

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA FLORESTAL

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Hesperozygis ringens*
(Benth.) Epling: VARIABILIDADE DO RENDIMENTO,
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carlos Garrido Pinheiro

Santa Maria, RS, Brasil

2014

ÓLEO ESSENCIAL DE *Hesperozygis ringens* (Benth.)
Epling: VARIABILIDADE DO RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO
QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Carlos Garrido Pinheiro

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Berta Maria Heinzmann

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pinheiro, Carlos Garrido
Óleo essencial de *hesperozygis ringens* (benth.)
epling: variabilidade do rendimento, composição química e
atividades biológicas / Carlos Garrido Pinheiro.-2014.
90 p.; 30cm

Orientadora: Berta Maria Heinzmann
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2014

1. Lamiaceae 2. Alelopatia 3. Sazonalidade 4.
Larvicida 5. Pulegona I. Heinzmann, Berta Maria II.
Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Carlos Garrido Pinheiro. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: carlosgp07@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling:
VARIABILIDADE DO RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

elaborada por
Carlos Garrido Pinheiro

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Berta Maria Heinzmann, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Francisco Maikon Corrêa de Barros, Dr (UFRGS)

Lia Rejane Silveira Reininger, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 25 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus, por guiar minha caminhada, ajudando-me a vencer com fé todos os obstáculos.

À minha família, em especial à minha mãe Maria de Fátima, meu pai Carlos e meus irmãos Diego, Douglas e Daniel pelo amor, compreensão, força e por serem a base de tudo.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fundamental apoio financeiro através da bolsa de estudos.

À orientadora Prof^a. Dr^a. Berta Maria Heinzmann, pela amizade, confiança e auxílio nos momentos necessários.

Ao professor Dr. Solon Jonas Longhi pela identificação da espécie estudada e pela co-orientação deste trabalho.

Ao professor Dr. Ervandil Correa Costa pela co-orientação deste trabalho e pela disponibilidade de materiais necessários para os experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Extrativos Vegetais (LABEVE), pela amizade e auxílio na realização das atividades da dissertação.

À banca examinadora, composta pela professora Dr^a Lia Rejane Silveira Reininger e pelo Dr. Francisco Maikon Corrêa de Barros, pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

Ao professor Dr. Sérgio Luiz de Oliveira Machado, ao Dr. Dane Araldi e ao funcionário da UFSM Fernando Saccol Gnocato, pela disponibilidade e importante auxílio no trabalho realizado com sementes.

A todos os amigos não mencionados aqui, que de alguma maneira contribuíram para a concretização desse trabalho.

MUITO OBRIGADO!

A persistência é o caminho do êxito.

(Charles Chaplin)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

ÓLEO ESSENCIAL DE *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: VARIABILIDADE DO RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

AUTOR: CARLOS GARRIDO PINHEIRO

ORIENTADORA: BERTA MARIA HEINZMANN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de fevereiro de 2014.

