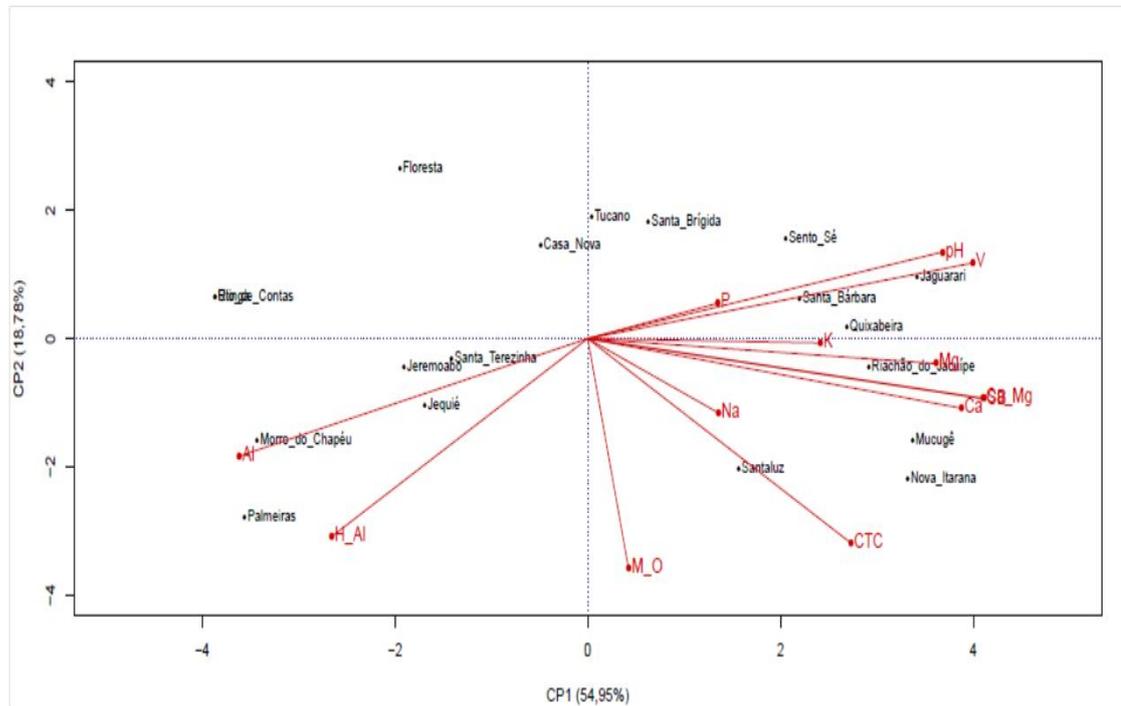


Figura 4. Ordenação dos componentes a partir da Análise de Componentes Principais (ACP), gerada a partir de 13 variáveis químicas dos solos coletados nos 19 sítios de coleta de *Lippia origanoides* Kunth. nos Estados da Bahia e Pernambuco, Feira de Santana, 2018.

### 3.3.2 Caracterização fitoquímica

Os resultados do estudo fitoquímico mostraram que existe variação na composição química dos óleos essenciais produzidos pelas diferentes populações da espécie. O percentual de identificação total dos constituintes químicos variou de 78,64 a 98,54%, apontando acurácia no processo analítico realizado. A composição dos óleos essenciais em *L. origanoides* é predominantemente de terpenos, pertencentes às classes dos mono e sesquiterpenos (Tabelas 4, 5 e 6). Apenas o acesso de UTI apresentou óleo essencial com maior proporção de sesquiterpenos, diferindo da maioria dos resultados encontrados para a espécie por outros pesquisadores (OLIVEIRA et al., 2007).

Das 18 populações avaliadas no estudo fitoquímico, 11 apresentaram a composição química do óleo essencial semelhante aos quimiotipos conhecidos da espécie. Os acessos oriundos de SLU, FLO, TUC, STE, SBA, RJA e CNO (Tabela 4) apresentaram óleos essenciais que tem como constituinte majoritário o carvacrol (variando de 32,31 - 50,44%) e valores consideráveis de p-cimeno (10,14 - 25,26%), composição química parecida ao quimiotipo B da espécie descrito por Stashenko et al. (2010). Entretanto, no estudo de

Stashenko et al. (2010) também foram observadas quantidades consideráveis de  $\gamma$ -terpineno e timol nas amostras pertencentes a esse quimiotipo. Todavia, neste trabalho esses constituintes variaram muito nas populações pertencentes ao possível quimiotipo. Dos Santos et al. (2004) encontraram o quimiotipo B avaliando plantas da espécie do Piauí. Oliveira et al. (2007) também encontraram o mesmo resultado com plantas oriundas do Pará. O quimiotipo rico em carvacrol também foi encontrado em plantas da espécie na Colômbia, México e Guatemala (SABINO et al., 2010; STASHENKO et al., 2010; MARTÍNEZ-NATARÉN et al., 2014).

Tabela 4. Índice de Kovats e percentual dos compostos identificados dos óleos essenciais obtidos de populações naturais de *Lippia origanoides* Kunth. coletadas nos Estados da Bahia e Pernambuco, classificados como quimiotipo rico em carvacrol. Feira de Santana, Bahia, 2018.

Composto	IK lit	IK cal	Casa Nova	Floresta	Santa Terezinha	Riachão do Jacuipe	Santa Bárbara	Santaluz	Tucano
$\alpha$ -tujeno	931	929	0,38	0,28	0,59	0,73	0,61	0,65	0,51
$\alpha$ -pineno	939	937	0,75	0,30	0,46	0,63	0,57	0,43	0,58
Canfeno	954	959	t	t	0,61	t	t	0,67	t
Sabineno	975	976	t	t	t	0,08	0,05	t	0,09
$\beta$ -pineno	979	980	0,08	t	t	0,21	t	t	0,11
$\beta$ -mirceno	990	990	2,01	1,97	1,47	1,97	1,82	1,86	2,28
$\alpha$ -felandreno	1002	1005	t	t	t	0,06	0,31	t	-
d-3-careno	1011	1012	0,13	0,09	t	t	t	t	-
$\alpha$ -terpineno	1017	1018	0,85	1,11	0,83	1,10	0,81	1,17	1,37
p-cimeno	1024	1026	25,26	18,49	19,05	21,20	10,14	19,50	18,61
limoneno	1029	1031	0,57	0,33	0,43	0,39	0,27	0,48	0,41
$\beta$ -felandreno	1029	1033	0,00	0,16	0,42	t	t	t	0,00
1,8-cineol	1031	1034	1,28	0,13	0,46	2,41	0,35	1,18	2,47
E- $\beta$ -ocimeno	1050	1049	-	0,05	t	0,08	t	0,07	t
$\gamma$ -terpineno	1059	1061	3,79	5,22	2,02	4,83	3,34	5,31	5,99
terpinoleno	1088	1093	t	t	t	t	t	t	t
linalol	1098	1098	2,3	0,18	0,65	1,57	0,72	4,77	0,19
ipsdienol	1145	1146	-	-	-	t	t		t
cânfora	1146	1146	0,08	t	0,41	0,09	t	0,87	0,08
borneol	1169	1169	t	t	1,11	0,06	-	0,72	t
terpinen-4-ol	1177	1178	0,96	0,69	0,66	0,71	0,43	0,58	0,75
$\alpha$ -terpineol	1188	1191	0,22	t	t	0,32	t	t	0,37
timol, éter									
metílico	1235	1235	5,26	4,99	3,31	4,64	3,81	3,52	5,28
timol	1290	1291	3,21	2,40	3,69	13,30	15,37	2,07	2,79
carvacrol	1299	1303	46,53	50,44	46,61	32,31	40,68	39,24	47,30
acetato de									
carvacrol	1376	1372	1,33	6,7	0,06	0,08	0,07	0,51	3,14
$\alpha$ -copaeno	1376	1382	0,13	0,04	-	t	t	t	t
$\beta$ -elemeno	1390	1397	-	-	-	t	t	t	t
E-cariofileno	1419	1423	1,26	0,59	6,87	4,88	7,56	6,02	1,91
aromadendreno	1441	1443	t	0,31	1,10	0,75	1,01	t	0,33
$\alpha$ -humuleno	1454	1457	0,25	0,05	0,89	0,40	0,41	0,47	0,24
germacreno D	1485	1487	0,19	t	t	0,63	0,96	t	t
viridifloreno	1496	1491	t	0,20	1,23	1,03	1,32	1,21	t
biciclogermacreno	1500	1497	0,08	0,59	1,81	1,57	2,67	2,40	0,91

espatulenol	1578	1580	0,14	0,11	0,70	0,72	1,09	1,14	0,31
óxido de									
cariofileno	1583	1586	0,71	0,23	1,92	1,44	1,70	1,40	0,44
viridiflorol	1592	1595	0,08	0,14	0,43	0,25	0,43	0,35	0,15
Porcentagem de monoterpenos			68,23	66,48	71,88	64,77	67,12	67,03	65,41
Porcentagem de sesquiterpenos			29,66	29,24	25,87	31,08	29,53	32,17	31,28
Total de compostos identificados			97,89	95,72	97,75	95,85	96,65	99,20	96,69

\*t = traços, - = ausência do constituinte

Os acessos de JEQ, SSE e NIT apresentaram composição do óleo essencial rica em monoterpenos, próximo ao quimiotipo C, descrito por Stashenko et al. (2010), tendo como constituinte majoritário o timol, variando de 43,93 a 68,55% (Tabela 5). A ocorrência do timol como constituinte majoritário do óleo essencial da espécie também foi reportada por outros pesquisadores. Maia et al. (2005) encontraram esse quimiotipo em amostras da espécie providas de Roraima. Queiroz et al. (2014) encontraram resultado similar em espécimes crescidos em Minas Gerais. Vários relatos mostram a abundante ocorrência desse quimiotipo na Colômbia (ESCOBAR et al., 2010; STASHENKO et al., 2010; VICUÑA et al., 2010).

O óleo essencial produzido pela população de MUC teve como componente majoritário o sesquiterpeno E-nerolidol com proporção de 59% (Tabela 5). O E-nerolidol também foi um dos compostos majoritários no quimiotipo que foi descrito por Ribeiro et al. (2014), quando avaliavam a composição química do óleo essencial em indivíduos da espécie originários de Paraupabas no Pará, na estação seca. Entretanto, a quantidade encontrada desse composto foi menor (46,7%) e outros compostos encontrados por eles não foram encontrados no óleo essencial desse acesso, como o cinamato de metila e 1,8-cineol. O E-nerolidol também foi encontrado em quantidade considerável (23,6%) no óleo essencial de *L. origanoides*, segundo Maia et al. (2005).

Tabela 5. Índice de Kovats e percentual dos compostos identificados nos óleos essenciais obtidos de populações naturais de *Lippia origanoides* Kunth. coletadas nos Estados da Bahia e Pernambuco, classificados como quimiotipo rico em timol e quimiotipo rico em E-nerolidol. Feira de Santana, Bahia, 2018.

Composto	IK <sub>lit</sub>	IK <sub>calc</sub>	Jequié	Sento Sé	Nova Itarana	Mucugê
$\alpha$ -tujeno	939	929	0,38	0,19	0,66	-
$\alpha$ -pineno	939	937	0,42	0,32	0,81	1,54
canfeno	954	959	t	t	0,83	t
sabineno	975	976	t	t	0,29	t
$\beta$ -pineno	979	980	0,06	t	0,26	0,10
$\beta$ -mirceno	990	990	1,63	1,95	2,16	0,08
$\alpha$ -felandreno	1002	1005	t	t	-	-
$\delta$ -3-careno	1011	1012	t	t	-	-
$\alpha$ -terpineno	1017	1018	0,39	0,27	0,60	-
p-cimeno	1024	1026	11,46	12,75	17,69	t
limoneno	1029	1031	0,33	0,42	0,70	t
$\beta$ -felandreno	1029	1033	t	t	-	t
1,8-cineol	1031	1034	3,07	t	3,09	t
Z- $\beta$ -ocimeno	1037	1039	-	-	-	0,14
E- $\beta$ -ocimeno	1050	1049	0,04	t	-	0,94
$\gamma$ -terpineno	1059	1061	1,71	1,07	2,47	t
terpinoleno	1088	1093	-	t	0,11	t
linalol	1098	1098	0,55	0,22	0,82	4,03
cânfora	1146	1146	-	t	0,69	t
borneol	1169	1169	0,14	t	1,11	t
terpinen-4-ol	1177	1178	0,70	0,65	0,85	t
$\alpha$ -terpineol	1188	1191	0,29	t	0,33	t
timol, éter metílico	1235	1235	5,09	4,18	2,51	t
timol	1290	1291	53,41	68,55	43,93	0,64
carvacrol	1299	1303	7,89	5,59	0,51	0,17
acetato de carvacrol	1376	1372	-	0,16	t	-
$\alpha$ -copaeno	1376	1382	-	t	0,12	1,09
$\beta$ -elemeno	1390	1397	-	t	0,23	0,17
E-cariofileno	1419	1423	4,61	0,94	5,53	5,36
(E)- $\beta$ -farneseno	1456	1458	-	-	-	4,40
aromadendreno	1441	1443	0,69	t	0,94	-
aromadendrano, dehidro	1462	1465	-	-	-	0,45
$\alpha$ -humuleno	1454	1457	0,40	t	0,69	-
germacreno D	1485	1487	t	t	-	3,97

viridifloreno	1496	1491	0,31	t	0,53	-
biciclogermacreno	1500	1497	0,97	t	1,92	2,51
elemenol	1549	1556	-	-	-	1,91
E-nerolidol	1563	1570	-	t	-	59,0
espatulenol	1578	1580	0,53	0,07	1,12	1,08
óxido de cariofileno	1583	1586	2,46	1,10	4,40	1,10
viridiflorol	1592	1595	0,33	0,07	0,35	0,56
guaiol	1600	1602	-	-	0,50	0,38
y-eudesmol	1632	1635	-	-	-	0,46
eudesmol, dihidro	1662	1661	-	-	-	1,19
cubenol	1646	1647	-	-	-	0,63
(2Z,6E)-farnesol	1723	1720	-	-	-	1,62
Porcentagem de monoterpenos			69,44	66,57	63,47	51,67
Porcentagem de sesquiterpenos			25,25	31,95	33,24	41,82
Total dos compostos identificados			94,69	98,52	96,71	93,49

\*t – traços, - ausência do constituinte

Os demais acessos apresentaram óleos essenciais com composição química que não se enquadra em nenhum dos quimiotipos conhecidos da espécie (Tabela 6). Os acessos de JER, PAL e RCO apresentaram óleo essencial tendo como constituinte majoritário o sesquiterpeno E-cariofileno (15,46 – 34,1%). A ocorrência desse composto nos óleos essenciais produzidos por *L. origanoides* é comum, embora nem sempre como majoritário. Tozin et al. (2015) encontraram indivíduos da espécie que apresentaram óleo essencial rico em E-cariofileno, entretanto, na maioria dos indivíduos analisados o  $\alpha$ -humuleno,  $\delta$ -cadineno,  $\gamma$ -selineno e 7-*epi*- $\alpha$ -selineno também foram encontrados em proporções consideráveis ou a porcentagem do E-cariofileno era muito elevada, diferindo dos acessos encontrados nesse estudo. Apesar de apresentarem o mesmo composto majoritário a colocação das três populações no mesmo quimiotipo é incerta, pois a proporção de E-cariofileno é muito variável, e os demais constituintes apresentam muita discrepância. O monoterpeno  $\alpha$ -pineno é o segundo constituinte majoritário dos óleos essenciais oriundos de JER e PAL (12,50 - 14,92%), enquanto é apenas um traço no óleo essencial obtido na população de RCO. A maior proporção dos sesquiterpenos germacreno-D, biciclogermacreno, espatulenol e óxido de cariofileno na composição do óleo essencial da população coletada em RCO é outra divergência.

O óleo essencial oriundo da população de QUI teve como constituinte majoritário o carvacrol (20,40%), mas a proporção apresentada desse constituinte não é suficiente para enquadrar essa população como pertencente ao quimiotipo B (STASHENKO et al., 2010). Além disso, essa população apresentou grande proporção do monoterpene oxigenado cânfora (17,02%) e do monoterpene canfeno (8,46%) que ocorrem em quantidades baixíssimas nas demais populações (Tabela 6).

A população de MCH apresentou óleo essencial rico nos sesquiterpenos elemenol (29,97%) e eudesmol, dihidro (20,72%) (Tabela 6). Apesar de apresentar óleo essencial com grande proporção de sesquiterpenos, o constituinte majoritário do óleo essencial provindo da amostra de UTI tem como constituinte majoritário o monoterpene oxigenado linalol (81,76%), diferindo das demais composições química conhecidas da espécie (Tabela 6). Por fim, a população de SBR apresentou óleo essencial tendo o monoterpene oxigenado acetato de linalol (70,62%) como constituinte majoritário (Tabela 6).

Apesar de não serem conhecidos na literatura científica quimiotipos de *L. origanoides* que tenham essas substâncias como majoritárias na composição dos óleos essenciais (cânfora, elemenol, linalol e acetato de linalol), a ocorrência deles em menores quantidades no óleo essencial de *L. origanoides* e de outras espécies do gênero é comum, como em *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e *Lippia javanica* (Burm.) Spreng (MAIA et al., 2005; TAVARES et al., 2005; VILJOEN et al., 2005; TOZIN et al., 2015).

Tabela 6. Índice de Kovats e percentual dos compostos identificados nos óleos essenciais obtidos de populações naturais de *Lippia origanoides* Kunth. coletadas nos Estados da Bahia e Pernambuco, que não se enquadram entre os quimiotipos já descritos. Feira de Santana, Bahia, 2018.

Composto	IK <sub>lit</sub>	IK <sub>cal</sub>	Quixabeira	Jeremoabo	Palmeiras	Rio de Contas	Santa Brígida	Utinga	Morro
									do Chapéu
$\alpha$ -tujeno	931	929	0,21	t	t	0,82	t	-	t
$\alpha$ -pineno	939	937	0,85	12,50	14,92	t	5,58	0,4	4,18
canfeno	954	959	8,46	1,16	t	t	t	t	t
sabineno	975	976	0,19	0,16	0,25	t	t	t	0,27
$\beta$ -pineno	979	980	0,77	0,68	2,54	t	0,25	t	1,08
$\beta$ -mirceno	990	990	1,99	1,38	0,22	t	0,35	t	t
$\alpha$ -felandreno	1002	1005	-	3,25	t	t	t	-	t
$\delta$ -3-careno	1011	1012	-	3,94	t	t	0,06	-	t
$\alpha$ -terpineno	1017	1018	0,66	3,40	t	t	t	-	t
p-cimeno	1024	1026	8,41	2,99	0,55	t	1,41	-	t
limoneno	1029	1031	2,87	0,45	1,02	t	0,41	t	0,37
$\beta$ -felandreno	1029	1033	-	1,74	t	t	t	-	t
1,8-cineol	1031	1034	2,96	-	t	t	t	-	0,30
Z- $\beta$ -ocimeno	1037	1039	-	-	-	0,49	-	0,09	-
E- $\beta$ -ocimeno	1050	1049	t	t	1,72	t	0,54	0,31	t
g-terpineno	1059	1061	2,93	2,61	t	t	1,49	-	t
terpinoleno	1088	1093	0,85	1,42	-	t	-	-	t
linalol	1098	1098	0,91	0,93	0,57	0,68	0,55	81,76	0,30
cânfora	1146	1146	17,02	t	0,23	t	t	-	t
borneol	1169	1169	4,02	t	0,18	t	t	-	t
terpinen-4-ol	1177	1178	0,42	0,34	0,27	t	t	-	t
$\alpha$ -terpineol	1188	1191	0,25	0,43	-	t	t	-	t
timol, éter metílico	1235	1235	1,72	t	t	t	0,20	-	t
acetato de bornila	1288	1287	-	0,19	-	-	-	-	0,36
neral	1238	1240	-	-	-	-	0,32	-	-
acetato de linalol	1257	1259	-	0,24	-	-	70,62	-	-
geranial	1267	1269	-	0,49	-	-	-	-	-
timol	1290	1291	0,96	2,10	6,73	1,14	t	-	0,94
carvacrol	1299	1303	20,40	-	0,89	0,31	1,30	-	0,92
acetato de carvacrol	1376	1372	t	0,88	t	-	-	-	t
$\alpha$ -copaeno	1376	1382	0,47	-	2,53	2,04	1,05	0,23	0,71
$\beta$ -copaeno	1432	1432	-	-	-	0,93	-	-	0,25
$\beta$ -elemeno	1390	1397	0,55	-	1,13	-	-	0,46	0,41
E-cariofileno	1419	1423	6,62	34,1	18,97	15,46	4,41	3,26	13,56

$\beta$ -gurgujeno	1433	1434	-	-	0,98	-	-	-	-
aromadendreno	1441	1443	0,71	-	t	0,70	-	-	t
aromadendrano, dehidro	1462	1465	-	-	-	-	0,24	0,08	-
amorfa-4,7(11)- dieno	1481	1481	-	-	-	-	0,21	0,07	-
$\alpha$ -humuleno	1454	1457	0,59	4,34	1,30	1,38	0,99	0,47	2,58
allo- aromadendreno	1460	1463	-	-	1,69	1,88	-	-	-
$\gamma$ -muuroleno	1479	1480	-	0,68	1,72	2,54	-	-	-
germacreno D	1485	1487	0,49	0,75	6,99	10,57	-	1,99	1,94
viridifloreno	1496	1491	1,18	2,54	-	0,50	-	-	-
biciclogermacre no	1500	1497	5,17	-	5,5	7,08	1,56	1,61	1,62
$\delta$ -cadineno	1523	1526	-	-	-	4,98	-	-	0,97
elemenol	1549	1556	-	0,65	-	t	-	2,54	29,97
E-nerolidol	1563	1570	-	-	0,20	t	-	-	-
espatulenol	1578	1580	1,37	1,17	3,69	8,29	0,44	0,83	0,56
óxido de cariofileno	1583	1586	1,00	0,48	6,21	9,44	0,44	1,15	1,83
viridiflorol	1592	1595	0,67	1,06	1,25	2,22	0,18	t	0,30
guaiol	1600	1602	-	-	t	0,94	-	t	1,75
$\gamma$ -eudesmol	1632	1635	-	-	-	-	-	-	5,92
eudesmol, dihidro	1662	1661	-	0,69	1,02	3,55	-	1,38	20,72
cubenol	1646	1647	-	-	3,02	1,26	-	0,21	-
<hr/>									
Porcentagem de monoterpenos			63,32	63,35	49,59	43,68	68,14	36,28	58,07
Porcentagem de sesquiterpenos			31,66	24,36	36,65	33,20	24,52	60,46	35,73
Total de compostos identificados			94,98	87,71	86,24	76,88	92,66	96,74	93,80

\*t – traços, - ausência do constituinte

Devido à complexidade apresentada na composição química dos óleos essenciais obtidos dos acessos de *L. origanoides* foram utilizadas técnicas de estatística multivariada como a análise de componentes principais (ACP) e agrupamento pelo método Ward para melhor compreensão dos resultados. Devido à grande variação na composição dos óleos essenciais obtidos nesse estudo, com elevado número de variáveis nulas foram excluídos das análises os compostos com valores nulos e de baixa contribuição, utilizando-se o critério de KMO. Após a seleção dos compostos adequados, os compostos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -mirceno, p-

cimeno,  $\gamma$ -terpineno, terpinen-4-ol, carvacrol, E-cariofileno, biciclogermacreno, espatulenol, óxido de cariofileno e viridiflorol foram utilizados para fazer a análise de componentes principais (ACP).

Dessa forma, verificou-se que os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) foram responsáveis por 76,02% da variação total dos compostos químicos da *L. origanoides*, em que o primeiro componente principal (CP1) foi responsável por 55,66% e o segundo componente principal (CP2), por 20,36% das variações dos dados. Portanto, os dois primeiros componentes principais resumem efetivamente a variância amostral total e faz-se necessário apenas a utilização destes para o estudo do conjunto de dados. O CP1 está representado pelos compostos biciclogermacreno, viridiflorol, espatulenol e óxido de cariofileno. Enquanto o CP2 está representado pelo espatulenol, óxido de cariofileno, viridiflorol, biciclogermacreno e p-cimeno (Figura 5).