Pesquisas sobre produtos derivados de plantas visando à descoberta de extrativos úteis para diferentes fins são crescentes e, dentre estes, destacam-se os óleos essenciais (OE), tendo como uma de suas principais fontes a família Lamiaceae. Pertencente a ela, *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling é uma espécie nativa do bioma Pampa, conhecida popularmente por espanta-pulga. O presente trabalho teve como objetivos avaliar o potencial biológico do OE de suas folhas como alelopático e larvicida, bem como verificar as variabilidades sazonal e individual do rendimento e composição química desse óleo. O OE de quatro indivíduos foi obtido de folhas coletadas nas diferentes estações de um ano, determinando-se o rendimento do OE (% m/m) e as composições químicas das amostras. O OE foi extraído por hidrodestilação, em aparelho Clevenger e teve sua composição química analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC). O potencial alelopático do OE foi testado em sementes de Dicotiledôneas e Monocotiledôneas, classificadas como bioindicadoras [*Avena strigosa* Schreb. e *Lactuca sativa* L.], plantas daninhas [*Lolium multiflorum* Lam. e *Bidens pilosa* L.] e culturas [*Oryza sativa* L. e *Glycine max* (L.) Merr.], através da avaliação das seguintes variáveis: germinação, índice de velocidade de emergência e comprimentos das raízes, partes aéreas e total das plântulas. As concentrações testadas foram: 0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00%. O OE de *H. ringens* também teve sua atividade larvicida testada em larvas de Odonata, a fim de determinar sua concentração letal 50% (CL₅₀). Em relação aos testes alelopáticos sobre Dicotiledôneas, o OE com 82,02% de pulegona inibiu completamente a germinação de *B. pilosa* na concentração de 5,00%, sem afetar significativamente *L. sativa*, porém retardando a emergência e prejudicando os comprimentos de raiz e plântula de *G. max*. Em relação às monocotiledôneas, a mesma concentração prejudicou fortemente *L. multiflorum*, sem afetar a germinação de *O. sativa*, porém influenciando negativamente os demais parâmetros. Já o desenvolvimento das sementes de *A. strigosa* foi completamente inibido na concentração de 2,50%. O rendimento do OE demonstrou ser influenciado pela sazonalidade, sendo maior na primavera, verão e outono. O rendimento também apresentou variabilidade individual (1,15 a 4,38%), demonstrando ser mais elevado no indivíduo 4. Em relação à composição química, os OE obtidos de folhas coletadas no outono, primavera e verão apresentaram resultados semelhantes. A produção do constituinte majoritário (pulegona) e da classe predominante (monoterpenoides oxigenados) foram favorecidos na primavera, verão e outono. Estas estações demonstraram ser as mais favoráveis para extração de OE por apresentar concomitantemente maiores rendimentos e teores mais elevados de monoterpenoides oxigenados e de pulegona. Quanto à atividade larvicida, o OE contendo 95,18% de pulegona apresentou uma CL₅₀ de 69,05 µL L⁻¹ frente a larvas de Odonata.

Palavras-chaves: Lamiaceae. Alelopatia. Sazonalidade. Larvicida. Pulegona.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria

ESSENTIAL OIL OF *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: VARIABILITY OF YIELD, CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES

AUTHOR: CARLOS GARRIDO PINHEIRO

ADVISOR: BERTA MARIA HEINZMANN

Place and date: Santa Maria, February 25th, 2014.

Researches involving plant derived products aiming to discover extractives useful for different purposes have been growing, and among them, essential oils (EO) are noteworthy. One of the main sources of EO is the Lamiaceae family. Belonging to this family, *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling is a native species from the Pampa biome, popularly known as "espanta-pulga". This study aimed to evaluate the biological potential of EO from its leaves as allelopathic and larvicidal, as well as to check the seasonal and individual variability of yield and chemical composition of this oil. EO of four specimens were obtained from leaves collected in different seasons of a year and had their yield (% m/m) and chemical compositions determined. EO were extracted by hidrodestillation in Clevenger apparatus and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). The allelopathic potential of the EO was tested against seeds of Dicots and Monocots classified as bioindicators [*Avena strigosa* Schreb. and *Lactuca sativa* L.], weeds [*Lolium multiflorum* Lam and *Bidens pilosa* L.] and crops [*Oryza sativa* L. and *Glycine max* (L.) Merr.] by observing the following variables: germination, emergence velocity index, root length, shoot length and total length of seedlings. The tested concentrations were 0.25, 0.50, 1.00, 2.50 and 5.00%. The EO of *H. ringens* had also its larvicidal activity tested against larvae of Odonata in order to determine its 50% lethal concentration (LC₅₀). Regarding the allelopathic tests on Dicotyledons, EO with 82.02% of pulegone inhibited completely the germination of *B. pilosa* at 5.00%, without affecting significantly *L. sativa*, but slowing the emergence and damaging root lengths and seedlings of *G. max*. Regarding the monocots, the same concentration strongly impaired *L. multiflorum*, without affecting the germination of *O. sativa*, but it influenced negatively the other evaluated parameters. In addition, the development of the seeds of *A. strigosa* was completely inhibited at the concentration of 2.50%. The yield of EO proved to be influenced by seasonality, being higher in spring, summer, and autumn. The yield also showed individual variability (1.15 a 4.38%), proving to be higher in specimen 4. The chemical composition of EO obtained from leaves collected in autumn, spring, and summer showed similar results. The production of the major constituent (pulegone) and the predominant class (oxygenated monoterpenoids) were favored in spring, summer, and autumn. These seasons proved to be more indicated for the EO extraction, since they enabled concomitantly higher yields and higher contents of oxygenated monoterpenoids and pulegone. Regarding the larvicidal activity, EO containing 95.18% of pulegone showed a LC₅₀ of 69.05 $\mu\text{L L}^{-1}$ against the Odonata larvae.

Keywords: Lamiaceae. Allelopathy. Seasonality. Larvicidal. Pulegone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Indivíduo de *Hesperozygis ringens*, no município de São Francisco de Assis, RS. Foto obtida em 25/04/12 16
- Figura 2 – Local de coleta de *Hesperozygis ringens*, no município de São Francisco de Assis, RS. Foto obtida em 27/04/11..... 17

MANUSCRITO 2

- Figure 1 – Mean percentage of the major chemical classes of the constituents identified in the essential oils from the leaves of four specimens of *H. ringens* considering the different seasons 45
- Figure 2 – Representation of the variables (A) and samples (B) on the plans of principal components 1 and 2, considering the 25 major constituents of the 16 essential oil samples obtained from the fresh leaves of *Hesperozygis ringens* in different seasons. The ellipses highlight pulegone (c14) and the samples from autumn (AUT 1-4), spring (SPR 1-4) and summer (SUM 1-4) 48
- Figure 3 – Dendrogram generated by HCA of the chemical composition of 16 samples of essential oils obtained from the leaves of *Hesperozygis ringens*, highlighting groups A, B and C 49

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

- Table 1 – Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Hesperozygis ringens*28
- Table 2 – Germination (G), and emergence velocity index (EVI) of seeds, and root lengths (RL), shoot lengths (SL), and total lengths (TLS) of seedlings of *Bidens pilosa*, *Lactuca sativa*, *Glycine max*, *Lolium multiflorum*, *Avena strigosa* and *Oryza sativa* submitted to different concentrations (T) of EO of *Hesperozygis ringens*. WCT = water control; STC = solvent control29

MANUSCRITO 2

- Table 1 – Descriptive statistics of the yield on fresh weight basis and contents of oxygenated monoterpenoids (OM) and pulegone (P) of the essential oils obtained from the leaves of *Hesperozygis ringens* in four seasons of collection44
- Table 2 – Averages (%) of the yields on fresh weight basis, oxigenated monoterpenoids, and pulegone content of the essential oils from the leaves of four specimens of *Hesperozygis ringens* in distinct seasons45

RESULTADOS ADICIONAIS

- Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de folhas de *Hesperozygis ringens*62
- Tabela 2 – Atividade larvicida do óleo essencial de folhas de *Hesperozygis ringens* contra larvas de Coenagrionidae em tratamento de 19 horas ...62

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1 – Chemical composition of the essential oils from leaves of four specimens of <i>Hesperogyzis ringens</i> obtained in autumn	82
Apêndice 2 – Chemical composition of the essential oils from leaves of four specimens of <i>Hesperogyzis ringens</i> obtained in winter	83
Apêndice 3 – Chemical composition of the essential oils from leaves of four specimens of <i>Hesperogyzis ringens</i> obtained in spring	85
Apêndice 4 – Chemical composition of the essential oils from leaves of four specimens of <i>Hesperogyzis ringens</i> obtained in summer	87
Apêndice 5 – Análise de composição química e atividade larvicida do óleo essencial de <i>Hesperozygis ringens</i> (Benth.) sobre larvas de <i>Coenagrionidae</i> (Odonata), resumo apresentado na XIX Jornadas de Jovens Pesquisadores da Associação de Universidades Grupo Montevideú/AUGM – 2013.....	89