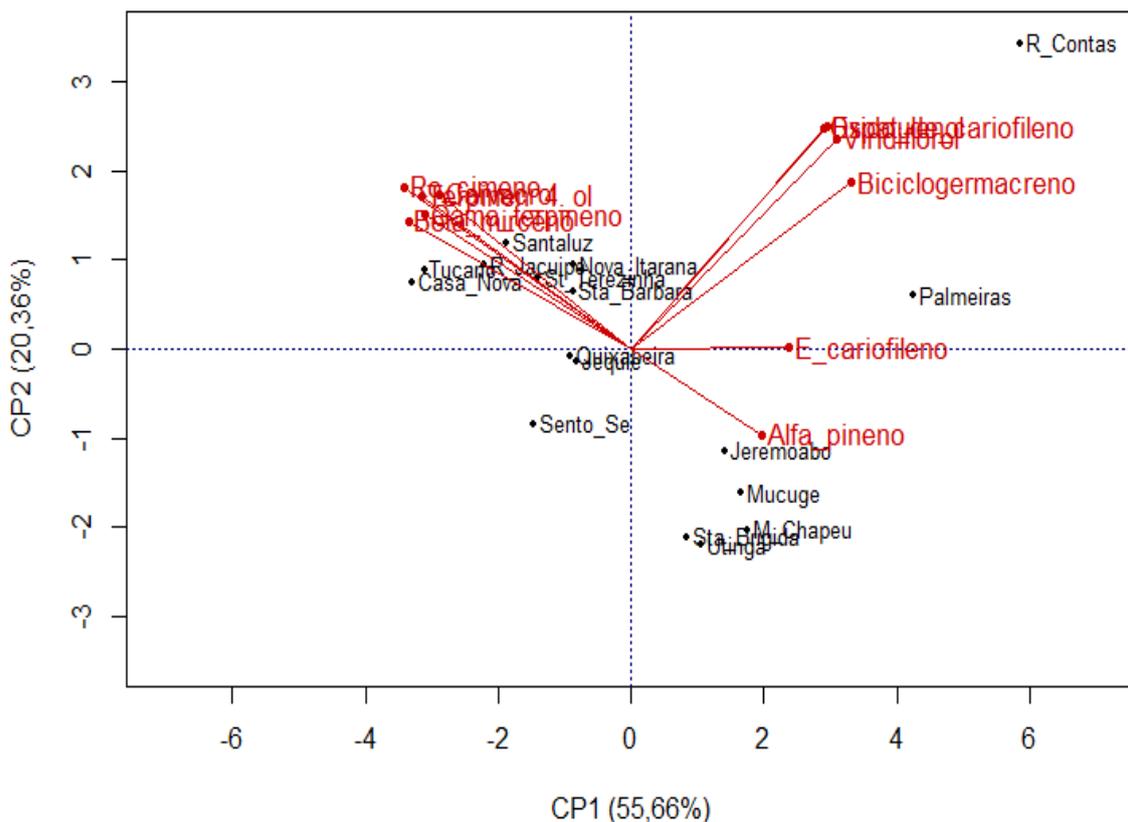


Figura 5. Ordenação dos componentes pela Análise de Componentes Principais (ACP), gerada a partir de 11 variáveis obtidas da análise química dos óleos essenciais oriundos de 18 acessos de *Lippia origanoides* Kunth, coletados nos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, 2018.

De acordo com a análise dos componentes principais foi possível observar a proximidade de acessos com a composição química mais parecida. No primeiro quadrante, de forma esparsa, ficaram os acessos RCO e PAL, ambos com o cariofileno como composto majoritário, entretanto, a maior distância observada do acesso de RCO deve-se a baixa quantidade de  $\alpha$ -pineno, fato que aproxima mais o acesso de PAL do acesso de JER (Figura 5). No segundo quadrante, formando um grupo coeso, ficaram os acessos ricos em carvacrol (SLU, RJA, TUC, CNO, STE, SBA) e o acesso de NIT. Apesar de não possuir grande quantidade de carvacrol, o acesso de NIT apresentou valores de p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno mais próximos desses acessos (Figura 5). No terceiro quadrante ficaram os acessos ricos em timol (SSE e JEQ) e o acesso de QUI. Provavelmente, o acesso de QUI ficou separado dos demais acessos ricos em carvacrol por apresentar menor valor deste composto, bem como de p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno assemelhando-se mais aos acessos SSE e JEQ. Os demais acessos formaram um grupo no quarto quadrante. Esses acessos possuem semelhanças na ausência ou baixa proporção dos compostos carvacrol, p-cimeno, terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpineno e  $\beta$ -mirceno, além de todos apresentarem E-cariofileno no óleo essencial, alguns em maior quantidade como o acesso de JER e outros em menor quantidade como o acesso de UTI (Figura 5).

Com base nos mesmos compostos que foram utilizados na ACP foi feita uma análise de agrupamento baseando-se no método Ward (Figura 6). No dendrograma foram formados cinco grupos, onde a distribuição dos acessos apresentou semelhanças ao que foi visto na ACP, entretanto, possibilitou maior clareza na distribuição dos acessos. O primeiro grupo foi composto pelos acessos ricos em timol (NIT, SSE, JEQ) e pelo acesso de QUI, que é rico em cânfora. A proximidade desse acesso aos demais do grupo se deve aos valores parecidos de alguns compostos não majoritários, como já citado acima. O segundo grupo abarcou todos os acessos ricos em carvacrol (SLU, RJA, CNO, STE, SBA). O terceiro segmento foi formado apenas pelo acesso de RCO que é rico em E-cariofileno. No quarto grupo ficaram os acessos de MUC, UTI, MCH e SBR, que são agrupados pela baixa quantidade dos compostos carvacrol, p-cimeno, terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpineno e  $\beta$ -mirceno. O último grupo foi formado pelos acessos oriundos de PAL e JER, que são ricos em E-cariofileno e  $\alpha$ -pineno.

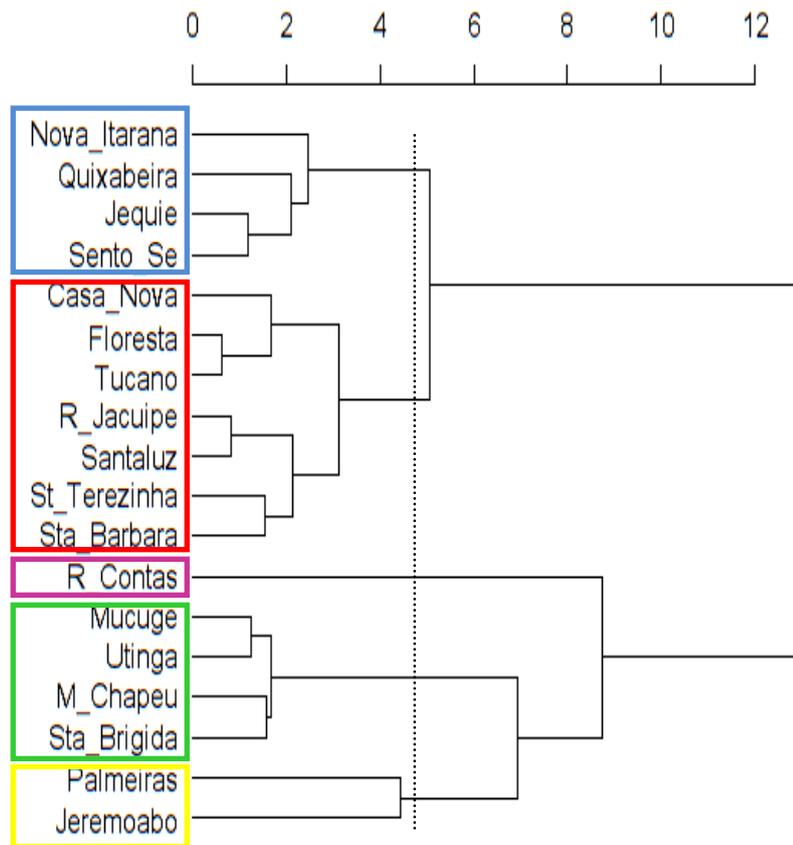


Figura 6. Dendrograma formado pelo método Ward, com base na distância Euclidiana, gerada a partir de 11 variáveis obtidas da análise química dos óleos essenciais oriundos de 18 acessos de *Lippia organoides* Kunth. coletados nos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, 2018.

Apesar de alguns compostos majoritários não terem entrado na ACP e na análise de agrupamento pelo método Ward, a formação dos grupos foi muito parecida com a discriminação sugerida com base nos compostos majoritários. Portanto, diante dos resultados obtidos, tanto a partir dos dados gerais quanto das análises estatísticas, sugere-se a separação dos 18 acessos de *L. organoides* em: 1) quimiotipo rico em carvacrol (SLU, RJA, CNO, STE, SBA); 2) quimiotipo rico em timol (SSE, JEQ e NIT); 3) quimiotipo rico em cânfora (QUI); 4) quimiotipo rico em E-cariofileno (RCO); 5) quimiotipo rico em E-cariofileno e  $\alpha$ -pineno (PAL e JER); 6) quimiotipo rico em E-nerolidol (MUC); 7) quimiotipo rico em elemenol (MCH); 8) quimiotipo rico em acetato de linalol (SBR) e 9) quimiotipo rico em linalol (UTI).

### 3.3.3 Relação entre as características ambientais e a diversidade química

Além da predisposição genética, diferenças na composição dos óleos essenciais de uma espécie podem ser resultado da plasticidade fenotípica, que varia de acordo com os fatores ambientais e edáficos do local de coleta da planta (SARRAZIN et al., 2015). Os estímulos decorrentes do ambiente podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Pesquisas publicadas mostram que a composição do óleo essencial de *L. origanoides* apresentou variações em razão de alterações nos compostos químicos dos solos e de fatores ambientais (TELES et al., 2014a; MARTINEZ-NATARÉN et al., 2014; DELGADO-OSPINA et al., 2015). Dessa forma, feita a ACP com os dados fitoquímicos e verificado que o CP1 representa mais de 50% da variação, optou-se pelo uso deste para fazer a análise univariada e correlação de Pearson com as variáveis ambientais mensuráveis e as variáveis edáficas, com a finalidade de avaliar a influência dessas variáveis sobre a composição química do óleo essencial dos diferentes acessos (Tabela 7).

Tabela 7 - Correlação de Pearson do primeiro componente principal (CP1) com as variáveis ambientais e edáficas (pH em água, P – fósforo, K – potássio, Ca - cálcio, Mg – magnésio, Al – alumínio, H\_Al - acidez trocável, Na – sódio, SB - soma de bases trocáveis, CTC - capacidade de troca catiônica, V- saturação por bases, MO - matéria orgânica) obtidas nos sítios de coleta dos 18 acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados nos Estados da Bahia e Pernambuco. Feira de Santana, 2018.

<b>Variáveis Ambientais</b>	<b>Coefficiente de Pearson</b>
CP1 - Temperatura	0,31
CP1 - Pluviosidade	-0,21
CP1 - Altitude	-0,42
<b>Variáveis Edáficas</b>	<b>Coefficiente de Pearson</b>
CP1 – pH	- 0,40
CP1 – P	- 0,16
CP1 – K	- 0,41
CP1 – Ca	- 0,36
CP1 – Mg	- 0,46
CP1 – Al	0,71
CP1 – H_Al	0,44
CP1 – Na	- 0,36
CP1 – SB	-0,40
CP1 – CTC	-0,21
CP1 – V	- 0,62
CP1– MO	0,36

\*Valores-padrão para interpretação do coeficiente de Pearson - 0,0 a 0,3 correlação desprezível; 0,3 a 0,5 correlação fraca; 0,5 a 0,7 correlação moderada; 0,7 a 0,9 correlação forte; 0,9  $\geq$  correlação muito forte.

Os resultados da análise de correlação das variáveis ambientais estão representados por coeficientes de correlação de Pearson muito baixos, tanto positivamente quanto negativamente, mostrando que os compostos químicos não foram influenciados por estas condições. Quanto às variáveis edáficas, a maior parte também apresentou coeficientes baixos, indicando que não existe correlação entre elas e os compostos do CP1. Entretanto, as variáveis Al e saturação de bases apresentaram coeficientes que indicam uma correlação moderada com a composição química dos óleos essenciais, sendo de natureza positiva para a concentração de Al e negativa para a variável saturação de bases.

Diante dos resultados, pode-se inferir que a variação encontrada na composição química dos óleos essenciais dos 18 acessos de *L. origanoides* sofre certa influência pela

concentração de Al e valor de saturação de bases, com maior ocorrência de quimiotipos ricos em carvacrol e timol em locais com solos menos ácidos e mais férteis, enquanto outros quimiotipos da espécie foram encontrados em sítios com maior acidez e menor fertilidade. Dessa forma, a produção diferenciada dos óleos essenciais dos acessos de RCO, PAL, JER, UTI e MCH, possivelmente, pode ser em função da concentração da saturação de bases que ocorrem nos solos desses sítios. Um solo que apresenta baixo valor de saturação de bases significa que existe uma maior adsorção de Al e H e quantidades menores dos cátions básicos Ca, Mg e K, adsorvidos nos coloides do solo (BRADY e WEIL, 2012).

Todavia, a correlação dessas duas variáveis edáficas (Al e saturação de bases) não é o único fator determinante na composição química dos óleos essenciais da espécie, visto que os acessos de MUC, SBR e QUI ocorreram em locais com baixas concentrações de Al e maiores valores de saturação de bases e mesmo assim apresentaram óleos essenciais com composição química diferenciada, indicando que a diversidade química pode ser ocasionada por outros fatores externos que não foram avaliados, como defesa contra herbivoria, e pela variação genética da espécie. No estudo com *L. origanoides* feito por Tozin et al. (2015) a composição química do óleo essencial de indivíduo crescido nas proximidades de uma colônia de formigas apresentou o 1,8-cineol como constituinte majoritário, diferindo da composição química encontrada no óleo essencial dos demais indivíduos analisados, possivelmente essa variação foi ocasionada pelo ataque das formigas, visto que essa substância é tóxica para insetos, evidenciando a influência da herbivoria sobre a variação química da espécie. Outros estudos com *L. origanoides* que avaliaram a influência climática sobre a ocorrência de quimiotipos da espécie também sugerem que esses perfis químicos são diretamente influenciados pela variabilidade genética na espécie, não sendo apenas resultado de adaptações da espécie a ambientes distintos (VEJA-VELA et al., 2013; MARTINEZ-NATARÉN et al., 2014).

Todavia, os pesquisadores afirmam que mais estudos sobre diversidade genética relacionada à variação fitoquímica são necessários para compreender como a influência genética, conjuntamente com os estímulos ambientais, determinam a quantidade e a qualidade do óleo essencial nesta espécie economicamente importante (MARTINEZ-NATARÉN et al., 2014). O cultivo padronizado de acessos e posterior análise da composição química dos óleos essenciais tem sido um auxílio para indicar quando a diversidade genética é a causa principal da variação fitoquímica. Um estudo desse tipo seria indicado para avaliar com clareza as causas da diversidade química encontrada nos acessos de *L. origanoides*.

Os resultados obtidos neste estudo, além de aumentar o conhecimento acerca da espécie, poderão auxiliar na implantação de coleções de germoplasma de *L. origanoides*, visto que conservar corretamente o germoplasma de uma espécie depende de uma série de fatores, sendo o estabelecimento de locais de coleta que tenham material diferenciado da espécie um fator imprescindível. Por tratar-se de uma espécie aromática, a utilização de *L. origanoides* está relacionada com a produção e composição dos óleos essenciais sintetizados. Dessa forma, pode-se afirmar que os sítios de QUI, PAL, JER, MUC, MCH, SBR e UTI são locais promissores para obtenção de germoplasma da espécie.

Apesar das variáveis ambientais avaliadas (altitude, pluviosidade e temperatura) não estarem diretamente relacionadas com a composição química dos óleos essenciais, esse conhecimento, juntamente com a ocorrência da espécie quanto ao bioma, vegetação, clima e classificação de solo, também pode ser útil para a conservação de germoplasma. Por meio dos dados ambientais levantados é possível fazer predições que indiquem outros locais de ocorrência espontânea da espécie, aumentando as chances de coletas de germoplasma bem-sucedidas (BOLDT, 2014). Quanto ao cultivo da espécie, apesar da análise química do solo mostrar que a espécie possui plasticidade suficiente para sobreviver em solos com oferta nutricional variável, a influência da concentração de Al e valores de saturação de bases na diversidade química é um incentivo para a efetuação de estudos com diferentes níveis/tipos de calagem e adubação na espécie, com a finalidade de obter óleos essenciais com a composição química desejada.

### 3.4 Conclusão

O estudo mostrou que *Lippia origanoides* Kunth. na área percorrida ocorre predominantemente em locais áridos e quentes, pertencentes ao bioma Caatinga, em áreas antropizadas com solos mal drenados e intemperizados. Os óleos essenciais obtidos das diferentes populações apresentaram composição química bastante variada, sendo identificados os quimiotipos ricos em carvacrol, timol e E-nerolidol, já reportados para a espécie. Entretanto, foram encontrados óleos essenciais que apresentaram altas porcentagens de cânfora, elemenol, E-cariofileno, linalol e acetato de linalol, podendo indicar a ocorrência de novos quimiotipos para *L. origanoides*.

Considerando os fatores estudados, pode-se inferir que a variação na composição química dos óleos essenciais resulta das diferentes condições edáficas em que a espécie ocorre, com ênfase para a concentração de alumínio e saturação por bases.

As informações acerca dos perfis químicos apresentados indicam que os acessos oriundos de Quixabeira, Palmeiras, Jeremoabo, Mucugê, Morro do Chápeu, Santa Brígida e Utinga são áreas prioritárias para a conservação e coleta de germoplasma de *L. origanoides*, com o intuito de preservar a diversidade genética da espécie.

### 3.5 Referências

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4<sup>ed</sup>. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 804 p, 2007.
- ARAÚJO, M. A.; PEDROSO, A. V.; AMARAL, D. C.; ZINN, Y. L. Paragênese mineral de solos desenvolvidos de diferentes litologias na Região Sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 11 - 25, 2014.
- BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. 3<sup>ed</sup>. Porto Alegre, Brasil: Bookman, 667 p, 2012.
- BRANDÃO, Y. K. F. S. **Tolerância e potencial fitorremediador de *Lippia gracilis* Schauer em substrato contaminado com chumbo**. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, 2016.
- BOLDT, A. S. **Coleções nucleares e associação do teor de óleo de cártamo com variáveis ecogeográficas por inteligência computacional**. 2014. 67 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- CARDOSO, G. L.; LOMÔNACO, C. Variações fenotípicas e potencial plástico de *Eugenia calycina* Cambess. (Myrtaceae) em uma área de transição cerrado-vereda. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 131 - 140, 2003.
- 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 541 - 544, 2004.
- DOS SANTOS, F. J. B.; LOPES, J. A. D.; CITO, A. M. G. L.; OLIVEIRA, E. H.; LIMA, S. G.; REIS, F. A. M. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. **Journal Essential Oil Research**, v.16, p. 504 - 506, 2004.
- DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; TOMAZONI, J. C. Diagnóstico ecogeográfico da ocorrência de jabuticabeiras nativas no sudoeste do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 746 - 753, 2010.

DELGADO-OSPINA, J.; MENJIVAR-FLORES, J. C.; SANCHEZ, M. S.; BONILLA-CORREA, C. R. Efecto de la fertilización em la producción de matéria seca y extracción de nutrientes em três acepciones de *Lippia origanoides* H.B.K. **Acta Agronômica**, v. 61, n. 4, p. 331 - 338, 2012.

DELGADO-OSPINA, J.; MENJIVAR-FLORES, J. C.; SANCHEZ, M. S.; BONILLA-CORREA, C. R. Influencia de la fertilización en la producción y composición del aceite esencial de *Lippia origanoides* HBK (orégano criollo). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 3, p. 335 - 347, 2015.

ESCOBAR, P.; LEAL S. M.; HERRERA, L. V.; MARTINEZ J. R.; STASHENKO E. E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia spp* essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 184 - 190, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de Climas do Brasil**: Primeira aproximação. Rio de Janeiro: IBGE. Escala 1:5.000.000. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de Biomas do Brasil**: Primeira aproximação. Rio de Janeiro: IBGE. Escala 1:5.000.000. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de Vegetação do Brasil**: Primeira aproximação. Rio de Janeiro: IBGE. Escala 1:5.000.000. 2013.

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. H. L.; ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M. M. Essential oil variation in *Lippia glandulosa* Schauer. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 676 - 680, 2005.

MARTÍNEZ-NATARÉN, D. A.; PARRA-TABLA, V.; FERRER-ORTEGA, M. M.; CALVO-IRABIÉN, L. M. Genetic diversity and genetic structure in wild populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) and its relationship with the chemical composition of the essential oil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, p. 535 - 547, 2014.

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 Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 24 - 32, 2009.

MEIRA, M. R. **Ecogeografia e diversidades genética e química de *Lippia aff. rotundifolia* Cham.** 2016. 159 f. Tese (Doutorado em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

MENDES, A. D. R.; NASCIMENTO, C. R.; QUEIROZ, T. B.; PINTO, V. B.; MARTINS, E. R. Ecogeografia de populações de erva-baleeira (*Varronia curassavica*) no Norte e Vale do Jequitinhonha em Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 3, p. 418 - 424, 2015.

MENESES, R.; TORRES, F. A.; STASHENKO, E. E.; OCAZONEZ R. E. Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. **Salud UIS**, v. 41, p. 236 - 243, 2009.

O'LEARY, N.; DENHAM, S. S.; SALIMENA, F.; MÚLGURA, M. E. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, p. 197 - 219, 2012.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236 - 240, 2007.  
PARRA, A. A. C.; LÓPEZ, N. F. R. Respuestas fenotípicas de *Lippia alba* Y *Lippia organoides* (Verbenaceae) a la disponibilidad de agua en el suelo. **Acta Biologica Colombiana**, v. 13, n. 3, p. 133 - 148, 2008.

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

PINTO, C. P.; RODRIGUES, V. D.; PINTO, F.P.; PINTO, R. P.; UETANABARO, A. P. T.; PINHEIRO C. S. R.; GADEA, S. F. M.; SILVA, T. R. S.; LUCCHESI, A. M. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective. **Agents Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1 - 6, 2013.

QUEIROZ, M. R. A.; ALMEIDA, A. C.; ANDRADE, V. A.; LIMA, T. S.; MARTINS, E. R.; FIGUEIREDO, L. S.; CARELI, R. T. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia organoides* frente à *Staphylococcus sp.* isolados de alimentos de origem animal. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, v. 16, n. 3, p. 737 - 743, 2014.

RIBEIRO, A. F.; ANDRADE, E. H. A.; SALIMENA, F. R. G.; MAIA, J. G. S. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia organoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 249 - 259, 2014.

SABINO, J. F. P.; REYES, M. M.; BARRERA, C. D. F.; SILVA, A. J. R. Análise e discriminação de quimiotipos de *Lippia graveolens* H.B.K. da Guatemala por microextração em fase sólida, CG-EM e análise multivariada. **Quimica Nova**, v. 35, n. 1, p. 97 - 101, 2012.

SALIMENA, F. R. G., MULGURA, M. 2015. *Lippia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21449>>.

SARRAZIN, S. L. F.; SILVA, L. A. ; OLIVEIRA, R. B.; DIVINA, J. A. R.; SILVA, J. K. R. ; SALIMENA, F. R. G.; MAIA, J. G. S.; MOURÃO, R. H. V. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia organoides* Kunth. **Lipids in Health and Disease**, v. 1, p. 140 - 145, 2015.

STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J. R.; RUIZ, C. A.; ARIAS, G.; DURAN, C.; SALGAR, W. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 93 - 103, 2010.

SILVA, G. C. **Biorreguladores vegetais, substratos e estaquia em *Lippia origanoides* Kunth. (Verbenaceae)**. 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 1 - 5, 2005.

TELES, S.; PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, L. M.; MALHEIRO, R.; MACHADO, S. S.; LUCCHESI, A. M.; SILVA, F. Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia origanoides* H.B.K. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 169 - 176, 2014a.

TELES, S.; PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, L. M.; MALHEIRO, R.; MACHADO, S. S.; LUCCHESI, A. M.; SILVA, F. *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 217 - 225, 2014b.

TOZIN, L. R. S.; MARQUES, M. O. M.; RODRIGUES, T. M. Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia origanoides* Kunth. (Verbenaceae) in the Brazilian Cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 943 - 953, 2015.

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

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

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

VICUÑA, G. C.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, p. 343 - 349, 2010.

VILJOEN, A. M.; SUBRAMONEY, S.; VAN VUUREN, S. F.; BAŞER, K. H. C.; DEMIRCI, B. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1, p. 271 - 277, 2005.

## 4 CAPÍTULO II

**Caracterização morfo-agronômica de diferentes genótipos de *Lippia origanoides* Kunth.  
coletados no Estado da Bahia, Brasil**

**Caracterização morfo-agronômica de diferentes genótipos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados no Estado da Bahia, Brasil**

Emily Verônica Rosa da Silva Feijó; Vanessa Chaves de França; Lenaldo Muniz de Oliveira;  
Tânia Regina dos Santos Silva

**RESUMO** – A espécie *Lippia origanoides* Kunth. tem se destacado pelo grande número de propriedades medicinais comprovadas cientificamente, sendo as ações antimicrobiana, antiviral e antioxidante as mais conhecidas. Entretanto, pouco tem sido feito visando à conservação da espécie, que tem sido obtida unicamente pelo extrativismo. O objetivo desse trabalho foi caracterizar 12 acessos da espécie coletados em diferentes regiões no Estado da Bahia, através de descritores morfo-agronômicos, com a finalidade de avaliar a divergência genética existente entre eles e indicar os acessos mais promissores para a produção de óleo essencial. Após o cultivo por seis meses, foram avaliadas as seguintes características morfológicas: cor do caule (CC), folhas (CF), sépalas (CS) e pétalas (CP), formato da base foliar (FBF), formato do limbo foliar (FLF), formato do ápice foliar (FAF), altura das plantas (AL), largura da copa (LC), área foliar (AF), comprimento (CF) e largura das folhas (LF) e a relação entre as duas variáveis (C/L). Massa foliar fresca (MFF), massa foliar seca (MFS), teor de óleo essencial (TOE) e rendimento de óleo essencial (ROE), foram as características agronômicas avaliadas. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística univariada (Teste de Scott-Knot, 5%) e multivariada (Agrupamento UPGMA e Análise das Variáveis Canônicas). Os resultados mostraram variações nas características morfológicas qualitativas, como coloração das pétalas e formato foliar, bem como diferenças significativas para as variáveis quantitativas, como CF, LF, C/L, AF, MFF, MSF, TOE e ROE. As técnicas multivariadas utilizadas permitiram separar os acessos em quatro grupos distintos de acordo com a proximidade geográfica dos locais de origem. Os acessos Sento Sé, Jaguarari e Tucano são indicados para uso em programas de melhoramento genético da espécie, visando o aumento da produção de óleo essencial.