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
MANUSCRITOS CIENTÍFICOS	20
MANUSCRITO 1 – ESSENTIAL OIL OF THE BRAZILIAN NATIVE SPECIES <i>Hesperozygis ringens</i> : A POTENTIAL ALTERNATIVE TO CONTROL WEEDS	21
Abstract	21
1. Introduction.....	22
2. Materials and Methods	23
2.1. Plant Material	23
2.2. Essential oil extraction.....	23
2.3. Gas chromatograph analysis.....	23
2.4. Analysis of allelopathic activity	24
2.4.1 Germination bioassays	24
2.4.2 Experimental design and statistic analysis	25
3. Results.....	26
4. Discussion	30
5. Conclusion.....	33
6. Acknowledgment	34
7. References.....	34
MANUSCRITO 2 – SCENTS FROM BRAZILIAN PAMPA GRASSLAND: SEASONAL VARIABILITY OF THE ESSENTIAL OIL OF <i>Hesperozygis ringens</i> (Benth.) Epling.....	40
Abstract	40
1. Introduction.....	41
2. Methodology	42
2.1. Plant Material	42
2.2. Essential oil extraction.....	42
2.3. Chromatographic analysis	42
2.4. Statistical analysis	43
3. Results	44
4. Discussion	49
5. Acknowledgments	53

6. References.....	53
RESULTADOS ADICIONAIS – Análise de Composição Química e Atividade Larvicida do Óleo Essencial de <i>Hesperozygis Ringens</i> (Benth.) sobre Larvas de Coenagrionidae (Odonata).....	58
1. Introdução	58
2. Material e Métodos.....	59
2.1. Coleta do material vegetal.....	59
2.2. Extração do óleo essencial.....	60
2.3. Coleta das larvas de Coenagrionidae	60
2.4. Avaliação de atividade larvicida	60
2.5. Análise estatística	61
3. Resultados	61
DISCUSSÃO GERAL	63
CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÊNDICES.....	82

INTRODUÇÃO

O Brasil é um país rico em biodiversidade de ecossistemas e espécies, contudo, a utilização dos recursos de forma imprópria causa degradação dos mesmos (CANSIAN et al, 2010). Grande parte da flora brasileira nativa, ao longo dos anos, foi muito utilizada e em alguns casos, de forma desenfreada e predatória, seja visando exploração madeireira ou para abertura de áreas agrícolas e criação de gado. Apesar da vegetação nativa ainda ser vista em nosso país principalmente como fornecedora de madeira, existem também alternativas de produtos não madeireiros, muitas vezes provindos do metabolismo secundário das plantas, e que vem recebendo destaque crescente.

As espécies vegetais são capazes de produzir metabólitos não necessariamente relacionadas à manutenção da vida do organismo produtor (SANTOS, 2003). Este conjunto metabólico pode ser definido como metabolismo secundário, cujos produtos são capazes de proporcionar vantagens para a sobrevivência e para a perpetuação da espécie, podendo atuar em processos de polinização, contribuição para a resistência dos organismos contra pragas e patógenos e proteção contra herbívoros (BRAZ-FILHO, 2010; SANTOS, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2009). Os metabólitos secundários podem variar quantitativamente e qualitativamente, dependendo de fatores como espécie, local de ocorrência, sazonalidade, temperatura, entre outros (FERREIRA; AQUILA, 2000; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Dentre os produtos do metabolismo secundário mais promissores para pesquisas, estão os óleos essenciais (OE) (SOUZA, 2007). Os óleos essenciais podem ser definidos como produtos aromáticos obtidos de fontes botânicas, representados por misturas de aromas complexos (SCHWAB; DAVIDOVICH-RIKANATI; LEWINSOHN, 2008). Estes extrativos proporcionam vantagens ecológicas na defesa contra predadores e na atração de insetos e agentes polinizadores (SIANI et al., 2000; WOLFFENBÜTTEL, 2007). Os óleos podem ser encontrados em tricomas glandulares que se projetam da epiderme, podendo repelir predadores antes do ataque, graças a toxicidade dos seus componentes (TAIZ; ZEIGER, 2009). As principais características de um OE são o seu odor e a sua

volatilidade, sendo o olfato do ser humano um instrumento considerado importante para análise de amostras odoríferas (BELTRAME et al., 2010). Os OE são frequentemente utilizados em perfumaria e cosmetologia (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009), além do uso para aromatização de produtos de limpeza (VITTI; BRITO, 2003).

Pesquisas recentes sobre OE vêm ampliando o o número de relatos sobre atividades biológicas para o controle de pragas, visando diminuir o impacto ambiental e evitar riscos ao consumidor (PINTO JUNIOR et al., 2010). Os óleos essenciais podem ser aplicados de diversas maneiras, seja em testes alelopáticos (ANGELINI et al., 2003; SOUZA FILHO et al., 2009), acaricidas (CHAGAS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2010), inseticidas (BRITO; OLIVEIRA; BARTOLI, 2006; FAZOLIN et al, 2007), fungicidas (GONZÁLES-CHAVEZ et al., 2011), entre outros. Segundo Pinto Junior et al. (2010), dentre os problemas no controle de pragas, encontram-se a forma como os agentes químicos são utilizados e os possíveis resíduos remanescentes nos produtos consumíveis.

Dentre os fatores prejudiciais para culturas agrícolas estão as plantas daninhas. Estas plantas competem por fatores de crescimento das culturas, interferindo no desenvolvimento de espécies de interesse como a soja e o arroz, afetando o rendimento e a qualidade dos grãos das mesmas (ERASMO; PINHEIRO; COSTA, 2004; FLECK; CANDEMIL, 1995) Na busca por alternativas para o controle de plantas daninhas, produtos naturais são testados e, para detectar os possíveis efeitos alelopáticos, frequentemente utilizam-se sementes bioindicadoras, como a alface (BORGES et al., 2011).

É importante, entretanto, simultaneamente ao conhecimento da ação biológica, a identificação da composição de qualquer óleo essencial antes de sua utilização, pois na dependência da mistura específica de componentes, um determinado efeito pode ocorrer ou não. A composição química dos óleos essenciais é determinada principalmente pela genética da espécie produtora. Além desta, fatores externos podem influenciar a sua composição e propriedades. A influência de fatores como o método de extração, a parte da planta da qual será retirada a mistura de compostos, luz, temperatura, água, solo, altitude, métodos de secagem e congelamento de plantas devem ser investigados para a otimização de obtenção e utilização do OE (BELTRAME et al., 2010; DINIZ; ASTARITA; SANTARÉM, 2006; LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003). Para os OE serem utilizados pela indústria, é

necessário que ocorra, também, a avaliação e o aprimoramento dos métodos existentes de extração (JAKIEMIU, 2008).

O mercado de OE pode ser considerado rico para os países que dispõem de uma vasta biodiversidade e possuem condições de agregar valor às suas matérias-primas (JAKIEMIU, 2008). Contudo, apesar do potencial que possui, o Brasil ainda não se encontra entre os principais países produtores de OE. No nosso país, o setor produtor de OE ainda se mostra com pouca visibilidade, tendo um enorme universo a ser explorado, principalmente devido à falta de políticas nacionais de estímulo a sua produção (BIZZO, HOVELL, REZENDE, 2009; CASTELO, DEL MENEZZI, RESCK, 2010).

Famílias de espécies vegetais como Myrtaceae, Poaceae, Lauraceae, Rosaceae, Asteraceae e Lamiaceae destacam-se por suas propriedades aromáticas relacionadas aos óleos voláteis (SOUZA, 2007). Esta última família é ressaltada por apresentar espécies produtoras de OEs com diversos potenciais, como o alelopático, já descritos na literatura (ANGELINI et al., 2003; KEKEÇ et al., 2013; SOUZA FILHO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012).