**Palavras-chave:** Plantas Medicinais e Aromáticas. Verbenaceae. Divergência Genética.

**Morpho-agronomic characterization of different genotypes of *Lippia origanoides* Kunth.  
collected in the State of Bahia, Brazil**

**Abstract** - The species *Lippia origanoides* Kunth. has distinguished itself for its large number of scientifically proven medicinal properties. However, few studies have been done focusing on the conservation of this species, which has been obtained exclusively through extraction. The objective of this project was to characterize 12 accessions of the species collected in different regions in the state of Bahia, through morpho-agronomic descriptors, with the goal of evaluating the genetic divergence that exists between them and indicate the most promising accessions. After cultivation, the following morphological characteristics were evaluated: color of the stalk (CC), leaves (CF), sepals (CF), and petals (CP) of the flowers, the format of the leaf base (FBF), the format of the leaf limb (FLF), the format of the leaf apex (FAF), the height of the plants (AL), the width of the cup (LC), the foliar area (AF), the length (CF) and width of the leaves (LF) and the relation between the two variables (C/L). The fresh foliar mass (MFF), dry foliar mass (MFS), essential oil content (TOE) and essential oil yield (ROE), were the agronomic characteristics evaluated. The results show variations in the qualitative morphological characteristics, such as coloration of petals and leaf format, as well as significant differences in the variables CF, LF, C/L, AF, MFF, MSF, TOE, e ROE. In the multivariate techniques used, the accessions were divided in four distinct groups in accordance with the geographic proximity. The accessions Sento Sé, Jaguarari and Tucano presented elevated production of essential oil.

**Key Words:** Essential Oil. Genetic Divergence. Medicinal and Aromatic Plants.

#### 4.1 Introdução

*Lippia origanoides* Kunth. é um arbusto muito ramificado que ocorre no Brasil, do Maranhão até Minas Gerais, na maioria das vezes em áreas de solos pedregosos e compactos (SALIMENA-PIRES e GIULIETTI, 1998). Essa planta se destaca pela elevada produção de óleo essencial, sendo considerada uma espécie aromática (RIBEIRO et al., 2014). Além disso, a composição química de óleo essencial na espécie é bastante diversificada, diferenciando-se em quimiotipos que variam de acordo com os componentes majoritários do óleo essencial, sendo os mais comuns aqueles que possuem o carvacrol e timol como constituintes majoritários (STASHENKO et al., 2010). O óleo essencial produzido pela espécie teve várias ações comprovadas cientificamente, como a ação antimicrobiana (BITTARA et al., 2009; ESCOBAR et al., 2010), antiviral (MENESES et al., 2009), antioxidante (ARANGO et al., 2012) e repelente (NERIO et al., 2009).

Apesar do grande potencial farmacológico e econômico de *L. origanoides*, sua exploração tem sido realizada de forma extrativista e artesanal (SILVA et al., 2015), o que tem levado à perda da variabilidade genética da espécie, sendo necessárias medidas que visem a conservação e o desenvolvimento de formas mais sustentáveis de exploração.

A etapa de avaliação da variabilidade genética de uma espécie, seja dos materiais contidos em bancos de germoplasma ou de amostras de populações naturais, é extremamente importante para estabelecer estratégias de conservação, organização das coleções e no uso em programas de melhoramento (NASS, 2007). Todavia, sem a correta classificação e conhecimento desta variabilidade e da diversidade existente nas coleções a utilidade do germoplasma é mínima (FIGUEIREDO NETO et al., 2004).

A caracterização do germoplasma pode ser realizada por meio do emprego de caracteres fenotípicos (agronômicos e morfológicos), uso de marcadores moleculares, entre outras formas (VIEIRA et al., 2008). Geralmente, a caracterização morfo-agronômica é realizada inicialmente, para avaliar a existência de variabilidade entre os diferentes acessos. Busca-se descrever os diversos acessos de uma espécie utilizando como descritores características de interesses, tais como: a cor do caule, folhas, nervuras foliares, sépalas e pétalas das flores, início de floração, altura de planta, largura e formato da copa, comprimento e largura das lâminas foliares, relação comprimento/largura, produção de frutos/planta, produção de plantas/ha, produção de óleo/ha, entre outros (OLIVEIRA et al., 2008).

Através da caracterização de acessos é possível observar se existe divergência genética entre os indivíduos analisados. Os estudos de divergência genética são importantes para o conhecimento da variabilidade genética das populações e, conseqüentemente, auxiliar no monitoramento de bancos de germoplasma e na obtenção de dados úteis para uso e conservação dos recursos genéticos vegetais (CRUZ e CARNEIRO, 2006; TOQUICA et al., 2003).

Diversos trabalhos que avaliam a divergência genética através de descritores morfo-agronômicos têm sido desenvolvidos com espécies medicinais, e os resultados encontrados são promissores. Castro et al. (2011) encontraram divergência genética entre os acessos de *Ageratum conyzoides* L. oriundos de diferentes regiões de Tocantins. Do mesmo modo, Mariot et al. (2008) verificaram ampla variabilidade fenotípica entre acessos das espécies *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek e *Maytenus aquifolium* Mart., para todos os caracteres avaliados. Espécies pertencentes ao gênero *Lippia* L. também tem apresentado variabilidade fenotípica, como foi observado nos trabalhos de caracterização morfo-agronômica entre acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (JANNUZZI et al., 2010; CAMÊLO et al., 2011).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi caracterizar 12 acessos de *L. origanoides* que formam a coleção de germoplasma da espécie na Universidade Estadual de Feira de Santana, através de descritores morfológicos e agronômicos, e avaliar a divergência genética entre eles.

## **4.2 Materiais e métodos**

### **4.2.1 Coleta e formação da coleção de germoplasma da espécie**

As expedições de coleta foram realizadas no ano de 2014 em municípios do Estado da Bahia, a partir de levantamentos realizados em Herbários. Após a localização das populações foram coletados cinco indivíduos escolhidos aleatoriamente em cada população (Tabela 1). Os indivíduos foram transplantados para vasos plásticos com capacidade para 5 litros, preenchidos com solo extraído do próprio local da coleta, envoltos em sacos plásticos e transportados para o Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia, Brasil. Em seguida, foram mantidos em casa de vegetação com rega constante até o pleno desenvolvimento. Foram coletados indivíduos de 19 populações naturais de *L. origanoides*, entretanto, apenas doze acessos foram cultivados com sucesso, formando o banco de germoplasma da espécie (Tabela 1).

Tabela 1. Município de origem, sigla de identificação, coordenadas geográficas, altitude dos sítios de coleta dos 12 acessos da coleção de germoplasma de *Lippia origanoides* Kunth. Feira de Santana, Bahia, 2018.

<b>Município/Estado</b>	<b>Sigla de identificação</b>	<b>Longitude (O)</b>	<b>Latitude (S)</b>	<b>Altitude (m)</b>
Santa Terezinha/BA	STE	39°32'14,8"	12°35'46,8"	140
Jequié/BA	JEQ	40°03'28,6"	13°45'54,0"	346
Nova Itarana/BA	NIT	39°56'05,6"	12°58'22,0"	526
Quixabeira/BA	QUI	40°07'39,1"	11°20'03,9"	396
Riachão do Jacuípe/BA	RJA	39°26'12,6"	11°46'54,6"	193
Santa Brígida/BA	SBR	38°15'43,9"	09°50'16,4"	397
Jaguarari/BA	JAG	40°13'58,0"	10°05'20,4"	543
Santa Bárbara/BA	SBA	38°58'15,5"	12°01'04,5"	270
Santaluz/BA	SLU	39°24'50,0"	11°12'30,4"	348
Sento Sé/BA	SSE	41°53'06,0"	09°44'45,0"	400
Jeremoabo/BA	JER	38°17'54,4"	10°13'35,7"	227
Tucano/BA	TUC	38°49'23,7"	11°01'25,5"	354

#### 4.2.2 Propagação

Após 12 meses de cultivo as plantas matrizes foram propagadas vegetativamente, através de estaquia caular, buscando assegurar as características genéticas de cada acesso. Foram utilizadas estacas apicais com aproximadamente 10 cm de comprimento, que tiveram sua parte basal embebidas em solução de AIB (278mg/L), durante 24 horas, segundo a metodologia de Silva (2012) (Figura 1A). O plantio foi realizado em bandejas de poliestireno expandido de 200 células, preenchidas com vermiculita e substrato Biomix, na proporção de 1:1. As mudas permaneceram sob nebulização intermitente com intervalos de 3 horas e duração de 3 minutos e após o enraizamento, aproximadamente um mês depois do plantio, as mudas foram transplantadas para copos descartáveis com volume de 200 ml (Figura 1B), preenchidos com vermiculita e substrato Biomix (1:1). Decorridos 60 dias nessas condições, as mudas foram transplantadas para o local definitivo do experimento (Figura 1C).

O experimento foi realizado no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana entre Setembro de 2015 e Fevereiro de 2016. As mudas foram plantadas em covas com dimensões de 20 x 20 x 20 cm, em espaçamento de 2,0 m entre linhas e 1,0 m entre plantas, totalizando uma área de 264 m<sup>2</sup>. O solo do plantio foi preparado previamente com

capina e adubação, adicionando-se 0,5 L de esterco bovino curtido por cova. Posteriormente ao plantio, realizou-se irrigação em dias alternados e capinas manuais, sempre que necessário. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com três repetições, e quatro plantas por repetição, totalizando 12 plantas por acesso, sendo que cada acesso foi considerado um tratamento.



Figura 1. Etapas da propagação e plantio dos acessos da espécie *Lippia organoides* Kunth: A) Estacas apicais utilizadas na propagação das plantas matrizes. B) Mudanças mantidas na casa de vegetação. C) Muda transplantada para o local definitivo do experimento. D) Plantas com seis meses de idade, após o plantio em local definitivo. Feira de Santana, Bahia, 2018.

#### 4.2.3 Caracterização morfo-agronômica

Aproximadamente 180 dias após o transplante, quando as plantas estavam em pleno florescimento, foram avaliadas as características morfológicas e agrônômicas dos 12 acessos de *L. organoides*. As características morfológicas qualitativas avaliadas foram: cor do caule (CC), folhas (CF), sépalas (CS) e pétalas (CP), formato da base foliar (FBF), formato do limbo foliar (FLF), formato do ápice foliar (FAF), de acordo com Vidal & Vidal (2006). Na avaliação das características foliares, qualitativas e quantitativas, determinou-se a coleta de uma folha por planta de cada acesso, totalizando doze folhas por acesso, retiradas sempre da base do quarto nó, a partir do ápice caulinar.

Também avaliou-se características morfológicas quantitativas, como altura das plantas (AL) e largura da copa (LC), medidas com auxílio de uma trena milimétrica, área foliar (AF), através de um medidor eletrônico LI-3100C, comprimento (CF) e largura das folhas (LF), medidas com auxílio de um paquímetro (cm) e calculada a relação entre as duas variáveis (C/L).

Após a colheita das plantas foram avaliadas as características agronômicas: massa foliar fresca (MFF), massa foliar seca (MFS), teor de óleo essencial (TOE) e rendimento de óleo essencial (ROE). Para mensuração, como parcela útil, foram utilizadas três plantas por acesso, em cada bloco. A MFF foi obtida através de pesagem em balança analítica. A obtenção da MFS foi feita através da separação de dez amostras foliares de 100 g, que foram colocadas em estufa de circulação forçada, a 60 °C, até atingir peso constante, obtendo-se ao final o teor de umidade das amostras. Sendo conhecido esse teor, foi calculada a MFS para cada repetição com base na MFF que era conhecida.

Na extração do óleo essencial as amostras foliares foram secas a temperatura ambiente nas dependências do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana durante duas semanas. A extração foi realizada através da hidrodestilação em Aparelho de Clevenger, utilizando-se 100g de massa foliar seca por bloco para cada acesso. O tempo de extração foi de três horas, seguindo a metodologia de Silva (2012), finalizado esse período, o óleo essencial foi separado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Em seguida a água residual foi retirada com a adição de sulfato de sódio anidro, seguindo-se o armazenamento em recipiente de vidro escuro. O teor do óleo essencial foi medido através da pesagem em balança de precisão e com base na massa seca utilizada. Posteriormente, o rendimento foi calculado com base no teor de óleo em relação massa foliar seca de cada planta.

#### 4.2.4 Análises Estatísticas

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância e suas médias foram comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, através do programa estatístico SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011). A divergência entre os acessos foi testada através de técnicas de análise multivariada, como análise de agrupamento, variáveis canônicas e importância relativa das características. Para a análise de agrupamento foi utilizada a distância de Mahalanobis, como medida de dissimilaridade, e a formação dos grupos foi feita através do método hierárquico Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average (UPGMA). O estabelecimento do corte no dendograma foi feito de acordo com o método de

Mojema (1977), que faz uma definição estatística para o número de grupos formados em métodos hierárquicos. A importância relativa das variáveis para a divergência genética foi determinada de acordo com Singh (1981). Todas as técnicas multivariadas empregadas foram realizadas pelo programa GENES (CRUZ, 2013).

### 4.3 Resultados e Discussão

A caracterização morfológica dos acessos de *L. origanoides* evidenciou características qualitativas diferentes. Foi observada variação na coloração do caule e das pétalas dos acessos avaliados (Tabela 2). A maioria dos acessos apresentou caule de cor marrom, mas também foram observados acessos com caules de coloração acinzentada (Figura 2C). Possivelmente essa coloração acinzentada nos caules de alguns acessos é ocasionada pela presença de tricomas, pois, de acordo com O'Leary et al. (2012), a espécie pode apresentar caule com pilosidade variável.

Foram observados três tipos de coloração nas pétalas dos diferentes acessos, sendo a coloração roxo/branco a mais ocorrente, seguido de roxo/branco/amarelo, e a coloração mais rara foi branco/amarelo (Figura 2D). Acessos da espécie *Lippia alba* também mostraram variações na coloração das pétalas, em trabalho realizado por Camêlo et al. (2011), sendo observados acessos com pétalas nas colorações lilás, lilás-claro e, em menor número, brancas. Quanto à coloração das folhas e sépalas, não foi encontrada nenhuma variação, apresentando sépalas verdes e folhas discolores verdes, sendo a face adaxial verde-escuro e a face abaxial verde-claro (Figura 2 A e B).

Os acessos da espécie apresentaram variações na forma foliar, com alguns acessos apresentando a forma do limbo orbicular, ápice obtuso e base obtusa (Tabela 2), enquanto outros acessos possuem a forma do limbo elíptico, ápice agudo e base obtusa (Figura 2). As variações morfológicas foliares encontradas nesse trabalho condizem com a descrição morfológica feita por O'Leary et al. (2012) para *L. origanoides*, onde os autores verificaram que a espécie pode apresentar limbo foliar de forma elíptica ou orbicular, bem como ápice agudo ou obtuso.

Tabela 2. Características morfológicas qualitativas de flores, caules e folhas dos acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados no Estado de Bahia e pertencentes ao Banco de Germoplasma da UEFS. Feira de Santana, Bahia, 2018.

Acessos	Coloração		Formato	
	Caule	Sépala	Ápice Foliar	Limbo Foliar
STE	Marrom	Branca/roxa/amarela	Obtuso	Orbicular
JEQ	Marrom	Branca/roxa/amarela	Obtuso	Orbicular
NIT	Marrom	Branca/roxa	Obtuso	Orbicular
QUI	Marrom	Branca/roxa/amarela	Obtuso	Orbicular
RJA	Marrom	Branca/roxa/amarela	Obtuso	Orbicular
SBR	Cinza	Branca/amarela	Agudo	Elíptico
JAG	Cinza	Branca/amarela	Agudo	Elíptico
SBA	Marrom	Branca/roxa	Obtuso	Orbicular
SLU	Marrom	Branca/roxa	Obtuso	Orbicular
SSE	Cinza	Branca/amarela	Agudo	Elíptico
JER	Cinza	Branca/amarela	Agudo	Elíptico
TUC	Cinza	Branca/amarela	Agudo	Elíptico

Além de serem importantes na identificação visual de diferentes populações e dos indivíduos no campo, as características morfológicas qualitativas podem servir como ferramenta para a distinção de acessos com a produção de metabólitos secundários diferenciada, tanto pela maior produção quanto por uma composição química específica. De acordo com Matos (2000), os acessos da espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown que apresentam folhas menores geralmente produzem óleo essencial ricos em citral e limoneno. Caracterizando acessos de *Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen com descritores morfológicos quantitativos e qualitativos, Vilela (2009) percebeu uma relação entre a coloração das raízes com os acessos mais produtivos: os acessos com raízes cinza mostraram maior produtividade de biomassa e ácido fático, em comparação com os demais acessos, que apresentaram raízes na coloração marrom. Contudo, com base nos resultados obtidos nesse trabalho não foi encontrado nenhuma relação entre as características morfológicas qualitativas específicas e a produtividade em óleos essenciais.

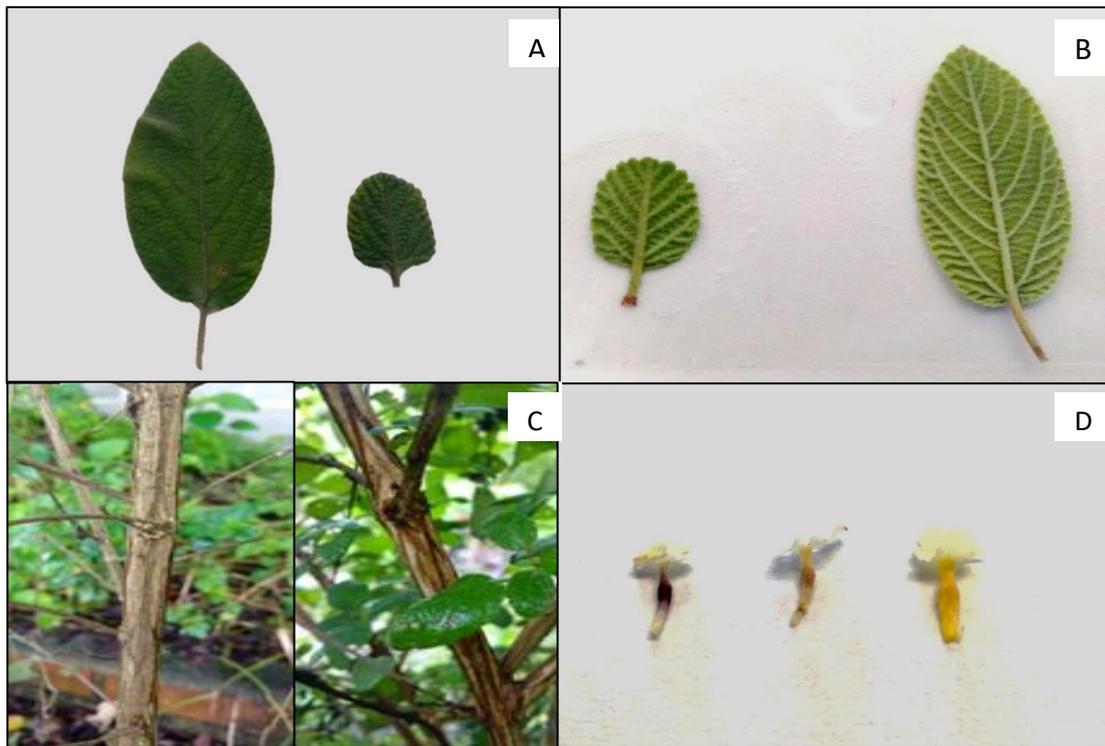


Figura 2. Principais variações morfológicas entre indivíduos pertencentes a diferentes acessos da espécie *Lippia origanoides* Kunth. coletados nos Estados da Bahia e Pernambuco: A) Face foliar adaxial, B) Face foliar abaxial, C) Coloração do caule, D) Coloração das pétalas. Feira de Santana, Bahia, 2018.

Por meio do Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) foram observadas diferenças significativas entre os acessos para as seguintes características quantitativas: massa foliar fresca (MFF), massa foliar seca (MFS), comprimento (CF) e largura das folhas (LF), relação entre as duas variáveis (C/L), área foliar (AF), teor de óleo essencial (TOE) e rendimento de óleo essencial (ROE) (Tabela 3).

Tabela 3. Médias das variáveis, comprimento foliar (CF), largura foliar (LF), razão entre comprimento e largura foliar (C/L), área foliar (AF), teor de óleo essencial (TOE) e rendimento de óleo essencial (ROE) dos acessos de *Lippia organoides* Kunth. coletados no Estado da Bahia. Feira de Santana, Bahia, 2018.

<b>Acessos</b>	<b>CF (cm)</b>	<b>LF (cm)</b>	<b>C/L</b>	<b>AF (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>MFF (g)</b>	<b>MSF (g)</b>	<b>TOE (%)</b>	<b>ROE (g óleo/planta)</b>
STE	1,16 b	0,87 b	1,28 c	0,64 b	343,33 b	140,00 b	3,73 d	2,77 b
JEQ	1,08 b	0,94 b	1,12 d	0,83 b	250,00 b	103,00 b	3,16 e	3,66 b
NIT	1,07 b	0,85 b	1,25 c	0,72 b	416,66 a	166,00 a	3,06 e	2,03 c
QUI	1,14 b	0,84 b	1,35 c	0,74 b	530,00 a	220,00 a	4,07 d	1,91 c
RJA	1,16 b	0,97 b	1,19 d	0,90 b	313,33 b	126,60 b	2,83 e	2,36 c
SBR	2,23 a	1,32 a	1,66 b	2,14 a	450,00 a	176,66 a	0,63 g	0,43 c
JAG	2,17 a	1,26 a	1,68 b	1,97 a	483,33 a	210,00 a	6,53 b	3,21 b
SBA	1,18 b	0,88 b	1,33 c	0,77 b	300,00 b	123,33 b	3,53 d	3,29 b
SLU	1,11 b	0,81 b	1,33 c	0,65 b	473,33 a	196,66 a	3,23 e	1,67 c
SSE	2,46 a	1,15 a	1,93 a	2,24 a	440,00 a	176,66 a	7,93 a	4,99 a
JER	2,28 a	1,22 a	1,65 b	2,23 a	330,00 b	140,00 b	2,30 f	2,16 c
TUC	2,19 a	1,21 a	1,77 b	1,90 a	473,33 a	186,50 a	5,50 c	3,00 b
<b>Média</b>	1,60	1,02	1,46	1,31	400,27	163,88	3,87	2,62
<b>CV</b>	9,85	9,86	6,24	17,73	25,21	25,47	9,73	32,58

\*Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade de erro.

O agrupamento das médias na característica CF permitiu a separação dos acessos em dois grupos distintos, com os acessos STE, JEQ, NIT, QUI, RJA, SBA e SLU formando o primeiro grupo, com o comprimento foliar variando de 1,07 a 1,18 cm, os demais acessos formando o segundo grupo, com valores entre 2,17 a 2,46 cm. Para a variável LF os resultados obtidos foram similares, com formação de dois grupos, com os acessos STE, JEQ, NIT, QUI, RJA, SBA e SLU mostrando valores entre 0,81 e 0,97cm, enquanto a largura foliar do outro grupo variou de 1,15 a 1,32cm.

Quando se analisou a relação C/L os acessos formaram quatro grupos, com o primeiro grupo composto por JEQ e RJA, variando de 1,12 a 1,19, respectivamente, enquanto que o segundo grupo, formado pelos acessos STE, NIT, QUI, SBA e SLU, variou de 1,25 a 1,35. SBR, JAG, JER e TUC formaram o terceiro grupo, variando de 1,66 a 1,77 e o acesso SSE apresentou o valor mais alto, com relação igual a 1,93, sendo o único acesso no quarto grupo.

A variabilidade dos acessos de *L. organoides* permitiu a formação de dois grupos para a variável AF, com os acessos STE, JEQ, NIT, QUI, RJA, SBA e SLU formando o primeiro grupo, com área foliar variando de 0,64 a 0,90 cm<sup>2</sup> e SBR, JAG, SSE, JER, TUC formaram o segundo grupo, com os valores mais elevados, variando de 1,97 a 2,24 cm<sup>2</sup>. Na variável MFF

os acessos STE, JEQ, RJA, SBA e JER formaram o primeiro grupo, apresentando os menores valores (250,0 a 343,33 g) e os demais acessos formaram o segundo grupo, que apresentaram maior produção de biomassa foliar (416,66 a 530,00 g). Resultado similar foi encontrado na variável MSF, onde novamente os acessos STE, JEQ, RJA, SBA e JER formaram o primeiro grupo, com menor produção (103,00 a 140,00 g) e os demais acessos o segundo grupo, com valores mais altos (166,00 a 220,00 g).

Comumente a espécie possui uma variabilidade nos parâmetros foliares, apresentando indivíduos com folhas que apresentam a largura de 0,3 - 3,5 cm e comprimento de 0,5 - 6,1 cm (O'LEARY et al., 2012). Para Kharazian (2012) medidas dos parâmetros foliares são importantes na determinação da variabilidade de espécies medicinais aromáticas, indicando acessos que possivelmente serão mais promissores para o melhoramento da espécie, cujo produto principal é o óleo essencial, produzido em maior quantidade nas folhas.

De acordo com o agrupamento das médias, foram formados sete grupos para a variável TOE, expressando a alta variabilidade na produção de óleo essencial em *L. origanoides*. O primeiro segmento, formado apenas pelo acesso SBR apresentou o menor valor, 0,63%. JER formou o segundo segmento, com o teor de 2,30%, em seguida os acessos JEQ, NIT, RJA e SLU formaram o terceiro segmento, com teor de 2,83 a 3,23%. O quarto segmento, constituído pelos acessos STE, QUI e SBA teve o teor de óleo essencial variando de 3,53 a 4,07%. O acesso TUC apresentou teor de 5,50%, formando o quinto segmento. O acesso JAG, com o teor de 6,53%, formou sozinho o sexto segmento. O sétimo segmento, formado apenas pelo acesso SSE, apresentou o valor mais elevado, 7,93%.

Para a variável ROE os acessos dividiram-se em três segmentos, sendo o primeiro formado pelos acessos NIT, QUI, RJA, SBR, SLU e JER, com rendimento variando de 0,43 a 2,36 g /planta. O segundo segmento foi formado pelos acessos STE, JEQ, JAG, SBA e TUC, com valores oscilando entre 2,77 a 3,66 g/planta. O acesso SSE destacou-se com o rendimento mais alto, 4,99 g /planta, formado sozinho o terceiro segmento.

Na literatura são encontrados valores de teor e rendimento de óleo essencial de *L. origanoides* bastante diferentes. Oliveira et al. (2007), utilizando um acesso originário do Pará, obtiveram o teor máximo produzido pela espécie, equivalente a 1%. Em Feira de Santana, Bahia, os valores mais altos para o teor e rendimento de óleo essencial da espécie foram de 3,28% e 0,879 g/planta, respectivamente, através do uso de biorreguladores (SILVA, 2012). Ribeiro et al. (2014) avaliaram a produção de óleo essencial na espécie, durante os períodos de seca e chuva na região Amazônica, verificando que o teor mais alto foi de 4,6% e

o menor teor foi 1,7%. Assim, os resultados encontrados nesse trabalho são promissores para a utilização de determinados acessos com a finalidade de elevar a produção de óleo essencial de *L. origanoides*, pois superaram os valores de produção de óleo essencial da espécie encontrados em outros estudos.

Outras espécies medicinais também apresentaram variações na produção de óleo essencial entre diferentes acessos, como *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (JANUZZI et al., 2011), *Mentha citrata* (Ehrh.) Briq. e *Mentha spicata* L. (FERREIRA, 2008).

O conhecimento do germoplasma, quanto ao desempenho individual de cada genótipo é muito importante, porém, também é necessário conhecer a variabilidade genética existente, por meio da distância genética entre os acessos e utilização de técnicas estatísticas multivariadas (STRECK et al., 2017). A análise de agrupamento dos acessos pelo método UPGMA, baseado na distância de Mahalanobis, com distância de corte a 29,61% de dissimilaridade, mostrou a formação de quatro grupos distintos (Figura 3).

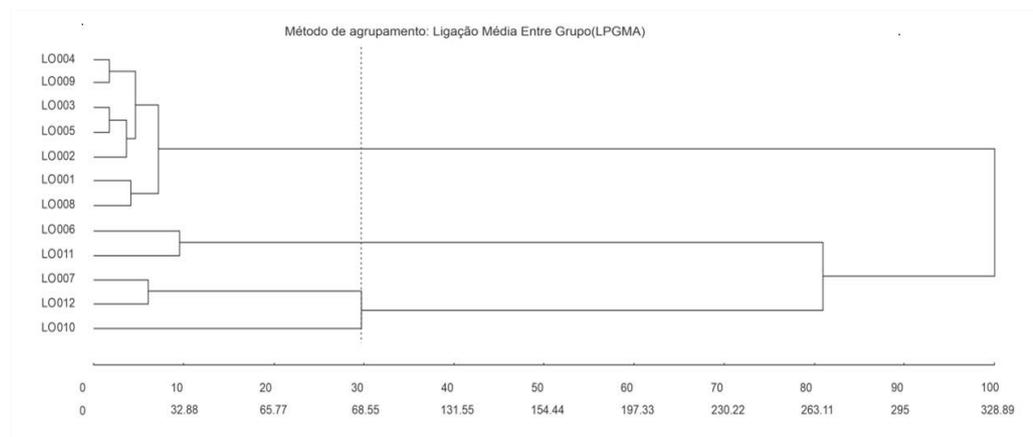


Figura 3. Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 12 acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados no Estado da Bahia, obtido pelo método de UPGMA, com base em 10 caracteres morfológicos, utilizando-se a distância generalizada de Mahalanobis. LO001 – STE, LO002 – JEQ, LO003 – NIT, LO004 – QUI, LO005 – RJA, LO006 – SBR, LO007 – JAG, LO008 – SBA, LO009 – SLU, LO010 – SSE, LO011 – JER, LO012 – TUC. Feira de Santana, Bahia, 2018.

O primeiro grupo formado, constituído pelos acessos QUI, SLU, NIT, RJA, JEQ, STE e SBA apresentou as menores dissimilaridades. Nesse grupo é possível observar a formação de três subgrupos, o primeiro formado pelos acessos QUI e SLU, com dissimilaridade 5,86 (Tabela 4); o segundo pelos acessos NIT, RJA e JEQ, com dissimilaridades de 6,49, 15,48, 8,07 (Tabela 4) e o último pelos acessos STE e SBA, com dissimilaridade de 13,21 (Tabela

4). Esses acessos apresentaram menores valores nos parâmetros foliares, produção variável de biomassa foliar e produção mediana de óleo essencial.

Tabela 4. Matriz de dissimilaridade entre os acessos de *Lippia organoides* Kunth., coletados no Estado da Bahia, baseada na distância generalizada de Mahalanobis obtidos a partir de 10 caracteres morfológicos. Feira de Santana, Bahia, 2018.

Acessos	STE	JEQ	NIT	QUI	RJA	SBR	JAG	SBA	SLU	SSE	JER
<b>JEQ</b>	22,61										
<b>NIT</b>	13,09	15,48									
<b>QUI</b>	30,01	21,66	20,89								
<b>RJA</b>	22,61	8,07	6,49	18,25							
<b>SBR</b>	338,16	425,48	303,57	415,09	339,85						
<b>JAG</b>	185,24	281,06	223,45	205,77	251,27	332,39					
<b>SBA</b>	13,21	30,07	13,05	29,14	18,83	291,06	179,64				
<b>SLU</b>	26,55	13,33	11,21	5,86	7,33	385,86	250,32	25,77			
<b>SSE</b>	467,82	642,48	538,36	552,50	604,79	464,80	105,81	470,83	611,68		
<b>JER</b>	241,50	334,63	230,59	317,25	269,17	31,51	184,76	206,80	306,48	279,31	
<b>TUC</b>	189,98	296,82	218,73	231,40	255,59	227,69	20,12	185,47	262,31	90,87	108,77

O segundo grupo foi formado pelos acessos SBR e JER, com dissimilaridade de 31,51 (Tabela 4). Esses acessos apresentaram os menores valores para teor e rendimento de óleo essencial, apesar de apresentar valores razoáveis de biomassa foliar e altos para variáveis relacionadas às medidas foliares, como LF, AF e CF. Geralmente, os acessos com produção elevada de biomassa foliar apresentam maior teor e rendimento de óleo essencial, entretanto, esse resultado oposto sugere que o acesso SBR possui um menor número de tricomas glandulares que produzem o óleo essencial, como também verificado por Jannuzi et al. (2010) em trabalho realizado com a espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.

Os acessos JAG e TUC formaram o terceiro grupo, apresentando dissimilaridade de 20,12 (Tabela 4). Com os maiores valores de biomassa foliar e dos parâmetros foliares, esses acessos tiveram uma alta produção de óleo essencial. O quarto grupo foi formado apenas pelo acesso SSE, que apresentou valores altos para produção de biomassa foliar, variáveis foliares, como CF, C/L e AF e produção de óleo essencial.

Na análise baseada nas variáveis canônicas, as duas primeiras variáveis explicaram, aproximadamente, 95,5% da variância total entre os acessos analisados, sendo a primeira variável (influenciada pelas variáveis C/L, AF e CF) responsável por 68,75% e a segunda variável (influenciada pela variável TOE) por 26,77%. A utilização dessa técnica foi satisfatória no estudo da divergência genética dos acessos de *L. origanoides* avaliados, pois as duas primeiras variáveis canônicas explicaram mais de 80% da divergência genética, sendo esse o índice aceitável indicado por Cruz e Regazzi (2001). Através de um gráfico bidimensional foi possível ver a organização dos acessos em quatro grupos diferentes, com organização similar aos grupos formados pelo método UPGMA (Figura 4).

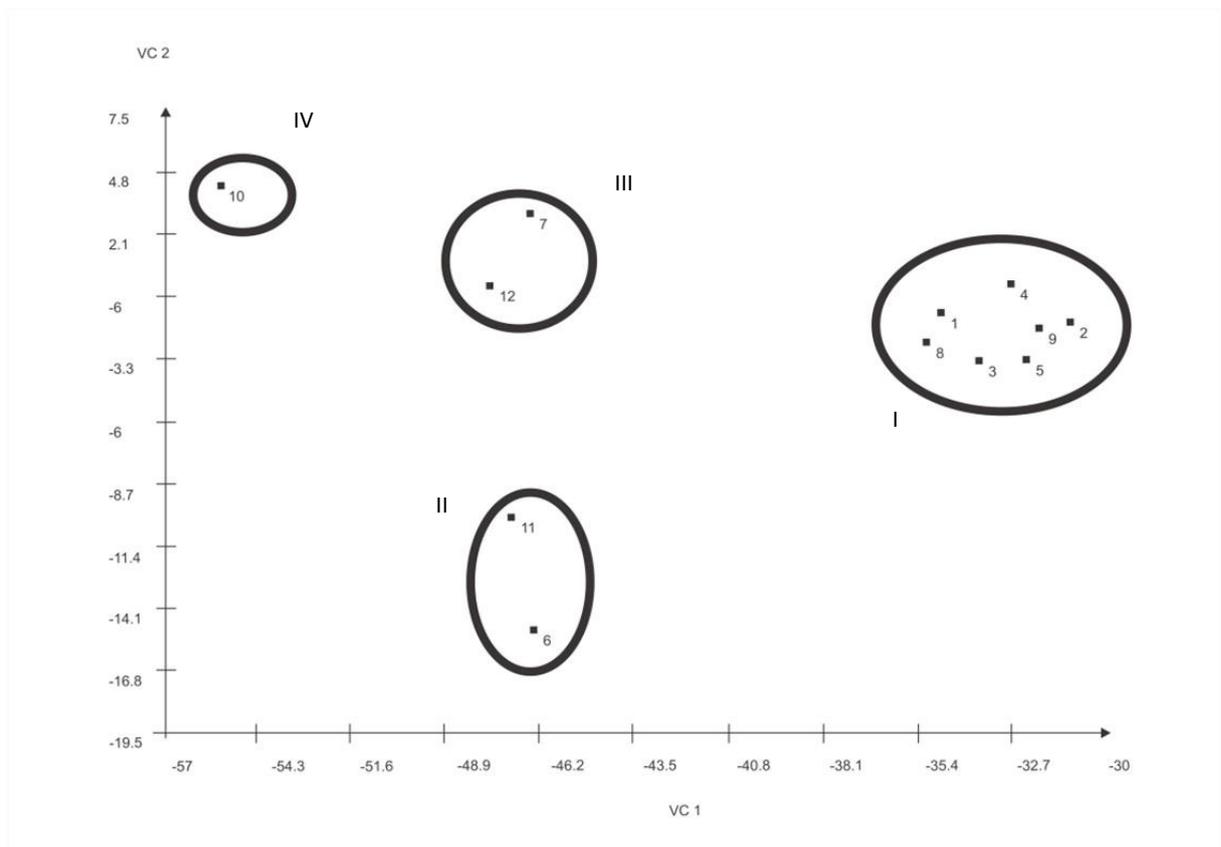


Figura 4. Dispersão gráfica dos escores em relação aos eixos representativos das variáveis canônicas (VC1, VC2) relativos aos 10 caracteres avaliados em 12 acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados no Estado da Bahia. 01 – STE, 02 – JEQ, 03 – NIT, 04 – QUI, 05 – RJA, 06 – SBR, 07 – JAG, 08 – SBA, 09 – SLU, 10 – SSE, 11 – JER, 12 – TUC. Feira de Santana, Bahia, 2018. Feira de Santana, Bahia, 2018.

Os resultados obtidos com as técnicas multivariadas mostraram que os acessos próximos geograficamente permaneceram no mesmo grupo, com distinção de um grupo, formado apenas pelo acesso SSE, visto que não foram coletados outros acessos nessa região.

Portanto, com base nesses resultados, verifica-se que na coleta de germoplasma dessa espécie, deve-se priorizar a aquisição de acessos em regiões distintas, o que permitirá à conservação de maior variabilidade genética da espécie (CASTRO et al., 2011). Resultados semelhantes a esse trabalho foram encontrados para as espécies *Ocimum basilicum* L. (VELOSO, 2012) e *Ageratum conyzoides* L. (CASTRO et al., 2011).

Medidas da divergência genética, como primeira etapa para um programa de melhoramento genético, podem auxiliar os pesquisadores a empenhar-se nas combinações mais promissoras (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2000) e obter maior heterose. A análise multivariada permite a predição da heterose e, conseqüentemente, alguns cruzamentos podem ser sugeridos, seguindo-se o princípio de se cruzar os genótipos mais distantes e com melhores características agronômicas (ARAMENDIZ-TATIS et al., 2011). Dessa forma, para os acessos de *L. origanoides* analisados nesse trabalho, LO010 foi o acesso mais promissor, seguido de JAG e TUC, apresentando os valores mais altos de dissimilaridade e produção elevada de óleo essencial, sendo recomendado o uso em programas de melhoramento da espécie. Apesar do acesso SBR apresentar dissimilaridade elevada e valores altos nos parâmetros foliares, apresentou os menores valores de produção de óleo essencial entre os demais acessos, demonstrando que seu uso não seria promissor para aumentar a produtividade do óleo essencial em *L. origanoides*.

De acordo com o Método de Singh (1981), baseado na Distância de Mahalanobis, as variáveis que mais influenciaram na divergência dos acessos foram C/L (26,82%), AF (24,02%), CF (17,75%) e TOE (17,09%) (Figura 5). Destaca-se o fato que todas essas variáveis estão relacionadas com a produção de óleo essencial, indicando a variação na espécie quanto à produção de óleo essencial. Juntas essas variáveis explicaram mais de 80% da divergência genética dos acessos analisados, possuindo relevância para serem usadas como descritores quantitativos na distinção de acessos da espécie (CRUZ e REGAZZI, 2001).

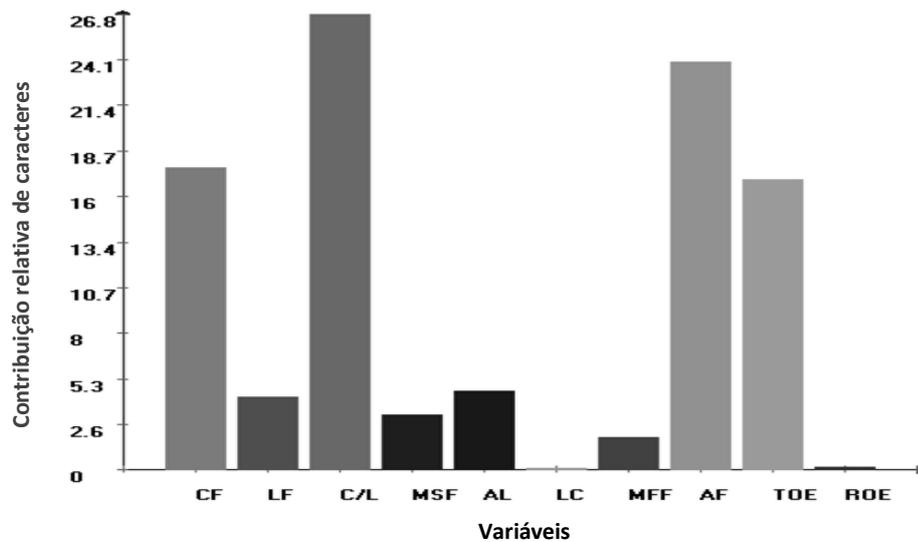


Figura 5. Contribuição relativa (%) das características avaliadas para a divergência entre os 12 acessos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados no Estado da Bahia. Feira de Santana, Bahia, 2018.

As outras variáveis apresentaram pouca importância relativa na separação dos acessos de *L. origanoides* em grupos, pois, de acordo com Bertan et al. (2006), as variáveis com estimativas de contribuição relativa baixa não possuem consistência na quantificação da divergência genética, e não acrescentam muito avanço no melhoramento genético da espécie.

#### 4.4 Conclusão

Diante dos resultados observados, verifica-se que foi possível caracterizar a variabilidade e detectar a divergência genética entre os acessos de *Lippia origanoides* Kunth. a partir dos descritores morfo-agronômicos utilizados. Existe variação genética entre os 12 genótipos estudados, o que permite o início de um programa de seleção de plantas mais promissoras. As técnicas multivariadas utilizadas permitiram a visualização da variabilidade genética existente entre os genótipos, formando grupos distintos. Devido a alta produção de óleo essencial, os acessos SSE, JAG e TUC apresentam potencial para uso em programas de melhoramento.

#### 4.5 Referências

- ARAMENDIZ-TATIS, H. Potencial agrônomico e divergência genética entre genótipos de berinjela nas condições do Caribe Colombiano. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 174 - 180, 2011.
- ARANGO, O. B.; PANTOJA, D. D.; SANTACRUZ, L. C. H., HURTADO, A. M. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) del alto patia. **Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 10, n. 2, p. 79 - 86, 2012.
- BERTAN, I. Dissimilaridade genética entre genótipos de trigo avaliados em cultivo hidropônico sob estresse por alumínio. **Bragantia**, v. 65, n. 1, p. 55 - 63, 2006.
- BITTARA, F.; RODRÍGUEZ, D.; SANABRIA, M.; MONROY, J.; RODRÍGUEZ, J. L. Evaluación de fungicidas y productos vegetales em el combate de la sarna polvorienta de la papa. **Interciencia**, v. 34, p. 265 - 269, 2009.
- CAMÊLO, L. C. A.; BLANK, A. F., P. A. D.; EHLERT, C. R. D. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de erva cidreira-brasileira *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1 - 8, 2011.
- CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; DESTRO, D.; PRETE, C. E. C.; GONZALES, M. G. N.; POPPER, I.; ZANATTA, S.; SILVA, F. A. M. Seleção de genótipos parentais de acerola com base na divergência genética multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 1613 - 1619, 2000.
- CASTRO, H. G.; SANTOS, G. R.; MOMENTÉ, V. G.; SILVA, D. J. H.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I. Estudo da divergência genética por características morfológicas entre acessos de mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.) coletados no estado do Tocantins em diferentes épocas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 24 - 29, 2011.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2° ed. rev. Viçosa: UFV, 2001. 390 p.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2° ed. v. 2, Viçosa: Editora UFV, 2006. 585 p.
- CRUZ, C. D. Genes – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum – Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271 - 276, 2013.
- ESCOBAR, P.; LEAL S. M.; HERRERA, L. V.; MARTINEZ J. R.; STASHENKO E. E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia spp* essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 184 - 190, 2010.
- FERREIRA, C. P. **Caracterização química e morfológica de genótipos de Mentha spp**. 2008. 111 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039 - 1042, 2011.

FIGUEIREDO NETO, A.; ALMEIDA, F. A. C.; GOUVEIA, J. P. G.; NÓBREGA, M. B.M.; CARNEIRO, R. M.; PEDROZA, J. P. Divergência genética em acessos de mamona (*Ricinus communis* L.) Baseada nas características das sementes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 2004.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; BIZZO, H. R.; GRACINDO, L. A. M. Avaliação agrônômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 412 - 417, 2010.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; SILVA, D. B.; GRACINDO, L. A. M.; VIEIRA, R. F. Avaliação agrônômica 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**, v. 13, n. 3, p. 258 - 264, 2011.

KHARAZIAN, N. Morphometric study of some *Salvia* L. (Lamiaceae) species in Iran. **Scientific Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 6, p. 126 - 137, 2012.

MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L.; SINIGAGLIA, C.; RIBEIRO, M. V. Variabilidade em matrizes de acessos de espinheira-santa. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 351 - 357, 2008.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2º ed. Fortaleza: UFC, 2000. 346p.

MENESES, R.; TORRES, F. A.; STASHENKO, E. E.; OCAZONEZ R. E. Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. **Salud UIS**, v. 41, p. 236 - 243, 2009.

MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: na evaluation. **Computational Journal**, v. 20, n. 1, p. 359 - 363, 1979.

NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858 p.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL J.; STASHENKO, E. E. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). **Journal of Stored Products Research**, v. 45, p. 212 - 214. 2009.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236 - 240, 2007.

OLIVEIRA, T. C. **Caracterização e comportamento de acessos de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) mantidos em banco ativo de germoplasma em São Cristóvão – SE**. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). UFS, São Cristóvão/SE.

O'LEARY, N.; DENHAM, S. S.; SALIMENA, F.; MÚLGURA, M. E. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum*. (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, p. 197 - 219, 2012.

RIBEIRO, A. F.; ANDRADE, E. H. A.; SALIMENA, F. R. G.; MAIA, J. G. S. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia organoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 249 - 259, 2014.

SALIMENA-PIRES, F. R.; GIULIETTI, A. M. Flora da serra do cipó, Minas Gerais: Verbenaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 17, p. 155 - 186, 1998.

SILVA, G. C.; OLIVEIRA, L. M.; LUCCHESI, A. M.; SILVA, T. R. S.; NASCIMENTO, M. N. Propagação vegetativa e crescimento inicial de *Lippia organoides* (alecrim-de-tabuleiro). **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 236 - 240, 2015.

SILVA, G. C. **Biorreguladores vegetais, substratos e estaquia em *Lippia organoides* H.B.K. (Verbenaceae)**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, v. 41, n. 2, p. 237 - 245, 1981.

STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J. R.; RUIZ, C. A.; ARIAS, G.; DURAN, C.; SALGAR, W. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 93 - 103, 2010.

STRECK, E. A.; AGUIAR, G. A.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; FACCHINELLO, P. H. K.; OLIVEIRA, A. C. Variabilidade fenotípica de genótipos de arroz irrigado via análise multivariada. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 1, p. 101 - 109, 2017.

TOQUICA, S. P.; RODRÍGUEZ, F.; MARTINEZ, E.; DUQUE, M. C.; TOHME, J. Molecular characterization by AFLPs of Capsicum germplasm from the Amazon department in Colombia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, n. 6, p. 639 - 647, 2003.

VELOSO, R. A. **Divergência genética, análise do óleo essencial e bioatividade de acessos de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) no Estado do Tocantins**. 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2012.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. (2006). **Botânica – Organografia**: quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos. 4ª Edição. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONSECA, K. G.; CARVALHO, L. J. C. B.; SILVA, M. S.; PAULA-MORAES, S. V.; FILHO, M. O. S. S.; SILVA, K. N. Divergência genética entre acessos açucarados e não açucarados de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n.12, p. 1707 - 1715, 2008.

VILELLA, G. F. **Aspectos fitotécnicos e fitoquímicos de acessos de *Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen – Amaranthaceae.** 2009. 102 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura), Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, 2009.

## 5 CAPÍTULO III

**Diversidade genética entre populações silvestres de *Lippia organoides* Kunth. por meio de marcadores moleculares ISSR**

## **Diversidade genética entre populações silvestres de *Lippia origanoides* Kunth. por meio de marcadores moleculares ISSR**

Emily Verônica Rosa da Silva Feijó; Bárbara Laís Barbosa; Cássio van den Berg; Lenaldo Muniz de Oliveira

**RESUMO** – Os marcadores moleculares ISSR tem se mostrado úteis em estudos que buscam caracterizar a diversidade e estruturação genética entre populações ocorrentes em diferentes regiões geográficas, produzindo informações importantes para a coleta acertada de germoplasma. A espécie *Lippia origanoides* Kunth. tem potencial medicinal comprovado e ampla ocorrência na América do Sul. Porém, os dados sobre a variabilidade genética dentro da espécie ainda são poucos. O objetivo desse capítulo foi analisar os níveis de diversidade genética, estruturação genética e relacionamento das populações de *L. origanoides* ocorrentes no Estado da Bahia e Pernambuco, por meio de marcadores moleculares ISSR. Foram coletadas amostras foliares de 18 populações silvestres da espécie, nos Estados da Bahia e de Pernambuco. Foram selecionados nove primers de ISSR a partir de 13 testados. Foram estimados os seguintes parâmetros de diversidade: número ( $NBp$ ) e percentual de bandas polimórficas ( $\%Bp$ ), heterozigosidade média esperada ( $He$ ), índices de diversidade de Shannon ( $I$ ) e diferenciação genética entre populações ( $Fst$ ). A estrutura genética populacional foi avaliada através da geração de dendrograma pelo método de Neighbor-Joining, com base na matriz de distância de Nei, análise no programa STRUCTURE (Bayesiana) e análise de coordenadas principais (PCoA). Nas populações avaliadas a heterozigosidade média esperada oscilou entre 0,162 e 0,237, o Índice de Shannon ( $I$ ) variou entre 0,247 e 0,359, sendo as populações mais diversas aquelas situadas na Chapada Diamantina. Foram obtidas bandas exclusivas em três populações (Mucugê, Jaguarari e Santa Brígida). Os valores obtidos de  $Fst$  (0,19) indicam diferenciação moderada entre as populações. A AMOVA identificou variação entre populações de 31%, sugerindo alta estruturação interpopulacional. A análise no STRUCTURE e o dendrograma gerado indicaram a possibilidade de separação das 18 populações em quatro grupos distintos. As populações de Rio de Contas, Jaguarari, Nova Itarana e Santa Brígida apresentam os maiores valores de diversidade genética dentro de cada grupo, sendo prioritárias para a composição de um banco de germoplasma da espécie.

**Palavras-chave:** Variabilidade Genética. Planta Medicinal. Populações Silvestres. Coleta de Germoplasma.

## Genetic diversity among wild populations of *Lippia origanoides* Kunth. by ISSR molecular markers

**Abstract** – ISSR molecular markers have been shown to be useful in studies that seek to characterize genetic diversity and structuring among populations occurring in different geographic regions, producing important information for the successful collection of germplasm. The species *Lippia origanoides* Kunth. has a proven medical potential and widely occurs in South America. However, data on genetic variability within the species are still few. The objective of this chapter was to analyze the levels of genetic diversity, genetic structure and relationship of the populations of *L. origanoides* occurring in the State of Bahia and Pernambuco, using ISSR. Leaf samples were collected from 18 wild populations of the species, in these states. Nine ISSR primers were selected from 13 tested. Quantification was done by means of agarose gel images. The gels were evaluated with the GEOCOMPAR II software for defining band homology and construction of a presence and absence matrix for each loci. The following diversity parameters were estimated: number of polymorphic bands (NBp), percentage of polymorphic bands (% Bp), expected heterozygosity (He), Shannon diversity indexes (I) and genetic distance between populations (Fst). The population genetic structure was evaluated through the generation of dendrogram by the Neighbor-Joining method, based on the Nei distance matrix, STRUCTURE (Bayesian) analysis and main coordinate analysis (PCoA). In the evaluated populations, the heterozygosity ranged from 0.162 to 0.277, the Shannon Index (I) ranged from 0.247 to 0.359, the most diverse of which were located in the Chapada Diamantina. Private bands were obtained in three populations (Mucugê, Jaguarari and Santa Brígida). The values obtained from Fst (0.19) indicate moderate differentiation between the populations. AMOVA identified 31% of variation among populations, suggesting high inter-population structure. The STRUCTURE analysis and the generated dendrogram indicated the possibility of separating the 18 populations into four distinct groups. The populations of Rio de Contas, Jaguarari, Nova Itarana and Santa Brígida present the highest values of genetic diversity within each group, being a priority for the composition of a germplasm bank of the specie.

**Key-words:** Genetic Variability. Medicinal Plant. Wild Populations. Collection of Germplasm.

## 5.1 Introdução

O gênero *Lippia* Linn. possui muitas espécies que são conhecidas pela aplicação terapêutica (PIMENTA et al., 2007), entre elas *Lippia origanoides* Kunth. A espécie tem várias ações medicinais comprovadas, como ação antimicrobiana, antiviral, antioxidante e anti-inflamatória, entre outras (OLIVEIRA et al., 2007; MENESES et al., 2009; ARANGO et al., 2012; PINTO et al., 2013; VERAS et al., 2013). Grande parte desse potencial deve-se aos variados óleos essenciais produzidos pela espécie. Já foram identificados oito quimiotipos para *L. origanoides*, sendo os mais ocorrentes os quimiotipos que apresentam o carvacrol e o timol como constituintes principais (STASHENKO et al., 2010; VEJA-VELA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014; TOZIN et al., 2015). *L. origanoides* apresenta ampla ocorrência em países da América do Sul, incluindo o Brasil, sendo encontrada comumente em áreas semiáridas e áridas, de solos pobres e pedregosos (O'LEARY et al., 2012).

Por serem obtidas, majoritariamente, através do extrativismo, as plantas medicinais nativas estão num grupo de risco no que se refere à perda da variabilidade genética, visto que além da fragmentação e antropização dos habitats, ainda sofrem com a coleta indiscriminada, sendo necessárias medidas para quantificar e assegurar a conservação dessa riqueza. Dessa forma, a análise da diversidade genética das espécies nativas passou a ter hoje um papel de destaque na definição das estratégias de conservação, entre elas, a coleta bem sucedida de germoplasma (RIBEIRO e RODRIGUES, 2006).

Apesar da importância medicinal, as informações sobre a variabilidade genética de *L. origanoides* no Brasil são inexistentes. Alguns estudos já foram feitos em outros países, onde a espécie é abundante. Na Colômbia foram desenvolvidos três estudos com a finalidade de avaliar a variabilidade genética da espécie. O primeiro foi desenvolvido por Suarez et al. (2008), avaliando a diversidade e estruturação genética de indivíduos da espécie em duas localidades, chegando-se a conclusão que se tratava de apenas uma população, apesar dos altos níveis de diversidade genética encontrados. No trabalho de Vega-Vela e Sanches (2012), os resultados mostraram uma diminuição na variabilidade genética das populações da espécie coletadas em maiores altitudes (acima de 1000m). Em outra pesquisa, Vega-Vela et al. (2013) observaram alta variabilidade genética nas duas populações estudadas e baixa estruturação entre elas. No México, as pesquisas feitas com a espécie têm mostrado valores mais baixos de diversidade genética, quando comparados com os valores encontrados na Colômbia, e estruturação moderada entre as populações de *L. origanoides* sugerindo a importância de

estratégias para obtenção de germoplasma da espécie (MARTÍNEZ-NATARÉN et al., 2014; VARGAS-MENDOZA et al., 2016).

Devido a preferência por lugares áridos e semiáridos, populações da espécie ocorrem espontaneamente em grandes extensões do Nordeste Brasileiro, sendo essa uma região propícia para uma pesquisa inicial sobre a diversidade genética da espécie no país. Um estudo desse tipo produziria informações úteis sobre a variabilidade genética da espécie, auxiliando na obtenção de germoplasma representativo da diversidade genética de *L. origanoides*.

Desde o início da década de 80, através do uso de marcadores moleculares, é possível avaliar a existência de variabilidade genética entre indivíduos da mesma espécie, de forma rápida e eficiente (BERED et al., 1996). Os marcadores moleculares correspondem ao polimorfismo presente no nível do DNA, por isso, opostamente aos marcadores morfológicos e bioquímicos, não dependem do tipo de tecido analisado, nem do estágio de desenvolvimento da planta (CARRER et al., 2010). Entre os diversos tipos de marcadores moleculares, os ISSRs (Inter Simple Sequences Repeats) têm se mostrado úteis para análise da diversidade genética, bem como para a caracterização de acessos e cultivares de várias espécies medicinais (SOUZA, 2015). Esses marcadores apresentam muitas vantagens, como a rapidez de uso, fácil manuseio, boa reprodutibilidade de bandas, não requerem um conhecimento precedente da sequência genômica e baixo custo para realização (REDDY et al., 2002). Estudos de diversidade genética de *L. origanoides* utilizando marcadores moleculares ISSR foram bem sucedidos (SUAREZ et al., 2008; VEGA-VELA et al., 2013; MARTÍNEZ-NATARÉN et al., 2014).

Diante do exposto, o objetivo desse capítulo foi analisar os níveis de diversidade genética, estruturação genética e relacionamento das populações de *L. origanoides* ocorrentes no Estado da Bahia, através do uso de marcadores moleculares ISSR, a fim de estabelecer um plano de coleta adequado para a obtenção de germoplasma da espécie na região.

## **5.2 Materiais e Métodos**

### **5.2.1 Material vegetal**

O material vegetal utilizado foi obtido no segundo semestre de 2014, quando foram realizadas expedições para coleta de amostras de diferentes populações de *L. origanoides* em zonas de ocorrência natural. Ao final foram coletadas amostras foliares (folhas jovens) de 18 populações, sendo 17 no estado da Bahia e uma no estado de Pernambuco, Brasil (Tabela 1).

As análises foram feitas com um total de 270 indivíduos, uma vez que foram coletadas amostras de 15 indivíduos de cada população.

A distância mínima entre as populações foi 44,22 km (entre LO2870 e LO2872), e a máxima foi de 608,41 km (entre LO2818 e LO2867). Durante as coletas foram obtidos ramos floridos de cada população, para posterior identificação botânica. As exsicatas foram identificadas pela Dra. Tânia Regina dos Santos Silva e posteriormente depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) (Tabela 1). Amostras de folhas para análise genética foram armazenadas em gel de Brometo de Cetil Trimetil Amônio - CTAB (35% NaCl<sub>2</sub> e 3% CTAB) (DOYLE e DOYLE, 1987) no momento da coleta, sendo mantidas nessas condições até o início da extração do DNA.

Tabela 1. Dados de coleta de 18 populações de *Lippia origanoides* Kunth. coletadas em municípios dos Estados de Baha e Pernambuco. Feira de Santana, BA, 2018.

<b>Sigla de identificação das populações</b>	<b>Município</b>	<b>Coordenadas Geográficas</b>	<b>Voucher (número de registro no HUEFS)</b>
JEQ	Jequié/BA	13° 45' 54,0" S 40° 03' 28,6" O Alt. 346 m	214487
NIT	Nova Itarana/BA	12° 58' 22,0" S 39° 56' 05,6" O Alt. 526 m	214484
STE	Santa Terezinha/BA	12° 35' 46,8" S 39° 32' 14,8" O Alt. 140 m	214488
UTI	Utinga/BA	12° 04' 54" S 41° 05' 40" O Alt. 863 m	214482
PAL	Palmeiras/BA	12° 26' 47,7" S 41° 29' 12,6" O Alt. 809 m	214486
MCH	Morro do Chapéu/BA	11° 36' 19,5" S 40° 59' 38,3" O Alt. 941 m	214481
MUC	Mucugê/BA	12° 59' 42,3" S 41° 23' 08,6" O Alt. 975 m	214483
RCO	Rio de Contas/BA	13° 28' 53,8" S 41° 51' 47,3" O Alt. 1065 m	214485
JAG	Jaguarari/BA	10° 05' 20,4" S 40° 13' 58" O Alt. 543 m	214491

SSE	Sento Sé/BA	9° 44' 45" S 41° 53' 06" O Alt. 400 m	227132
SBA	Santa Bárbara/BA	12° 01' 04,5" S 38° 58' 15,5" O Alt. 270 m	214497
CNO	Casa Nova/BA	09° 09' 43" S 40° 58' 15" O Alt. 417 m	227133
FLO	Floresta/PE	08° 41' 0,6" S 38° 09' 09,1" O Alt. 437 m	214489
TUC	Tucano/BA	11° 01' 25,5" S 38° 49' 23,7" O Alt. 354 m	214496
JER	Jeremoabo/BA	10° 13' 35,7" S 38° 17' 54,4" O Alt. 227 m	214495
QUI	Quixabeira/BA	11° 20' 03,9" S 40° 07' 39,1" O Alt. 396 m	214490
SBR	Santa Brígida/BA	09° 50' 16,4" S 38° 15' 43,9" O Alt. 397 m	214494
SLU	Santaluz/BA	11° 12' 30,4" S 39° 24' 50,0" O Alt. 348 m	214493

### 5.2.2 Extração e amplificação de DNA

Todas as etapas, como extração de DNA, quantificações e processamento de dados, foram realizadas nas dependências do Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas

(LAMOL) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1987) re-escalonado para tubos de 1mL, para amostras armazenadas nessa situação. A quantificação do DNA extraído foi feita através de eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão de borato de sódio 1X (SB) (BRODY e KERN, 2004) e, posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio. O marcador utilizado foi o *ladder* 100pb (INVITROGEN®). O registro fotográfico foi feito em um aparelho transluminador UV (Spectroline), conectado ao sistema Kodak EDAS 1D 3.6.

Foram realizados testes para verificação de polimorfismos com 13 primers, onde o DNA total foi amplificado por meio de Reação em Cadeia de Polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) de acordo com o protocolo modificado de Wolfe et al. (1998). O volume total de cada reação de amplificação dos fragmentos foi de 10 µL, contendo 4,0µL do Kit Top Taq *Master Mix* (QIAGEN Inc., Hilden, Germany), 2,24 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura de alta qualidade (parte do Kit de amplificação), 0,64 µL de corante (parte do Kit de amplificação), 1,0 µL do DNA da amostra e 0,32 µL do iniciador 15 µM. Utilizou-se um termociclador modelo Esco Healthcare *Swift® Max Pro*, iniciando por um ciclo de desnaturação de 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos de 40 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 46,9–51,7°C (Tabela 2) por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, acrescido de duas variações, a primeira à 94°C e a segunda à 47°C, ambas por 45 segundos, seguidas de uma extensão final a 72°C por 7 minutos, para os 270 indivíduos.

Após essa etapa os produtos da reação foram visualizados em géis de agarose 2,0% em tampão SB 1X, utilizando do marcador *ladder* de 100 pares de bases. Posteriormente, os géis foram corados em solução de brometo de etídio a 10% durante aproximadamente uma hora para coloração das bandas, seguido pela fotodocumentação, em transluminador UV (Spectroline).

### 5.2.3 Análise de dados

O software GelCompar II versão 5.0 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium), foi utilizado para analisar os géis e, a partir disso, foi obtida uma matriz binária de valores zero (ausência) e um (presença) de dados obtidos para cada loci, e -1 (ou -9, dependendo do software a serem realizadas as análises) para os dados faltantes.

Por meio da matriz binária foram estimados diversos parâmetros. Sendo os principais parâmetros analisados: número de loci polimórficos (*NLb*), porcentagem de loci polimórficos (*%Lp*), heterozigotidade média esperada ou diversidade genética de Nei (1973) (*He*), índice de diversidade de Shannon (*I*) e a distância genética entre populações (*Fst*) (PEARSE e CRANDALL, 2004). Também foi realizada a análise molecular de variância (AMOVA) e análise de correlação entre as matrizes de distâncias genética e geográfica, através do teste de Mantel (MANTEL, 1967). Foram usados os softwares POPGENE v.1.32 (YEH; YANG e BOYLE, 1997) e GenAEx v. 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2011).

Utilizando o STRUCTURE 2.3.3 (PRINTCHARD et al., 2000) foi realizada uma análise bayesiana a partir dos dados dos genótipos, para a inferência dos *pool* gênicos, através das frequências alélicas das populações, de forma correlacionada. Através dos softwares AFLPsurv 1.0 (VEKEMANS, 2002) e PHYLIP 3.69 (FELSENSTEIN, 2011) foram feitas análises de agrupamento, a partir da matriz de distância genética não enviesada de Nei (NEI, 1978), pelo método de agrupamento Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987). Posteriormente, o dendrograma foi visualizado através do software FigTree v. 1.2.2 (RAMBAUT, 2009). Também foi realizada análise de coordenadas principais (PCoA) utilizando como base a distância Euclidiana, por meio do software PAST 3.0.

## **5.3 Resultados e Discussão**

### **5.3.1. Diversidade genética**

Do total de 13 primers ISSR testados, nove apresentaram a formação de bandas visíveis e polimórficas, sendo estes selecionados para o trabalho (Tabela 2). Os primers ISSR4, ISSR902, ISSR901 e ISSR898 não apresentaram bons resultados para a espécie, sendo descartado o uso no estudo.

Tabela 2. Nome, sequência, temperatura de anelamento (°C) e número de bandas polimórficas dos primers testados para análise das 18 populações silvestres de *Lippia origanoides* Kunth. Feira de Santana, BA, 2018.

<b>Primers Selecionados</b>			
Nome	Sequência	Temperatura de anelamento (°C)	Bandas polimórficas
Manny	(CAC) <sub>4</sub> -RC	51,7	14
Jhon	(AG) <sub>7</sub> -YC	46,9	15
ISSR6	(AG) <sub>8</sub> -YT	50,2	18
ISSR7	(AG) <sub>8</sub> -YC	50,2	16
Goofy	(GT) <sub>7</sub> -YG	49,0	14
Chris	(CA) <sub>7</sub> -YG	49,6	16
ISSR899	(CA) <sub>6</sub> -RG	48,6	15
Mao	(CTC) <sub>4</sub> -RC	50,9	14
Omar	(GAG) <sub>4</sub> -RC	49,9	13
Total	-	-	135

O primer ISSR6 apresentou o maior número de bandas polimórficas (18) e o primer Omar apresentou o menor número de bandas polimórficas (13). No total foram obtidos 135 loci, com valor médio de 15 bandas por primer. De acordo com Colombo et al. (2008) é necessário a quantidade média aproximada de 50 a 100 loci polimórficos para uma avaliação segura, utilizando-se marcadores dominantes, como ISSR. Outros trabalhos com a espécie utilizando marcadores ISSR obtiveram números próximos de loci polimórficos (VEGA-VELA et al., 2013; VARGAS-MENDONÇA et al., 2016).

Considerando as populações individuais, o percentual médio de bandas polimórficas foi de 60,08% (Tabela 3), resultado similar (60,9%) foi encontrado por Martínez-Natarén et al. (2014), trabalhando com *L. origanoides*. Valores próximos foram obtidos em outras espécies do gênero: *Lippia* aff. *rotundifolia* Cham. e *Lippia alba* Mill. apresentaram 50 e 65% de bandas polimórficas, respectivamente, com a utilização de marcadores ISSR (MANICA-CATTANI et al, 2009; MEIRA, 2016).

Quanto às variáveis de diversidade genética, a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) em cada população variou entre 0,162 (FLO) a 0,237 (RCO), com média de 0,191 (Tabela 3). Quanto ao Índice de Shannon ( $I$ ), o menor valor foi encontrado na população FLO (0,247) e o maior valor foi novamente encontrado na população RCO (0,359), com média de 0,292

(Tabela 3). Dessa forma, a população FLO apresentou a menor diversidade genética, enquanto a população RCO apresentou a maior.

Suarez et al. (2008) e Veja-Vela et al. (2013), trabalhando com o mesmo tipo de marcador molecular, encontraram maior diversidade genética na espécie, demonstrada pela heterozigosidade média elevada, 0,453 e 0,367, respectivamente. Entretanto, outros estudos similares apresentaram valores menores de heterozigosidade. Vargas-Mendoza et al. (2016) encontraram valor médio de 0,110 para 22 populações naturais da espécie. Na pesquisa de Martínez-Natarén et al. (2014), a heterozigosidade média foi 0,170, em 14 populações. Baixos valores médios para o Índice de Shannon (0,14 – 0,18) em diferentes populações de *L. origanoides*, também foram obtidos por Vargas-Mendoza et al. (2016).

Os valores de diversidade genética encontrados entre as populações podem estar relacionados a fatores ambientais, como o relevo e a vegetação. Percebe-se que em áreas mais montanhosas e com fitofisionomias variadas, como a Chapada Diamantina, as populações apresentaram diversidade genética mais alta (UTI, PAL, MCH, MUC e RCO). A Chapada Diamantina é conhecida como um dos centros de diversidade do gênero *Lippia* L. no Brasil (SALIMENA, 2002). Nessa região, várias combinações entre habitats e sítios ajustam uma composição complexa, relacionada às qualidades e quantidades dos habitats, que geram alta heterogeneidade em áreas restritas, culminando em alta diversidade vegetal (CONCEIÇÃO e PIRANI, 2005). Com o distanciamento dessa região, localizadas em relevo mais plano e vegetação mais uniforme, as demais populações apresentam uma diminuição da diversidade genética. Diferenças no relevo e vegetação também influenciaram nos níveis de diversidade genética da espécie na Colômbia (VEJA-VELA e SANCHEZ, 2012).

De acordo com Yang et al. (2012), a ocorrência de locos exclusivos ou alelos privados são fatores que indicam a diferenciação das populações. Entretanto, nessa pesquisa a ocorrência de alelos privados foi baixa, pois apenas as populações MUC, JAG e SBR apresentaram cada, um alelo privado (Tabela 3). A espécie *Lippia* aff. *rotundifolia* Cham. apresentou apenas um alelo privado em uma das populações no trabalho de Meira (2016).

Tabela 3. Número de loci polimórficos (*NLp*), percentual de loci polimórficos (*%Lp*), heterozigosidade média esperada (*He*), índice de diversidade de Shannon (*I*), locus exclusivos (*LE*) e grupo genético (*GG*) para 18 populações silvestres de *Lippia origanoides* Kunth. Feira de Santana, BA, 2018.

<b>População</b>	<b><i>NLp</i></b>	<b><i>Lp%</i></b>	<b><i>He</i></b>	<b><i>I</i></b>	<b><i>LE</i></b>	<b><i>GG</i></b>
JEQ	84	57.78	0,182	0,281	0	1
NIT	90	64.44	0,185	0,290	0	1
STE	90	63.70	0,170	0,269	0	1
SBA	79	54.07	0,169	0,260	0	1
QUI	88	61.48	0,199	0,304	0	1
SLU	82	58.52	0,185	0,284	0	1
UTI	99	68.89	0,226	0,343	0	2
PAL	94	65.19	0,211	0,322	0	2
MCH	86	59.26	0,188	0,288	0	2
MUC	96	65.93	0,207	0,317	1	2
RCO	99	71.11	0,237	0,359	0	2
JAG	96	65.19	0,214	0,325	1	3
SSE	89	58.52	0,207	0,309	0	3
CNO	81	54.07	0,180	0,272	0	3
FLO	78	51.11	0,162	0,247	0	4
TUC	81	54.07	0,175	0,266	0	4
JER	80	53.33	0,163	0,251	0	4
SBR	80	54.81	0,186	0,280	1	4
Média	87,33	60,08	0,191	0,292	-	-

Com base na matriz de Identidade genética de Nei (1978), constatou-se a proximidade das populações, sendo as similares geneticamente as populações CNO e JAG (0,933), próximas geograficamente (112,44 km). A menor similitude genética encontrou-se entre JEQ e FLO (0,797), que distam em 608,41 km. Entretanto, o teste de Mantel não revelou correlação significativa entre as matrizes de distância geográfica e genética ( $r = 0,0005$ ,  $p = 0,384$ ).

### 5.3.2. Estrutura genética populacional

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou que 69% da variabilidade genética está contida dentro das populações e que 31% da variabilidade ocorre entre as populações, sugerindo elevada estruturação genética, visto que valores de variabilidade entre populações acima de 25% indicam forte estruturação destas (SILVA, 2015). O valor de *Fst* aponta o nível de diferenciação genética entre as populações, podendo ser considerado baixo (0,05 – 0,15), moderado (0,15 – 0,25) ou elevado (> 0,25) (WRIGHT, 1978). No presente estudo o valor médio de *Fst* foi de 0,19 indicando uma diferenciação moderada entre as populações. Outros estudos com *L. origanoides* encontraram estruturação de moderada a forte entre as populações da espécie (VEGA-VELA e SANCHÉZ, 2012; CHACÓN-SÁNCHEZ, 2012; VEJA-VELA et al., 2013). Outras espécies do gênero como *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown e *Lippia* aff. *rotundifolia* Cham., apresentaram resultados similares, com forte estruturação das populações avaliadas (MONTROYA, 2014; MEIRA, 2016).

A estrutura genética de populações resulta da influência de diferentes forças evolutivas, como seleção natural, deriva genética, mutação, entre outros, que atuam de forma distinta sobre as populações, levando a variações na distribuição da diversidade genética. O conhecimento da variabilidade genética intra e interpopulacional de uma espécie, em determinada área, auxilia em estratégias adequadas de coleta de germoplasma.

### 5.3.3 Padrões de organização da estrutura genética

A análise da estrutura genética pelo método bayesiano no programa STRUCTURE apontou a formação de quatro picos, indicando quatro possíveis formas de atribuição dos indivíduos nas 18 populações estudadas (Figura 1).

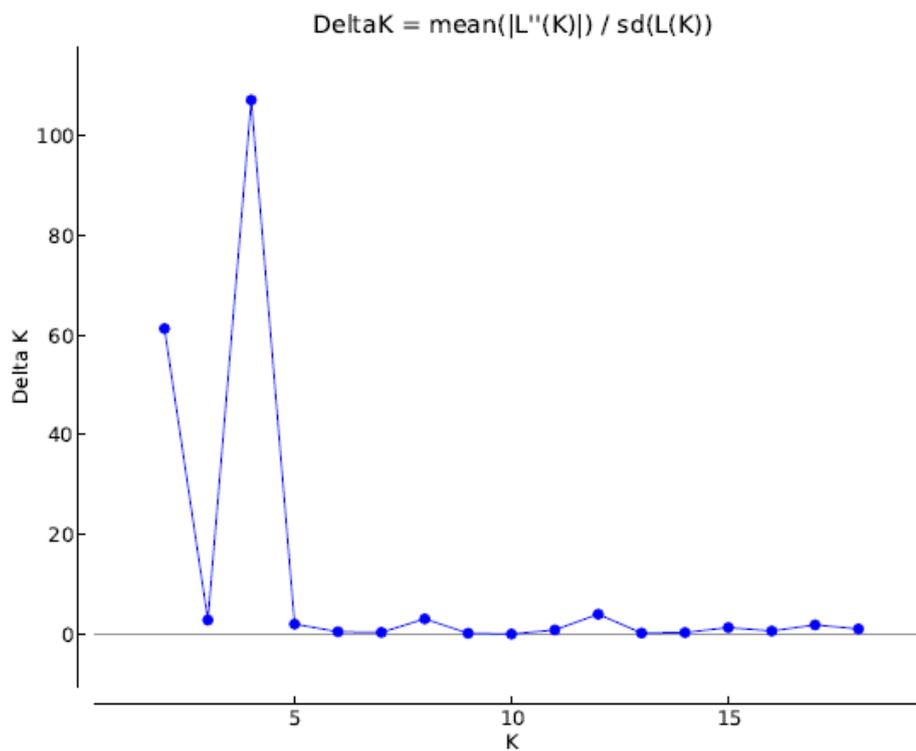


Figura 1. Valores de delta (K) segundo correção de Evanno (2005), mostrando os picos de atribuição (K) para 18 populações silvestres de *Lippia origanoides* Kunth. (Maior valor de K = 4, e os demais picos, K = 2, K = 8 e K = 12). Feira de Santana, Bahia, 2018.

A partir dos picos obtidos no programa STRUCTURE é executável estabelecer possíveis formas de mistura para as populações em estudo (Figura 2).

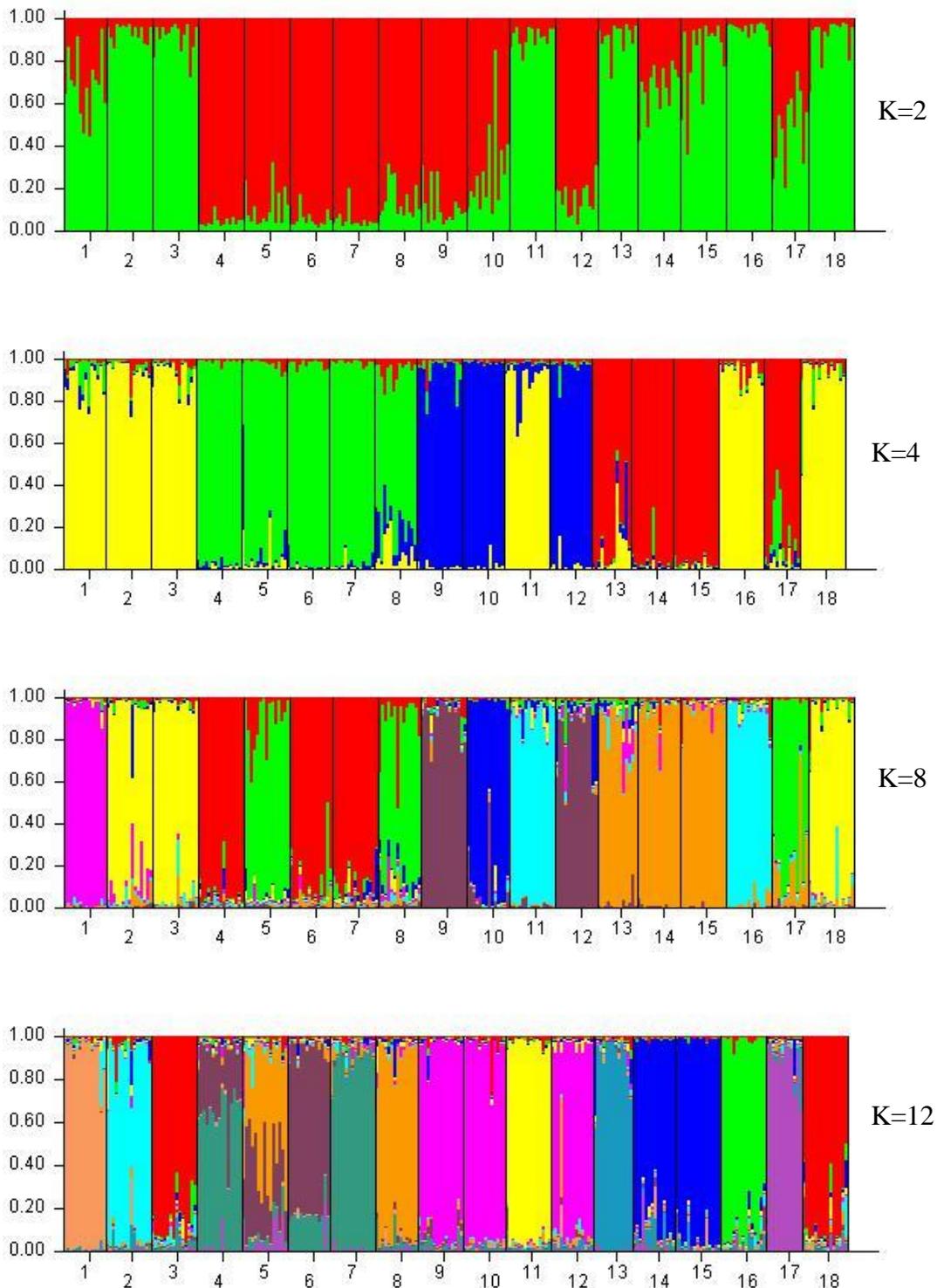


Figura 2 – Quatro possibilidades de proporção de mistura Bayesiana, gerada a partir de dados do software STRUCTURE para 18 populações silvestres de *Lippia origanoides* Kunth, coletadas na Bahia e Pernambuco. 1 = JEQ; 2 = NIT; 3 = STE; 4 = UTI; 5 = PAL; 6 = MCH; 7 = MUC; 8 = RCO; 9 = JAG; 10 = SSE; 11 = SBA; 12 = CNO; 13 = FLO; 14 = TUC; 15 = JER; 16 = QUI; 17 = SBR; 18 = SLU. Feira de Santana, Bahia, 2018.

Na primeira projeção ( $K=2$ ), as 18 populações são divididas em dois grandes grupos (Figura 2). As populações JEQ, NIT, STE, SBA, FLO, TUC, JER, QUI e SLU, apesar de alguma miscigenação, possuem predominantemente o mesmo pool gênico, formando o primeiro grupo (coloração verde). Em contrapartida, as populações UTI, PAL, MCH, MUC, RCO, JAG, SSE e CNO estão alocadas no segundo grupo formado (coloração vermelha). A população SBR apresentou características dos dois grupos, sendo impossível estabelecer a relação desta população com os dois grupos formados.

De acordo com o pico mais expressivo ( $K = 4$ ), as populações estão organizadas em quatro grupos (Figura 2). As populações JEQ, NIT, STE, SBA, QUI e SLU formando o primeiro grupo (coloração amarela). As populações UTI, PAL, MCH, MUC e RCO foram alocadas no segundo grupo (coloração verde). O terceiro grupo foi constituído pelas populações JAG, SSE e CNO (coloração azul). Por fim, as populações FLO, TUC, JER e SBR formam o quarto grupo (coloração vermelha).

O terceiro pico ( $K = 8$ ) apontou a formação de oito grupos (Figura 2), onde as populações foram distribuídas da seguinte forma: a população JEQ ficou isolada no primeiro grupo (coloração lilás), o segundo grupo foi formado pelas populações NIT, STE e SLU (coloração amarela), as populações UTI, MCH e MUC formaram o terceiro grupo (coloração vermelha), o quarto grupo foi formado pelas populações PAL e RCO (coloração verde), as populações JAG e CNO formam o quinto grupo (coloração roxa), a população SSE foi isolada no sexto grupo (coloração azul escuro), o sétimo grupo foi constituído pelas populações SBA e QUI (coloração azul clara) e o último grupo abarcou as populações FLO, TUC e JER (coloração laranja).

O quarto pico sugeriu a formação de 12 grupos ( $K = 12$ ), sendo o cenário com maior miscigenação entre as populações (Figura 2). O primeiro (coloração salmão) e segundo grupo (coloração azul claro), foram constituídos por uma única população cada, JEQ e NIT, respectivamente. O terceiro grupo foi constituído pelas populações STE e SLU (coloração vermelha), no quarto grupo ficaram as populações UTI e MUC. O quinto (coloração berinjela) e sexto grupo (coloração laranja), foram constituídos por apenas uma única população cada, MCH e RCO, concomitantemente. O sétimo grupo é formado pelas populações JAG, SSE e CNO (coloração lilás). O oitavo (coloração amarelo) e nono grupo (coloração azul médio), foram constituídos por apenas uma população, SBA e FLO. As populações TUC e JER formaram o décimo grupo (coloração azul royal), enquanto a população QUI foi isolada no décimo primeiro grupo (coloração verde), e a população SBR no último grupo (coloração

roxa). A população PAL apresentou alto nível de mistura, entre o sexto e oitavo grupo, não sendo possível definir em qual grupo se enquadra.

A análise aponta, portanto, de acordo com a expressão dos picos obtidos, que o melhor ajuste é aquele com a distribuição das 18 populações em quatro grupos ( $K = 4$ ), sendo que o maior grau de mistura ocorreu nas populações JEQ, TUC e SBR.

No dendrograma Neighbor-Joining gerado (Figura 3), as populações também formaram quatro clados, com constituição semelhante aquela apresentada na análise no STRUCTURE. As populações de MUC, UTI, MCH, PAL e RCO, todas localizadas na Chapada Diamantina e que apresentaram os índices de diversidade genética mais altos ( $I = 0,359 - 0,288$ ;  $He = 0,237 - 0,188$ ), formam o primeiro clado. A alta diversidade encontrada nessas populações já era esperada, visto que estão localizadas em uma área que é conhecida pela grande variedade e riqueza vegetal, oriundas das peculiaridades geográficas e ambientais que ocorrem nessa região.

O segundo clado foi formado pelas populações localizadas no norte do Estado da Bahia, SSE, JAG e CNO, estando as duas últimas em subgrupo (Figura 2). A proximidade entre essas três populações pode estar relacionada a fatores como clima e tipo vegetacional do local de origem, visto que todas estão localizadas na mesma zona climática (Clima Tropical Brasil Central) e ocorrem em áreas de Savana (vide capítulo 1). O terceiro clado é formado por três subgrupos, sendo o primeiro formado pelas populações SBA e QUI (Figura 3). O segundo subgrupo é constituído pelas populações JEQ e NIT, enquanto o terceiro é formado por SLU e STE. Ressalta-se o fato que essas populações estão nas proximidades e no ecótono entre os biomas Caatinga e Mata Atlântica (vide capítulo 1), sendo considerada uma área de tensão ecológica e com características ambientais peculiares (MENDES et al., 2010). Por isso, não é raro que os ecótonos sustentam populações e comunidades com características distintas das demais (ODUM, 1988).

As populações localizadas no Nordeste da Bahia e na divisa com Pernambuco compõem o quarto clado: SBR, FLO, TUC e JER, as duas últimas em subgrupo (Figura 2). Destaca-se que essas populações apresentaram os menores valores de diversidade genética ( $I = 0,247 - 0,280$ ;  $H = 0,162 - 0,186$ ) e ocorrem em áreas mais úmidas (estação seca com 3 a 5 meses de estiagem) em comparação com as populações pertencentes aos demais clados. Possivelmente, houve essa convergência devido às similitudes nos locais em que essas populações foram encontradas, sendo uma delas a menor aridez do ambiente.



No gráfico de dispersão feito através da análise de coordenadas principais (Figura 4), observa-se a mesma relação entre as populações agrupadas nas duas técnicas anteriores, com as populações formando quatro núcleos na área do gráfico, que coincidem com os grupos formados nas outras análises. No núcleo formado entre os primeiros quadrantes ficaram as populações localizadas no Nordeste da Bahia, SBR, FLO, TUC e JER. As populações mais dispersas nesse grupo foram SBR e FLO, confirmando certo grau de miscigenação apresentado por elas na análise do STRUCTURE. O segundo grupo é visto entre o segundo e terceiro quadrante, sendo formado pelas populações de MUC, UTI, MCH, PAL e RCO, sendo esta última a mais dispersa, confirmando-se com a maior miscigenação nesse grupo. As populações SSE, JAG e CNO formaram o terceiro grupo localizado entre o terceiro e o quarto quadrante. Por fim, o último grupo foi formado entre o quarto e o primeiro quadrante com as populações SBA, QUI, JEQ, NIT, SLU e STE. As populações JEQ e SBA foram as mais dispersas e polimórficas (Figura 4).

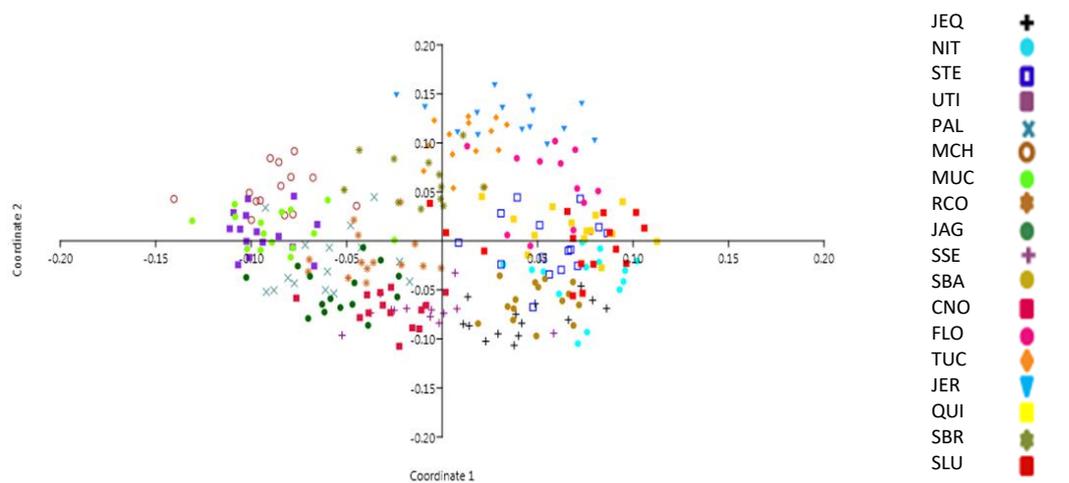


Figura 4. Gráfico de dispersão baseado na Análise de Coordenadas Principais (PCoA) para as 18 populações de *Lippia origanoides* Kunth. Feira de Santana, Bahia, 2018. POP01 = JEQ; POP02 = NIT; POP03 = STE; POP04 = UTI; POP05 = PAL; POP06 = MCH; POP07 = MUC; POP08 = RCO; POP09 = JAG; POP010 = SSE; POP011 = SBA; POP012 = CNO; POP013 = FLO; POP014 = TUC; POP015 = JER; POP016 = QUI; POP017 = SBR; POP018 = SLU.

Diante do grau de estruturação genética encontrado, é necessário o planejamento adequado de coletas de germoplasma da espécie, levando em consideração a distribuição variante da diversidade genética entre as populações estudadas, para conservar de forma correta a variabilidade genética da mesma.

#### 5.4 Propostas de manejo de germoplasma de *L. origanoides* com base nos resultados

O uso de marcadores moleculares do tipo ISSR foi útil para averiguar a diversidade genética e o grau de estrutura genética entre as populações de *L. origanoides*. Esses dados permitiram a formulação de proposições que auxiliarão na obtenção acertada de germoplasma de *L. origanoides* na região:

- 1) No geral para espécies que apresentam alta estruturação genética, como *L. origanoides*, sugere-se um esforço de coleta voltado para um maior número de populações amostradas em detrimento do número de indivíduos amostrados por população.
- 2) De acordo com a estruturação observada, sugere-se que as coletas da espécie devem ser planejadas, de modo que seja obtido germoplasma em populações pertencentes aos diferentes conjuntos gênicos encontrados, representados pelos quatro grupos vistos nas análises de estruturação genética;
- 3) Dentro de cada conjunto gênico, as populações com maiores valores de diversidade genética e com loci exclusivos, devem ter preferência no plano de manejo de germoplasma da espécie. Desse modo, no grupo 1 as populações de RCO e MUC tem prioridade na coleta de germoplasma por apresentar maiores índices de diversidade genética e locus exclusivo, respectivamente. No grupo 2 a população JAG, por apresentar maior diversidade e locus exclusivo, no grupo 3 a população NIT, por maior diversidade genética, e no grupo 4 a população SBR, por possuir maior diversidade genética e locus exclusivo;
- 4) Durante a coleta, é indicada a obtenção de amostras de espécimes com aspectos distintos e localizados em microambientes diferenciados dentro da população, esse material deve ser colocado em amostras separadas e identificadas;
- 5) A área prioritária para obter germoplasma da espécie na zona percorrida é a região da Chapada Diamantina. Possivelmente, essa região é um centro de diversidade da espécie, pois foi onde foram encontradas as populações com os índices mais altos de diversidade genética. Além disso, essa região vem sofrendo modificações rápidas devido à ação antrópica, sendo preponderante a tomada de medidas para conservação dos recursos genéticos vegetais locais.

#### 5.5 Referências

ARANGO, O. B.; PANTOJA, D. D.; SANTACRUZ, L. C. H., HURTADO, A. M. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H.B.K) del alto patia.

**Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 10, n. 2, p. 79 - 86, 2012.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. J. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, 1996.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: atris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **Biotechniques**, v. 36, p. 2 - 4. 2004.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotechnology in agriculture, **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 149 - 165, 2010.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; VALLE, T. L.; CHARRIER, A. Genetic diversity characterization of cassava cultivars *Manihot esculenta* Crantz. RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p. 105 - 113, 1998.

CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R. Delimitação de habitats em Campos Rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: Substratos, composição florística e aspectos estruturais. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 23, n. 1, p. 85 - 111, 2005.

COOP, G.; WITONSKY, D.; RIENZO, A. D.; PRITCHARD, J. K. Using environmental correlations to identify loci underlying local adaptation. **Genetics**, v. 185, p. 1411 - 1423, 2010.

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

FELSENSTEIN, J. **Phylip: phylogeny inference package version 3.69**. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle available from, 2011.

MANICA-CATTANI, M. F., ZACARIA, J., PAULETTI, G., ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biologia**, v. 69, n. 2, p. 375 - 380, 2009.

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

MARTÍNEZ-NATARÉN, D. A.; PARRA-TABLA, V.; FERRER-ORTEGA, M. M.; CALVO-IRABIÉN, L. M. Genetic diversity and genetic structure in wild populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) and its relationship with the chemical composition of the essential oil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, p. 535 - 547, 2014.

MEIRA, M. R. **Ecogeografia e diversidades genética e química de *Lippia aff. Rotundifolia* Cham.** 2016. 159 f. Tese (Doutorado em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

MENDES, K.; GOMES, P.; ALVES, M. Floristic inventory of a zone of ecological tension in the Atlantic Forest of Northeastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 61, n. 4, p. 669 - 676, 2010.

MENESES, R.; TORRES, F. A.; STASHENKO, E. E.; OCAZIONEZ R. E. Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. **Salud UIS**, v. 41, p. 236 - 243, 2009.

MONTOYA, J. O. C. **Estructura genética y fitogeografía de poblaciones colombianas de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae)**. 2014. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Nacional da Colômbia, Palmira, 2014.

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

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. **Genetics**, v. 89, p. 583 - 590, 1978.

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

PEARSE, D. E.; CRANDALL, K. A. Beyond  $F_{st}$ : analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics**, v. 5, p. 585 - 602, 2004.

PIMENTA, M. R.; FERNANDES, L. S.; PEREIRA, U. J.; GARCIA, L. S.; LEAL, S. R.; LEITÃO, S. G.; SALIMENA, F. R. G.; VICCINI, L. F.; PEIXOTO, P. H. P. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 2, p. 211 - 220, 2007.

ODUM, E.P. 1988. **Ecologia**. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. Pp. 273 - 278.

O'LEARY, N; DENHAM, S. S.; SALIMENA, F.; MÚLGURA, M. E. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, p. 197 - 219, 2012.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236 - 240, 2007.

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

PINTO, C. P. ; RODRIGUES, V. D. ; PINTO, F. P. ; PINTO, R. P. ; UETANABARO, A. P. T. ; PINHEIRO C. S. R. ; GADEA, S. F. M. ; SILVA, T. R. S. ; LUCCHESI, A. M. . Antimicrobial activity of *Lippia* species from the brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective. **Agents Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1 - 6, 2013.

PRITCHARD, J.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945 - 959, 2000.

RAMBAUT, A. Tree Figure Drawing Tool, version 1.3.1. Edinburgh: Institute o Evolutionary Biology, 2009.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9 - 17, 2002.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de ciências médicas e biológicas**, v. 5, n. 3, p. 253 - 260, 2006.

RIBEIRO, A. F.; ANDRADE, E. H. A.; SALIMENA, F. R. G.; MAIA, J. G. S. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia organoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 249 - 259, 2014.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406 - 425, 1987.

SALIMENA, F. R. G. Novos sinônimos e tipificação em *Lippia* sect. *rhodolippia* (Verbenaceae). **Hickenia**, n. 3, p.145 - 149, 2002.

SILVA, A. C. **Caracterização agrônômica, molecular e fitoquímica de *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore**. 2015. 125 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 495 – 503, 2015.

SUAREZ, A. G.; G. CASTILLO; M. I. CHACON. Genetic diversity and spatial genetic structure within a population of an aromatic shrub, *Lippia organoides* (Verbenaceae), in the Chicamocha Canyon, northeastern Colombia. **Genetics Reserch**, v. 90, p. 455 - 465, 2008.

STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J. R.; RUIZ, C. A.; ARIAS, G.; DURAN, C.; SALGAR, W. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 93 - 103, 2010.

TOZIN, L. R. S.; MARQUES, M. O. M.; RODRIGUES, T. M. Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia organoides* Kunth. (Verbenaceae) in the Brazilian Cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 943 - 953, 2015.

VARGAS-MENDOZA, C. F.; ORTEGO N-CAMPOS, I. G.; CALVO-IRABIE N, L. M. Natural selection under contrasting ecological conditions in the aromatic plant *Lippia graveolens* (H.B.K., Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 302, p. 275 - 289, 2016.

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

VEGA-VELA, N. E.; DELGADO-ÁVILA, W. A.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I. Genetic structure and essential oil diversity of the aromatic shrub *Lippia organoides* Kunth.

(Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. **Agronomía Colombiana**, v. 31, n. 1, p. 7 - 17, 2013.

VEKEMANS, X. **AFLP-surf version 1.0**. Belgium: Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, 2002.

VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J. G. M. ; COUTINHO, H. D. M. ; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible mechanism of action. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 179 - 185, 2013.

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

WOLFE, A. D.; XIANG, Q. Y.; KEPHART, S. R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1107 - 1125, 1998.

YANG, H.Q.; AN, M.Y.; GU, Z.J.; TIAN, B. Genetic diversity and differentiation of *Dendrocalamus membranaceus* (Poaceae: Bambusoideae), a declining bamboo species in Yunnan, China, as based on Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 4446 - 4457, 2012.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE 1.32**: Population Genetic Analysis. Programa para computador livre distribuído pelos autores. 1999.

## 6 CAPÍTULO IV

**Variabilidade química dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *Lippia origanoides*  
Kunth. coletados no Estado da Bahia**

**Variabilidade química dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *Lippia origanoides* Kunth. coletados no Estado da Bahia**

Emily Verônica Rosa da Silva Feijó; Lenaldo Muniz de Oliveira; Angelica Maria Lucchese

**RESUMO.** *Lippia origanoides* Kunth. é uma espécie medicinal e aromática rica em óleos essenciais, que apresenta alta diversidade química, já sendo descritos oito quimiotipos. A diversidade química na espécie é ocasionada por fatores ambientais e genéticos, sendo importante se identificar qual o percentual dessa variação que decorre de variações genéticas e ambientais. O objetivo desse estudo foi determinar a composição química dos óleos essenciais de doze genótipos de *L. origanoides*, que formam a coleção de germoplasma da espécie da Universidade Estadual de Feira de Santana, coletados em municípios do Estado da Bahia e cultivados sob as mesmas condições edafoclimáticas. As plantas matrizes foram propagadas vegetativamente através de estacas apicais, posteriormente, seguiu-se o plantio definitivo no solo, nas condições de Feira de Santana, Bahia. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com três repetições e quatro plantas por repetição. Seis meses após o plantio, seguiu-se a coleta e secagem das folhas para extrações dos óleos essenciais por meio da hidrodestilação. Nas extrações foram utilizadas amostras de 100 g, compondo três repetições por genótipo. A identificação dos compostos foi realizada por CG/DIC e CG/EM e os dados dos 20 compostos principais foram utilizados nas análises estatísticas. Foram efetuadas a análise de agrupamento UPGMA e a análise das variáveis canônicas, utilizando como medida de dissimilaridade a distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ). Os resultados permitiram classificar os genótipos em quatro grupos distintos: grupo 1, com timol como componente majoritário (JEQ, NIT e SSE) e carvacrol (STE, RJA, JAG, SBA, SLU e TUC), grupo 2, com cânfora como majoritário (QUI), grupo 3, com E-cariofileno como majoritário (SBR) e grupo 4, com cinamato de metila como majoritário (JER). A mesma formação foi vista pela análise das Variáveis Canônicas, que explicou 99,33% da variação. Os compostos mais importantes para discriminar os doze genótipos foram o E-cinamato de metila (52,70%), Z-cinamato de metila (33,25%), limoneno (4,69%), canfeno (2,49%), cânfora (2,46%) e  $\alpha$ -pineno (2,06%).

**Palavras-chave:** Coleção de Germoplasma. Divergência Genética. RGVs. Quimiotipos.

**Chemical variability of essential oils in different genotypes of *Lippia origanoides* Kunth. collected in the state of Bahia**

**Abstract.** *Lippia origanoides* Kunth. is a medicinal and aromatic species rich in essential oils, which presents high chemical diversity, and nine chemotypes have been described. The chemical diversity in the species is caused by environmental and genetic factors, and it is important to identify the percentage of this variation that results from genetic and environmental variations. The objective of this study was to determine the chemical composition of essential oils of twelve genotypes of *L. origanoides*, which form the collection of germplasm of the State University of Feira de Santana, collected in municipalities of the State of Bahia and cultivated under the same soil and climatic conditions. The seedlings were vegetative propagated by apical cuttings, followed by permanent planting in the soil, under conditions of Feira de Santana, Bahia. The experimental design was performed in randomized blocks, with three replicates and four plants per replicate. Six months after planting, the leaves were collected and dried for extraction of the essential oils by hydrodistillation. In the extractions 100 g samples were used, composing three replicates per genotype. The identification of the compounds was performed by GC/FID and GC/MS and the data of the 20 main compounds were used in the statistical analyzes. UPGMA cluster analysis and canonical variables analysis were performed using the Mahalanobis generalized distance ( $D^2$ ) as a measure of dissimilarity. The results allowed to classify the genotypes into four distinct groups: group 1, with thymol as the major component (JEQ, NIT and SSE) and carvacrol (STE, RJA, JAG, SBA, SLU and TUC), group 2, camphor (QUI), group 3, E-caryophyllene (SBR) and group 4, methyl cinnamate (JER). The same formation was seen by the analysis of the Canonic Variables, which explained 99.33% of the variation. The most important compounds to discriminate the twelve genotypes were methyl E-cinnamate (52.70%), methyl Z-cinnamate (33.25%), limonene (4.69%), camphene (2.49%), camphor (2.46%) and  $\alpha$ -pinene (2.06%).

**Key-words:** Collection of Germoplasm. Genetic Divergence. RGVs. Chemotypes.

## 6.1 Introdução

Os metabólitos secundários sintetizados pelos vegetais, além da importância biológica para as plantas, possuem grande valor associado, devido às suas aplicações como medicamentos, alimentos, cosméticos e defensivos agrícolas (SIMÕES e SPITZER, 2007). O grupo de metabólitos secundários conhecido como óleos essenciais tem se destacado pela composição química complexa, constituindo-se principalmente por derivados terpênicos e fenilpropanoides de natureza volátil (OUSSALAH et al., 2007).

Espécies vegetais ricas em óleos essenciais podem apresentar diferentes quimiotipos, onde indivíduos da mesma espécie apresentam óleos essenciais constituídos com substâncias majoritárias diferentes. O surgimento de quimiotipos pode ser causado por fatores genéticos ou por influência ambiental (SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2012). As pesquisas de caracterização de germoplasma de espécies medicinais, utilizando os compostos majoritários dos óleos essenciais como características discriminantes, têm mostrado que é frequente a ocorrência de quimiotipos variados, quando genótipos distintos são cultivados em condições padronizadas, confirmando que a variação química está relacionada com a diversidade genética intraespecífica (JANNUZI et al., 2010; JESUS, 2012; SILVA, 2015). A identificação dessa variação de cunho genético é de grande importância para ações de pré-melhoramento e melhoramento da espécie.

No Brasil, ocorrem naturalmente várias espécies do gênero *Lippia* Linn. (Verbenaceae), popularmente conhecidas como alecrins, que possuem múltiplos usos terapêuticos reconhecidos (PIMENTA et al., 2007; BLANK, 2013). Trabalhando com a espécie *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown., Jannuzi et al. (2010) fizeram a caracterização química de 16 acessos da espécie, após o cultivo uniformizado. Ao final foram identificados os quimiotipos citral-limoneno, citral-mirceno, limoneno-carvona, citral, linalol, mirceno e linalol-limoneno, demonstrando a variabilidade genética existente na espécie. Jesus (2012) identificou dois quimiotipos em sete acessos cultivados da espécie *Lippia gracilis* Schauer., tendo o carvacrol e o timol como constituintes majoritários. A diversidade química dos óleos essenciais produzidos por *Lippia origanoides* Kunth. tem sido reportado em muitas pesquisas. Stashenko et al. (2010) identificaram três quimiotipos diferentes para *L. origanoides*: o quimiotipo A, tendo como constituintes majoritários o p-cimeno/ $\alpha$  e  $\beta$ -felandreno/limoneno, o quimiotipo B que apresenta o carvacrol como majoritário, e o quimiotipo C, que apresenta o timol numa

porcentagem acima de 50%. Posteriormente, Veja-Vela et al. (2013), identificaram os quimiotipos D (timol, abaixo de 30%), E (1,8-cineol/ $\beta$ -felandreno, p-cimeno/eucaliptol/timol metil éter), F (timol metil éter/p-cymene/timol/ $\gamma$ -terpineno). No Brasil, Ribeiro et al. (2014) encontraram outro quimiotipo que apresenta o cinamato de metila e o E-nerolidol como constituintes principais. Já Tozin et al. (2015) encontraram o trans-cariofileno e o  $\alpha$ -humuleno como os constituintes majoritários do óleo essencial de *L. origanoides*.

Segundo Tozin et al. (2015), além da diversidade genética e resposta a estímulos ambientais, a alta diversidade química em *L. origanoides* deve-se em parte a sinonimização proposta por O'Leary et al. (2012), na qual o táxon que presentemente é nomeado como *L. origanoides* resulta da sinonimização de 28 táxons que antes eram considerados espécies distintas. Ressalta-se o fato que os estudos citados apontam a diversidade química da espécie em populações crescidas em condições ambientais heterogêneas, não sendo possível distinguir se a variação química é uma resposta ao ambiente ou se é resultado de diversificação genética existente em *L. origanoides*.

Conhecer a diversificação de genótipos da espécie após cultivo normatizado permitirá produzir informações para a obtenção de material vegetal mais adequado ao uso terapêutico, tanto quanto ao cultivo em larga escala e melhoramento genético da espécie. Portanto, o objetivo desse estudo foi conhecer a diversidade genética existente entre doze genótipos de *L. origanoides*, que formam a coleção de germoplasma da espécie na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), por meio da composição química dos óleos essenciais produzidos, após cultivo sob as mesmas condições edafoclimáticas.

## **6.2 Material e métodos**

### **6.2.1 Material vegetal**

A coleção de germoplasma de *L. origanoides* foi estabelecida na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEHF/UEFS), em Feira de Santana, Bahia, Brasil. A cidade está localizada entre as coordenadas 12° 15' 24" S e 37° 57' 53" W, com altitude de 230 m, índice pluviométrico anual aproximado dos 900 mm e temperatura média anual de 24 °C. A coleção é formada por doze genótipos, oriundos de diferentes localidades (Tabela 1).

Tabela 1. Município de origem, sigla de identificação, coordenadas geográficas e altitude dos sítios de coleta dos 12 acessos da coleção de germoplasma de *Lippia organoides* Kunth. Feira de Santana, Bahia, 2018.

<b>Município/Estado</b>	<b>Sigla de identificação</b>	<b>Longitude (O)</b>	<b>Latitude (S)</b>	<b>Altitude (m)</b>
Santa Terezinha/BA	STE	39°32'14,8"	12°35'46,8"	140
Jequié/BA	JEQ	40°03'28,6"	13°45'54,0"	346
Nova Itarana/BA	NIT	39°56'05,6"	12°58'22,0"	526
Quixabeira/BA	QUI	40°07'39,1"	11°20'03,9"	396
Riachão do Jacuípe/BA	RJA	39°26'12,6"	11°46'54,6"	193
Santa Brígida/BA	SBR	38°15'43,9"	09°50'16,4"	397
Jaguarari/BA	JAG	40°13'58,0"	10°05'20,4"	543
Santa Bárbara/BA	SBA	38°58'15,5"	12°01'04,5"	270
Santaluz/BA	SLU	39°24'50,0"	11°12'30,4"	348
Sento Sé/BA	SSE	41°53'06,0"	09°44'45,0"	400
Jeremoabo/BA	JER	38°17'54,4"	10°13'35,7"	227
Tucano/BA	TUC	38°49'23,7"	11°01'25,5"	354

As plantas matrizes de cada acesso foram propagadas vegetativamente através de estacas apicais, que foram mantidas em casa de vegetação sob nebulização intermitente, até o período do plantio definitivo no solo. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com três repetições e quatro plantas por repetição, totalizando 12 plantas por acesso, sendo que cada acesso foi considerado um tratamento. O experimento foi realizado no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, entre Setembro de 2015 e Fevereiro de 2016. As mudas foram plantadas em covas com dimensões de 20 x 20 x 20 cm, em espaçamento de 2,0 m entre linhas e 1,0 m entre plantas. O solo do plantio foi preparado previamente com capina e adubação, adicionando-se 0,5 L de esterco bovino curtido por cova. Posteriormente ao plantio, realizou-se irrigação em dias alternados e capinas manuais, sempre que necessário.

A coleta das amostras foliares foi realizada seis meses após o plantio, foram coletadas folhas de três plantas por genótipo, em cada um dos três blocos. Após a coleta, as folhas foram secas à temperatura ambiente em local sombreado. Em seguida, foram pesadas amostras de 100 g, para as extrações de óleo essencial.

### 6.2.2 Extração e análise da composição química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos através de extração em Aparelho de Clevenger, utilizando-se 100 g de matéria foliar seca por bloco, com três repetições. O processo de extração durou três horas, contadas a partir da condensação da primeira gota de óleo (SILVA, 2012). Finalizado esse período, os óleos essenciais de cada genótipo foram separados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e armazenados em frascos de vidro escuro. As amostras de óleo essencial foram mantidas no freezer (-5°C) até a realização da análise química.

A análise da composição química dos óleos essenciais foi realizada por Cromatografia Gasosa, empregando-se cromatógrafos a gás com Detector de Ionização em Chama (CG/DIC) e acoplado a Espectrômetro de Massas (CG/EM). Na análise por CG/DIC foi utilizado Cromatógrafo Varian® CP-3380, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar Chrompack CP-SIL 5 (30 m x 0,5 mm, com espessura do filme de 0.25 µm), temperatura do injetor de 220°C e do detector de 240°C, hélio como gás de arraste (1 mL min<sup>-1</sup>), com programa de temperatura do forno de: 60°C a 240°C (3°C min<sup>-1</sup>), 240°C (20 min). As análises por CG/EM foram realizadas em Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas GC/MS-QP 2010 Shimadzu®, coluna capilar DB-5ms (30 m x 0,25 mm, com espessura de filme 0.25 µm), temperatura do injetor 220°C, gás de arraste hélio (1 mL/min), temperatura da interface de 240°C, temperatura da fonte de ionização de 240°C, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização: 0,7kV e programa de temperatura do forno: 60°C a 240°C (3°C/min), 240°C (20 min). Antes da injeção, aproximadamente 0,025 g de cada amostra de óleo essencial foi pesada em balança analítica e diluída em 1500 µL do solvente diclorometano. O volume de 0,2 µL desta solução foi injetado, sob as mesmas condições supracitadas, no CG/DIC e no CG/EM, com razão de split de 1:100. Os componentes foram identificados através da comparação dos tempos de retenção dos espectros de massas obtidos com os da biblioteca do equipamento. A identificação dos constituintes foi realizada através do índice de Kovats (IK), obtido pela co-injeção da amostra a ser analisada com uma série homóloga de n-alcenos. Todos os procedimentos concernentes a extração e identificação da composição química dos óleos essenciais foram realizados nas dependências do Laboratório de Produtos Naturais (LAPRON) do Departamento de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

### 6.2.3 Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados por meio de técnicas de análise multivariada, como análise de agrupamento, variáveis canônicas e importância relativa das características. Foi utilizada a distância de Mahalanobis como medida de dissimilaridade para a análise de agrupamento. A formação dos grupos foi realizada por meio do método hierárquico Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average (UPGMA). Para estabelecer o corte no dendograma foi utilizado o método de Mojema (1977), que faz uma definição estatística para o número de grupos formados em métodos hierárquicos. A importância relativa das variáveis para a divergência genética foi determinada de acordo com Singh (1981). Todas as técnicas multivariadas empregadas foram realizadas pelo programa GENES (CRUZ, 2013).

### 6.3 Resultados e Discussão

O percentual de identificação total dos constituintes dos óleos essenciais analisados variou de 90,72 a 99%, demonstrando que a técnica utilizada foi eficaz na discriminação e reconhecimento dos compostos químicos (Tabela 2). Os resultados mostraram que os óleos essenciais da espécie são constituídos de terpenos, especificamente mono e sesquiterpenos, com maior porcentagem de monoterpenos em todos os genótipos, com valores oscilando de 59,68 a 78,92%, enquanto o percentual de sesquiterpenos variou de 19,72 a 33,95% (Tabela 2). Óleos essenciais com maior proporção de monoterpenos também foram encontrados em outros estudos com *L. origanoides* (BETANCUR-GALVIS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2007). Houve variação na composição química dos óleos essenciais, sendo identificado um total de 53 compostos, distribuídos entre os óleos essenciais dos 12 genótipos avaliados (Tabela 2). Os vinte principais compostos encontrados na análise química foram o  $\alpha$ -tujeno,  $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -mirceno, p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol,  $\gamma$ -terpineno, linalol, cânfora, terpinen-4-ol, timol éter metílico, timol, carvacrol, E-cinamato de metila, Z-cinamato de metila, E-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, biciclogermacreno e óxido de cariofileno. A presença e proporção desses componentes definiram a distribuição dos genótipos mais similares em quatro grupos nas duas técnicas de análise multivariada que foram empregadas.

Tabela 2. Percentual dos compostos encontrados nos óleos essenciais obtidos de 12 genótipos de *Lippia origanoides* Kunth. Feira de Santana, BA, 2018.

Composto	IK <sub>lit</sub>	IK <sub>calc</sub>	STE	JEQ	NIT	QUI	RJA	SBR	JAG	SBA	SLU	SSE	JER	TUC
$\alpha$ -tujeno	939	929	1,19	0,92	0,70	0,31	1,06	t	0,78	1,22	0,90	0,45	t	0,91
$\alpha$ -pineno	939	937	0,44	0,44	0,51	2,11	0,36	16,10	0,34	0,58	0,68	0,41	2,45	0,27
canfeno	954	959	0,69	T	0,61	10,23	0,34	0,89	-	t	2,21	-	-	t
sabineno	975	976	t	t	0,11	0,41	-	-	-	0,10	t	-	-	2,39
$\beta$ -pineno	979	980	0,21	0,06	0,20	0,99	0,14	0,81	t	0,22	0,32	t	0,13	0,12
$\beta$ -mirceno	990	990	2,37	3,27	2,68	1,96	2,66	1,40	2,52	2,37	2,00	2,61	0,65	2,28
$\alpha$ -felandreno	1002	1005	t	t	t	-	0,17	t	0,05	t	t	0,72	0,00	0,16
$\delta$ -3-careno	1011	1012	t	t	-	-	t	-	-	t	t	-	-	t
$\alpha$ -felandreno+ $\delta$ -3-careno	1002/ 1011	1007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,19	-
$\alpha$ -terpineno	1017	1018	1,54	1,08	0,96	0,26	2,02	t	1,52	1,50	1,02	-	-	1,69
p-cimeno	1024	1026	12,97	8,09	7,24	3,50	15,97	4,57	14,50	13,18	10,80	8,55	0,66	12,29
limoneno	1029	1031	0,45	0,42	0,52	3,24	0,42	1,71	0,35	0,32	0,67	0,39	0,58	0,29
$\beta$ -felandreno	1029	1033	t	0,07	-	-	0,11	t	t	-	t	0,21	t	-
1,8-cineol	1031	1034	0,59	1,89	1,79	2,47	0,36	t	t	1,59	0,59	0,25	0,22	0,11
E- $\beta$ -ocimeno	1050	1049	t	-	-	t	-	0,87	0,21	0,23	-	0,35	t	t
$\gamma$ -terpineno	1059	1061	7,19	4,07	3,56	2,63	10,43	3,08	7,95	6,93	5,53	2,35	1,06	9,67
terpinoleno	1088	1093	-	-	-	0,99	-	-	t	-	t	t	1,48	t
hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1070	1071	-	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
linalol	1098	1098	0,38	0,41	0,79	1,44	0,41	0,87	0,26	0,44	3,74	t	0,22	0,17
ipsdienol	1145	1146	-	-	-	-	0,26	-	t	0,29	-	-	-	0,27
cânfora	1146	1146	-	-	-	20,87	0,53	t	t	-	3,91	t	t	t
borneol	1169	1169	1,41	-	1,22	5,44	0,28	t	-	-	1,11	t	t	t
terpinen-4-ol	1177	1178	0,56	0,60	0,57	0,37	0,61	t	0,67	0,49	0,40	0,68	t	0,67
$\alpha$ -terpineol	1188	1191	0,14	0,27	0,27	0,29	0,00	t	t	0,28	0,11	t	t	t
timol, éter metílico	1235	1235	3,63	4,65	0,5	1,19	2,79	1,77	1,71	2,37	3,95	2,71	t	5,38
neral	1238	1240	-	-	-	-	-	1,82	-	-	-	-	t	-
geranial	1267	1269	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-
acetato de linalol	1257	1259	-	-	-	-	-	0,63	-	-	-	-	-	-
timol	1290	1291	4,20	62,33	61,41	7,00	5,22	1,14	5,64	5,54	2,29	75,92	0,69	4,66
carvacrol	1299	1303	49,78	0,69	0,57	12,95	47,36	8,35	57,28	47,31	39,48	0,44	0,44	54,61
acetato de carvacrol	1376	1372	t	-	-	-	-	1,84	t	-	t	-	-	1,54
acetato de timol	1352	1355	-	-	2,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E</i> -cinamato de metila	1378	1387	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65,47	-
<i>Z</i> -cinamato de metila	1299	1306	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,83	-
$\alpha$ -copaeno	1376	1382	-	-	-	0,84	-	2,11	-	-	0,22	-	t	t
acetato de geranila	1381	1387	-	-	-	-	-	3,53	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -elemeno	1390	1397	-	-	-	0,76	-	-	-	-	t	-	-	-
E-cariofileno	1419	1423	4,23	4,84	8,43	6,99	3,21	20,39	1,77	6,47	8,99	1,57	4,38	0,61

aromadendreno	1441	1443	0,5	0,40	0,37	0,19	0,38	-	-	0,49	0,55	-	-	t
<i>allo</i> -aromadendreno	1460	1463	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,49	-
$\alpha$ -humuleno	1454	1457	0,26	0,39	0,44	0,62	0,29	1,90	0,2	0,36	0,50	0,24	1,26	1,70
germacreno D aromadendrano, dehidro	1485	1487	-	-	-	0,53	-	-	-	-	t	-	0,21	-
1462	1465	-	-	-	-	-	1,36	-	-	-	-	-	-	-
amorfa-4,7(11)-diene	1481	1481	-	-	-	-	-	1,26	-	-	-	-	-	-
viridifloreno	1496	1491	0,97	0,64	0,57	0,55	0,68	-	0,13	1,39	0,77	-	0,08	t
biciclogermacreno	1500	1497	1,71	0,59	0,85	4,7	0,90	3,36	0,08	2,26	3,79	t	0,15	t
$\beta$ -bisaboleno	1505	1515	-	-	-	-	-	1,57	-	-	-	-	-	0,86
$\delta$ -cadineno	1523	1526	-	-	-	-	-	2,45	-	-	-	-	0,56	-
espatulenol	1578	1580	0,64	0,37	0,23	1,33	0,47	t	0,21	0,99	0,93	-	t	t
óxido de cariofileno	1583	1586	0,82	1,09	1,01	1,16	0,86	1,12	0,81	1,10	1,60	0,79	2,31	0,13
viridiflorol	1592	1595	0,19	0,43	t	0,12	0,15	2,58	t	0,23	0,29	t	t	t
guaiol	1600	1602	-	-	0,28	-	-	1,42	-	-	-	-	0,40	-
cubenol	1646	1647	-	-	-	-	-	1,79	-	-	-	-	0,79	-
Porcentagem de monoterpenos			72,01	71,20	67,90	61,77	71,26	59,68	73,64	70,01	66,70	78,92	62,68	70,71
Porcentagem de sesquiterpenos			25,04	27,12	30,55	32,35	27,15	31,03	23,43	26,67	30,56	19,72	33,95	28,28
Total de compostos identificados			97,06	98,34	98,47	94,14	98,43	90,72	97,00	96,69	97,28	98,66	96,65	99,00

\*t – traços, - ausência

No dendrograma formado pelo método de agrupamento UPGMA, com base na distância de Mahalanobis ( $D^2$ ), com ponto de corte a 2,16, segundo critério de Mojema (1977), foram formados quatro grupos (Figura 1). O primeiro grupo foi formado pelos genótipos NIT, SSE, JEQ, JAG, TUC, RJA, STE, SBA, SLU, distribuídos em três subgrupos. O primeiro subgrupo foi formado pelos genótipos NIT, SSE e JEQ. O componente majoritário dos óleos essenciais produzidos por esses genótipos foi o timol (61,41 a 75,97%) seguido do p-cimeno (7,24 a 8,55%). Também são encontrados valores consideráveis de  $\beta$ -mirceno,  $\gamma$ -terpineno e E-cariofileno.

Apesar de diferir dos demais genótipos por apresentarem o timol como constituinte majoritário, os genótipos desse subgrupo possuem quantidades relevantes de p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno, semelhantemente aos demais genótipos inclusos no primeiro grupo, fato que os levou a formarem apenas um subgrupo e não outro grupo separado. O segundo subgrupo constituído dos genótipos JAG, TUC e RJA, apresentam óleos essenciais com o carvacrol como composto majoritário (47,36 a 57,28%), acompanhado do p-cimeno (12,29 a 15,97%),  $\gamma$ -terpineno (7,95 a 10,43%) e timol (4,66 a 5,22%). Os genótipos STE, SBA e SLU formam o terceiro subgrupo, com o carvacrol como constituinte majoritário (39,48 a 49,78%), em seguida o p-cimeno (10,80 a 13,18%) e o  $\gamma$ -terpineno (5,53 a 7,19%). Apesar de apresentar

praticamente os mesmos compostos majoritários do subgrupo anterior, esses genótipos apresentaram menores quantidades de carvacrol, p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno em comparação com o segundo subgrupo. Além disso, esse subgrupo apresenta maior porcentagem de E-cariofileno (4,23 a 8,99%), biciclogermacreno (1,71 a 3,79%) e óxido de cariofileno (0,82 a 1,60%). O segundo grupo formado foi constituído apenas pelo genótipo QUI, que tem como constituintes principais a cânfora (20,87%), carvacrol (12,95%) e canfeno (10,23%). O óleo essencial desse genótipo também tem valores consideráveis de timol (7%) e E-cariofileno (6,99%). O genótipo SBR formou o terceiro grupo, diferentemente dos demais o óleo essencial desse genótipo é rico em E-cariofileno (20,39%) e  $\alpha$ -pineno (16,1%). O último grupo foi constituído pelo genótipo JER que apresentou óleo essencial com alta porcentagem de E-cinamato de metila (65,47%). Outros compostos com valores consideráveis foram o Z-cinamato de metila (6,83%) e o E-cariofileno (4,38%) (Figura 1).

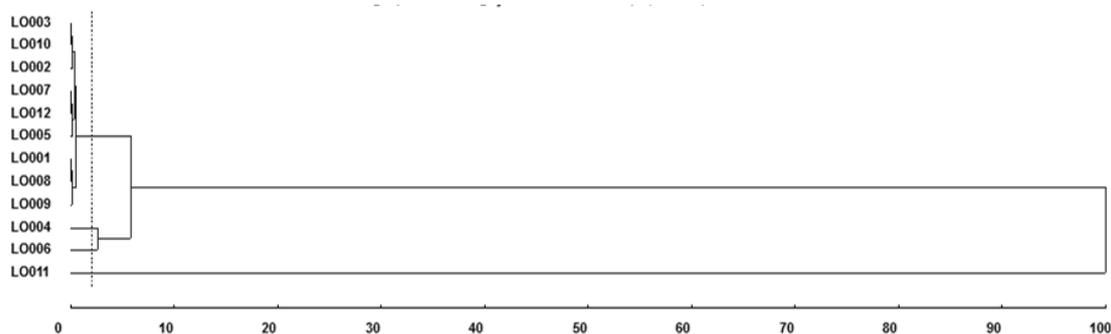


Figura 1. Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 12 genótipos de *Lippia organoides* Kunth., obtido pelo método de UPGMA, com base na composição química dos óleos essenciais, utilizando-se a distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ). LO001 – STE, LO002 – JEQ, LO003 – NIT, LO004 – QUI, LO005 – RJA, LO006 – SBR, LO007 – JAG, LO008 – SBA, LO009 – SLU, LO010 – SSE, LO011 – JER, LO012 – TUC. Feira de Santana, Bahia, 2018.

A formação dos quatro grupos foi similar nos resultados obtidos pela técnica das variáveis canônicas. Novamente, os genótipos STE, JEQ, NIT, RJA, JAG, SBA, SLU, SSE e TUC formam o primeiro grupo, onde pode-se perceber a sobreposição dos pontos devido a menor dissimilaridade genética entre esses genótipos (Figura 2). Os genótipos com a composição química mais diferenciada e, conseqüentemente, maior dissimilaridade genética, QUI, SBR e JER formam respectivamente o segundo, terceiro e quarto grupos (Figura 2).

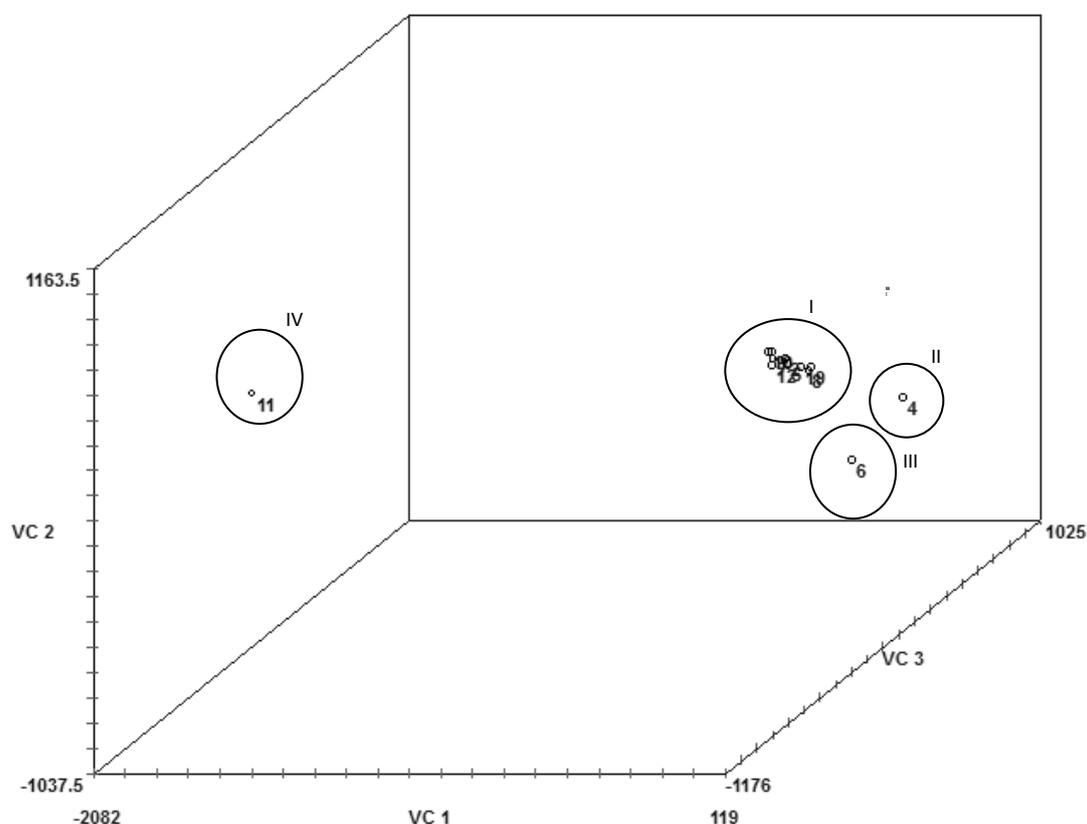


Figura 2. Dispersão gráfica dos escores em relação aos eixos representativos das variáveis canônicas (VC1, VC2, VC3) relativos aos 20 caracteres avaliados em 12 genótipos de *Lippia origanoides* Kunth, após cultivo padronizado. 01 – STE, 02 – JEQ, 03 – NIT, 04 – QUI, 05 – RJA, 06 – SBR, 07 – JAG, 08 – SBA, 09 – SLU, 10 – SSE, 11 – JER, 12 – TUC. Feira de Santana, Bahia, 2018.

Na análise baseada nas variáveis canônicas, as três primeiras variáveis explicaram 99,33% da variação total entre os genótipos estudados, sendo a primeira variável canônica (influenciada pelos compostos Z-cinamato de metila,  $\alpha$ -tujeno,  $\alpha$ -pineno, canfeno e cânfora) responsável por 93,45%, a segunda variável canônica (influenciada pelos compostos limoneno e linalol) por 4,71% e a terceira variável canônica (influenciada pelo composto E-cinamato de metila) por 1,17%, demonstrando a eficácia dessa técnica aplicada nesse estudo, pois a utilização dessa técnica é confiável no estudo de divergência genética quando as duas primeiras variáveis explicam mais de 80% da divergência genética (CRUZ e REGAZZI, 2001).

Os compostos mais importantes para discriminar os doze genótipos, de acordo com o método de Singh (1981), foram E-cinamato de metila (52,70%), Z-cinamato de metila (33,25%), limoneno (4,69%), canfeno (2,49%), cânfora (2,46%) e  $\alpha$ -pineno (2,06%), juntos esses compostos contribuíram com 97,65% da divergência genética. Os demais compostos apresentaram pouca influência na separação dos grupos, principalmente o composto 1,8-cineol que contribuiu menos, com apenas 0,01%, podendo ser descartado em outros estudos de divergência genética da espécie (Figura 3).

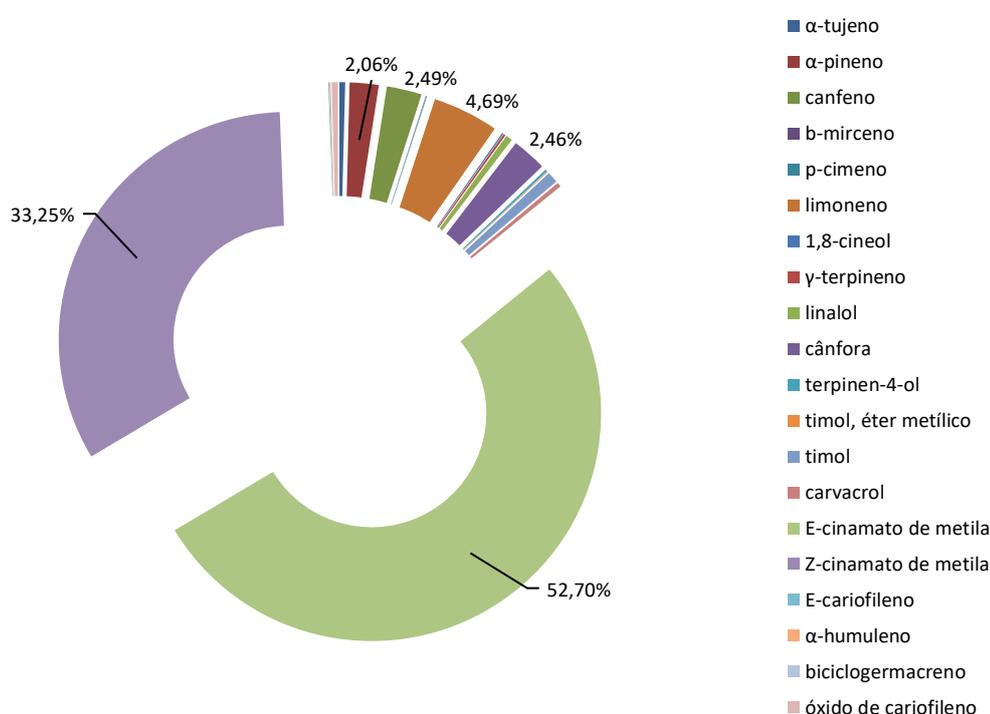


Figura 3. Contribuição relativa (%) dos compostos avaliados para a divergência entre os 12 acessos de *Lippia origanoides* Kunth, após o cultivo padronizado. Feira de Santana, Bahia, 2018.

Óleos essenciais ricos em timol, como apresentado pelos genótipos JEQ, NIT e SSE, que formam um subgrupo do primeiro grupo do dendrograma, já foram reportados para a espécie em outros estudos. A presença desse monoterpene é tão ocorrente na composição do óleo essencial da espécie que além do quimiotipo C, proposto por Stashenko et al. (2010) com proporção de cerca de 56% de timol, Vega-Vela et al. (2013) propuseram a definição de outro quimiotipo para a espécie, onde o timol era o composto majoritário, entretanto, com proporção de até 30%. A composição química apresentada pelos genótipos JEQ, NIT e SSE é

similar ao quimiotipo C proposto por Stashenko et al. (2010), visto que além da alta proporção de timol, apresentam valores de p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno similares aos descritos pelos pesquisadores. O quimiotipo C também foi encontrado por distintos pesquisadores em outros países da América Central e do Sul (VICUNÃ et al., 2009; SABINO et al., 2012; MARTINÉZ-NATARÉN et al., 2014).

A ocorrência do carvacrol como composto majoritário no óleo essencial de *L. origanoides*, como visto nos demais subgrupos do primeiro grupo formado no dendrograma, é recorrente na literatura científica. Stashenko et al. (2010) descreveram esse quimiotipo rico em carvacrol, p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno em estudo desenvolvido com a espécie na Colômbia. O mesmo quimiotipo foi encontrado por Sabino et al. (2012) discriminando quimiotipos de *L. origanoides* ocorrentes na Guatemala. Além dessa pesquisa, a ocorrência desse quimiotipo no Brasil foi reportada em outros estudos (DOS SANTOS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007; SARRAZIN et al., 2015).

Contudo, nenhum estudo sobre a diversidade fitoquímica de *L. origanoides* reportou a ocorrência da cânfora seguida do carvacrol como componentes principais do óleo essencial, como visto no genótipo QUI, fato que pode indicar que esse genótipo pertence a determinado quimiotipo que ainda era desconhecido para a espécie. Outras espécies do gênero *Lippia* Linn. Apresentam o monoterpene cânfora nos óleos essenciais produzidos, como *Lippia dulcis* Trevir. (ADAMS e OLIVEIRA, 2016), *Lippia alba* Mill. N. E. Brown. (TOMAZONI et al., 2016) e *Lippia grata* Schauer (JESUS, 2012).

O genótipo SBR, rico em E-cariofileno e  $\alpha$ -pineno, que formou o terceiro grupo no dendrograma, também apresentou óleo essencial com composição química diferente dos padrões conhecidos para *L. origanoides*. Esses compostos são recorrentes na composição química dos óleos essenciais da espécie, mas não na proporção que foi encontrada nesse genótipo (DOS SANTOS et al., 2004; STASHENKO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2014). A composição mais próxima foi encontrada por Tozin et al. (2015), que encontraram indivíduos da espécie que apresentaram óleo essencial com o trans-cariofileno como composto majoritário, entretanto, os percentuais de trans-cariofileno eram mais altos (33,7 - 60,6%), além disso, os percentuais de  $\alpha$ -pineno apresentados eram mais baixos (0,5 - 4,2%).

O E-cinamato de metila foi um dos componentes majoritários do quimiotipo da espécie descrito por Ribeiro et al. (2014), semelhante ao óleo essencial produzido pelo genótipo JER. Entretanto, a proporção do composto foi mais baixa (26,6%) do que a quantidade apresentada no genótipo LO011 (65,47%). Segundo Ribeiro et al. (2014) *L.*

*origanoides* é uma espécie medicinal promissora devido aos distintos óleos essenciais que apresentam várias aplicações terapêuticas.

Todos os compostos majoritários encontrados nos óleos essenciais obtidos dos genótipos avaliados da espécie apresentam atividades biológicas comprovadas. Botelho et al. (2007) comprovaram a ação antimicrobiana do óleo essencial rico em timol da espécie, indicando a utilização do mesmo na produção de antisépticos bucais. As ações antifúngica e anti citotóxica desse quimiotipo foi confirmada no trabalho de Betancur-Galvis et al. (2011). As atividades antibacteriana e antioxidante dos óleos essenciais pertencentes ao quimiotipo rico em carvacrol foram confirmadas, bem como, a baixa toxicidade do óleo, indicando seu possível uso nas indústrias farmacêuticas e alimentícia (DOS SANTOS et al., 2004; SARRAZIN et al., 2015). O óleo essencial da espécie *Lippia grata* Schauer, rico em cânfora, demonstrou ação analgésica eficiente no tratamento de dor orofacial em testes feitos com ratos (SIQUEIRA-LIMA et al., 2014). O sesquiterpeno E-cariofileno tem ação anti-inflamatória reconhecida e o  $\alpha$ -pineno apresenta ação antibacteriana confirmada (LEITE et al., 2007; MICHIELIN, 2009). O cinamato de metila mostrou ação acaricida no estudo desenvolvido por Lara (2016), se mostrando como opção viável no quesito ambiental ao combate de carrapatos.

Pesquisas que avaliaram a diversidade química intraespecífica em *L. organoides* apontam as discrepâncias na composição dos óleos essenciais como resposta a diferentes ambientes, solos e estações (STASHENKO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2014; TOZIN et al., 2015). Todavia, as diferenças na composição dos óleos essenciais obtidos nessa pesquisa indicam que a diversidade química é consequência da diversidade genética existente entre os doze genótipos avaliados, visto que o experimento foi conduzido sob o mesmo solo, no mesmo período e sob as mesmas condições climáticas (SILVA, 2015). Após o cultivo padronizado também foi confirmada variabilidade genética entre genótipos das espécies *Lippia alba* Mill. N. E. Brown. (TOMAZONI et al., 2016) e *Lippia gracilis* Schauer. (JESUS, 2012), com base na composição química dos óleos essenciais. A alta variabilidade genética encontrada no gênero pode ser ocasionada pela forma de reprodução alogâmica e ocorrência comum de hibridizações (MAIA et al., 2005; RUFINO et al., 2010).

Quanto a variação fitoquímica encontrada em *L. organoides*, Tozin et al. (2015) destacam que a causa pode ser taxonômica. Pois segundo os autores, o elevado número de quimiotipos encontrados na espécie resulta-se da sinonimização proposta por O'Leary et al. (2012), na qual o táxon que no presente é conhecido como *L. organoides* resulta da

sinonimização de 28 táxons que antes eram considerados espécies separadas. Diante de problemas taxonômicos, o conhecimento acerca dos componentes principais que ocorrem nos óleos essenciais de uma espécie, pode ser usado como ferramenta na classificação mais acertada, fato que reforça ainda mais a necessidade de conhecer a completude fitoquímica de *L. origanoides*.

Como recurso genético vegetal, *L. origanoides* deve ter sua diversidade genética conhecida e conservada, de modo que seja utilizada da melhor forma possível. De acordo com Jannuzi et al. (2010), espécies com elevada diversidade genética, comum em plantas nativas ainda não domesticadas, tem mais chances de serem objeto de melhoramento genético bem sucedido, pois é possível a seleção de genótipos superiores de acordo com a demanda apresentada (JANNUZI et al., 2010). A seleção de genótipos com base nesses dados fitoquímicos poderá gerar materiais superiores para o cultivo, aliado à possibilidade de produção de matéria prima padronizada para atender aos interesses industriais.

#### **6.4 Conclusão**

A análise da composição química dos óleos essenciais obtidos de doze genótipos de *Lippia origanoides* Kunth., após cultivo padronizado, mostrou diferenças qualitativas, indicando a existência de diversidade genética entre eles. As técnicas multivariadas utilizadas mostraram a formação de quatro grupos distintos de acordo com a similaridade genética entre eles. Os componentes majoritários encontrados nos genótipos foram o timol (JEQ, NIT e SSE), carvacrol (STE, RJA, JAG, SBA, SLU e TUC), cânfora (QUI), E-cariofileno (SBR) e cinamato de metila (JER). Dessa forma, o presente estudo contribuiu para ampliar o conhecimento sobre a espécie, bem como embasar um programa de pré-melhoramento genético da mesma, com vistas à seleção de genótipos com óleos essenciais de composição desejada.

## 6.5 Referências

ADAMS, R. P.; OLIVEIRA, P. F. Comparison of intensely sweet volatile leaf oils of *Lippia dulcis* (Verbenaceae) with low and high camphor from Brazil and Mexico. **Phytologia**, v. 98, n. 3, p. 207 - 214, 2016.

BETANCUR-GALVIS, L.; ZAPATA, B.; BAENA, A.; BUENO, J.; RUÍZ-NOVA, C. A.; STASHENKO, E.; MESA-ARANGO, A. C. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K grown in Colombia. **Revista de la Universidad Industrial de Santander**, v. 43, n. 2, p. 141 - 148, 2011.

BLANK, A. F. Transformação de recursos genéticos de plantas aromáticas nativas em riqueza: o potencial do alecrim-de-tabuleiro (*Lippia gracilis*). **Revista da Associação Brasileira de Horticultura**, v. 31, n. 3, 2013.

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, 2007.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2° ed. rev. Viçosa: UFV, 2001. 390 p.

CRUZ, C. D. Genes – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum – Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271 - 276, 2013.

DOS SANTOS, F. J. B.; LOPES, J. A. D.; GRAÇAS, A. M.; CITO, L.; OLIVEIRA, E. H.; LIMA, S. G.; REIS, F. A. M. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. **Journal of Essential Oil Research**, v.16, n. 5, p. 504 -506, 2004.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; BIZZO, H. R.; GRACINDO, L. A. M. Avaliação agrônômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n.4, p. 412-417, 2010.

JESUS, H. C. R. **Composição química do óleo essencial de sete genótipos de *Lippia gracilis* Schauer. e reações de biotransformações de voláteis**. 2012. 136 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2012.

LARA, R. A. **Eficácia acaricida de uma emulsão contendo linalol e cinamato de metila, frente à espécie de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887)**. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

LEITE, A. M.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; DINIZ, M. F. F. M.; TRAJANO, V. N.; MEDEIROS, I. A. Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of

potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 121 - 126, 2007.

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. H. L.; ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M. M. Essential oil variation in *Lippia glandulosa* Schauer. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 676 - 680, 2005.

MARTÍNEZ-NATARÉN, D. A.; PARRA-TABLA, V.; FERRER-ORTEGA, M. M.; CALVO-IRABIÉN, L. M. Genetic diversity and genetic structure in wild populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) and its relationship with the chemical composition of the essential oil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 3, p. 535 -547, 2014.

MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: na evaluation. **Computational Journal**, v. 20, n. 1, p. 359 - 363, 1979.

MICHIELIN, E. M. Z. **Obtenção de extrato de erva baleeira (*Cordia verbenacea* D.C.) por diferentes técnicas: medida da atividade biológica, modelagem matemática e determinação do equilíbrio de fases**. 2009. 235 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

O'LEARY, N; DENHAM, S. S.; SALIMENA, F.; MÚLGURA, M. E. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, p. 197 - 219, 2012.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236 - 240, 2007.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414 - 420, 2007.

PIMENTA, M. R.; FERNANDES, L. S.; PEREIRA, U. J.; GARCIA, L. S.; LEAL, S. R.; LEITÃO, S. G.; SALIMENA, F. R. G.; VICCINI, L. F.; PEIXOTO, P. H. P. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 2, p. 211 - 220, 2007.

RIBEIRO, A. F.; ANDRADE, E. H. A.; SALIMENA, F. R. G.; MAIA, J. G. S. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 249 - 259, 2014.

RUFINO, E. R.; SIQUEIRA, W. J. ; MARQUES, M. O. M.; COLOMBO, C. A.; CHIORATO, A. F.; AZEVEDO FILHO, J. A.; LOURENÇÃO, A. L.; YAMAMOTO, P. Y. ; MARTINS, A. L. M. Estimativas de parâmetros genéticos de caracteres relacionados ao vigor de estacas em *Lippia alba*. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 779 - 785, 2010.

SABINO, J. F. P.; REYES, M. M.; BARRERA, C. D. F.; SILVA, A. J. R. Análise e discriminação de quimiotipos de *Lippia graveolens* H.B.K. da Guatemala por microextração em fase sólida, CG-EM e análise multivariada. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 97 - 101, 2012.

SARRAZIN, S. L. F.; SILVA, L. A.; ASSUNÇÃO, A. P. F.; OLIVEIRA, R. B.; CALAO, V. Y. P.; SILVA, R.; STASHENKO, E. E.; MAIA, J. G.S.; MOURÃO, R. H. V. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Molecules**, v. 20, p. 1860 - 1871, 2015.

SILVA, G. C. **Biorreguladores vegetais, substratos e estaquia em *Lippia origanoides* H.B.K. (Verbenaceae)**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

SILVA, A. C. **Caracterização agrônômica, molecular e fitoquímica de *Eplingiella Harley & J.F.B. Pastore***. 2015. 125f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos Voláteis**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ªed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. Cap. 18, p. 467-495.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, v. 41, n. 2, p. 237 - 245, 1981.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136 - 141, 2012.

SIQUEIRA-LIMA, P. S.; ARAUJO, A. A. S.; LUCCHESI, A. M.; QUINTANS, J. S. S.; MENEZES, P. P.; ALVES, P. B.; LUCCA JUNIOR, W.; SANTOS, M. R. V.; BONJARDIM, L. R.; QUINTANS, J. L. J.  $\beta$ -Cyclodextrin complex containing *Lippia grata* leaf essential oil reduces orofacial nociception in mice – evidence of possible involvement of descending inhibitory pain modulation pathway. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, p. 188 - 196, 2014.

STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J. R.; RUIZ, C. A.; ARIAS, G.; DURAN, C.; SALGAR, W. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 93 -103, 2010.

TOMAZONI, E. Z. ; PANSERA, M. R. ; PAULETTI, G. F. ; MOURA, S. ; RIBEIRO, R. T.S. ; SCHWAMBACH, J. *In vitro* antifungal activity of four chemotypes of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils against *Alternaria solani* (Pleosporaceae) isolates. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 2, p. 999 - 1010, 2016.

TOZIN, L. R. S.; MARQUES, M. O. M.; RODRIGUES, T. M. Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia origanoides* Kunth. (Verbenaceae) in the Brazilian Cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 943 - 953, 2015.

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

VICUÑA, G. C.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, p. 343 - 349, 2010.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa tese procurou caracterizar os recursos genéticos de *Lippia origanoides* Kunth. Através de diferentes aspectos do germoplasma e também descrever os locais de ocorrência natural da espécie no Estado da Bahia, com o intuito de gerar informações que auxiliarão na conservação, melhoramento genético e cultivo da mesma. A ideia do estudo ecogeográfico (Cap. 1) surgiu após o levantamento dos locais que a espécie já havia sido encontrada, com a finalidade de estabelecer sítios para obtenção de germoplasma. Diante do elevado número de sítios levantados, sobreveio o questionamento se a espécie ocorreria em ambientes específicos ou se ela sobreviveria em condições ambientais variáveis. Por tratar-se de uma espécie aromática com alta variabilidade fitoquímica, indagações sobre possíveis variações na composição química dos óleos essenciais produzidos pelas diferentes populações e da relação entre ocorrência de quimiotipos e influência ambiental também foram levantadas.

As populações amostradas apresentaram óleos essenciais com composição química diversificada, sendo encontrados óleos essenciais pertencentes a quimiotipos já descritos para a espécie, como aqueles ricos em carvacrol e timol, e também óleos essenciais ricos em constituintes ainda não encontrados para a espécie, como cânfora, linalol, elemenol, acetato de linalol. O estudo demonstrou que *L. origanoides* ocorre em ambientes com características distintas, mas prioritariamente em áreas áridas e de solos ácidos. Apesar de sobreviver em ambientes com solos de níveis nutricionais distintos, a qualidade dos óleos essenciais da espécie parece sofrer influência dessas variáveis. Esses resultados confirmam a baixa exigência hídrica e nutricional da espécie, permitindo o delineamento de cultivos adequados, poupando o investimento em recursos desnecessários no cultivo da espécie. Além disso, incentivam o desenvolvimento de outras pesquisas sobre investigação fitoquímica em *L. origanoides* e de formas de adubação da espécie para produção de óleos com constituintes específicos.

Os capítulos 2 e 4, que trataram respectivamente da caracterização morfo-agronômica e fitoquímica dos acessos da coleção de germoplasma de *L. origanoides* da Universidade Estadual de Feira de Santana, foram de extrema importância por mostrar a diversidade genética da espécie que está conservada na coleção. A caracterização morfo-agronômica serve como base para pesquisas futuras que utilizarão esses acessos no melhoramento genético da espécie. Os genótipos JAG, TUC e SSE apresentaram os valores mais altos na produção de

óleo essencial, sendo potenciais genótipos para uso no melhoramento genético da espécie, visando o aumento da produção de óleo essencial. Os acessos JAG e TUC apresentam óleos essenciais ricos em carvacrol, enquanto o acesso SSE é rico em timol. A caracterização fitoquímica dos acessos é imprescindível em coleções de germoplasma de espécies aromáticas como *L. origanoides*, pois permite o uso direto dos produtos oriundos do germoplasma já devidamente caracterizado, como em testes de atividades biológicas com os óleos essenciais produzidos. Entre os 12 genótipos caracterizados foram identificados óleos essenciais ricos em carvacrol, timol, cânfora, E-cariofileno e cinamato de metila.

A caracterização fitoquímica também elucidou questionamentos acerca da estabilidade fitoquímica dos acessos cultivados em Feira de Santana. A maioria dos acessos cultivados apresentou óleo essencial com constituição química parecida com aquela obtida dos óleos essenciais oriundos de amostras das populações selvagens, indicando certa estabilidade. Apenas as populações QUI, SBR e JER apresentaram óleos essenciais com composição química diferente após o cultivo. Em ambiente natural, a população de QUI apresentou óleo essencial com o carvacrol como constituinte majoritário, seguido do constituinte cânfora, após o cultivo o óleo essencial teve como composto majoritário a cânfora. As amostras obtidas na expedição de coleta da população SBR apresentaram óleo essencial rico em linalol, posteriormente o cultivo, esse acesso apresentou o E-cariofileno como principal constituinte do óleo essencial. Por fim, a população natural de JER apresentou óleo essencial com o E-cariofileno como composto majoritário, e após o cultivo óleo essencial rico em cinamato de metila.

As plantas matrizes de alguns acessos obtidos nas coletas não sobreviveram nas condições ambientais de Feira de Santana, não sendo possível a entrada dessas amostras na coleção de germoplasma da espécie. Possivelmente, esse fato esteja relacionado com a diferença de altitude entre os lugares de origem das amostras e a altitude de Feira de Santana, visto que todas as mudas oriundas de locais de elevada altitude, principalmente na Chapada Diamantina, não sobreviveram. Outras formas de propagação devem ser testadas posteriormente, para que esses acessos possam ser incluídos na coleção de germoplasma e caracterizados devidamente.

O estudo da diversidade e estrutura genética em populações naturais de *L. origanoides* (Cap. 3), com a finalidade de quantificar a variação inter e intrapopulacional, mostrou que a espécie apresenta elevado índice de estruturação entre as populações. Esses resultados auxiliam diretamente na conservação de germoplasma da espécie, permitindo que seja traçado

um plano de obtenção de germoplasma adequado. Diante da elevada estruturação indica-se que sejam feitas coletas em populações pertencentes aos conjuntos gênicos diferentes, dessa forma a coleção de germoplasma representará ao máximo a diversidade da espécie. Apesar dos diferentes grupos formados indicando elevada estruturação genética, as populações localizadas na Chapada Diamantina registraram os maiores índices de diversidade, apontando que maiores esforços de coleta devem ser direcionadas nessa região.