Dentro de Lamiaceae destaca-se o gênero *Hesperozygis* Epling, que compreende seis espécies, cinco das quais estão limitadas às regiões sul e sudeste do Brasil e uma é restrita ao México (PEREIRA, PEREIRA, 1973; CANTINO, SANDERS, 1986 apud FRACARO, ECHEVERRIGARAY, 2006). Das espécies desse gênero que já tiveram seus OEs descritos na literatura, está *Hesperozygis myrtoides* Epling, um arbusto aromático que pode ser encontrado no estado de Minas Gerais crescendo a altitudes de 1800 m (MARTINS et al., 2011). Em análise da constituição do OE da espécie, os autores identificaram como principais compostos pulegona (44,4%), isomentona (32,7%) e limoneno (3,5%). Ainda pode ser constatado que o OE da espécie possui atividade antimicrobiana. Já *Hesperozygis marifolia* Epling pode ser encontrada em colinas próximas à região de Las Comadres, município de Guadalcazar, estado de San Luis Potosi, no México (GONZÁLES-CHAVEZ et al., 2011). Em estudos com a espécie, os mesmos autores, identificaram 14 diferentes compostos em seu OE, dentre eles (R)-pulegona (40,75%), isomentona (30,34%) e mentona (4,46%). Os autores ainda constataram alto potencial fungicida desse OE. Outra espécie do gênero é *Hesperozygis rhododon* Epling, um arbusto que pode ser encontrado em áreas rochosas no topo de montanhas, na formação da Serra do Mar, nos estados do Paraná e São Paulo (VON POSER et al 1996). Os mesmos

autores analisaram a composição do OE da espécie e identificaram como principais compostos mentona (43,4%) e pulegona (29,6%).

A espécie objeto do presente estudo, *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling (Figura 1), também é conhecida popularmente como “espanta-pulga”, sendo muito utilizada como inseticida, por possuir, na composição do seu OE, a pulegona, que pode ser encontrada em altas concentrações (FRACARO, 2006). A espécie teve suas características botânicas descritas por Fracaro e Echeverrigaray (2006):

Hesperozygis ringens BENTH. é uma das espécies sul americanas, sendo descrita como um arbusto lenhoso, 20 a 50 cm de altura, com caule bastante ramificado, sendo as folhas ovado rombóides (2 a 5 cm de comprimento e 1,5 a 2,5 cm de largura), pecioladas, glabras, com bordos apenas dentados na metade terminal e repletas de glândulas sésseis afundadas em ambas as faces. As flores encontram-se reunidas em espigas terminais. O cálice de coloração verde apresenta-se recoberto interna e externamente por pelos curtos. A corola é de coloração alva a violácea, com tubo de 0,7 a 1,0 cm, internamente glabra, lábio superior de 1,3 a 1,5 cm e inferior trilobado, 1,2 a 1,6 cm, ambos com pilosidade na face externa. O lábio inferior apresenta manchas violáceas na sua região mediana. O androceu caracteriza-se pela presença de dois filetes simples sinantéricos.



Figura 1 – Indivíduo de *Hesperozygis ringens*, no município de São Francisco de Assis, RS. Foto obtida em 25/04/12.

Fonte: o autor.

Estudos realizados por Ribeiro et al. (2010), indicaram que o OE da espécie *H. ringens* apresenta potencial larvicida e afeta a produção de ovos de parasitas

bovinos, como a espécie de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Durante análise da composição química do OE da espécie, os mesmos autores, encontraram como composto majoritário a pulegona (86%) e detectaram que o óleo possui atividade acaricida, afetando fêmeas e larvas do parasita.

Segundo von Poser et al. (1996), durante análises da composição do OE da espécie, a pulegona apresentou-se como constituinte majoritário, representando 79,2% do óleo. Através de testes realizados pelos mesmos autores com sementes de alface, o óleo de *H. ringens* apresentou ação alelopática. O OE da espécie contendo 96,63% de pulegona também demonstrou efeito anestésico quando testado em jundiás (*Rhamdia quelen*) (SILVA et al., 2013).

No sul do Brasil, *H. ringens* é comumente encontrada em campos rupestres. Segundo Lindman e Ferri (1974), a denominação “campos”, pode ser dada a áreas que não possuem mata, independente do terreno e da vegetação, podendo abranger territórios com diversas fisionomias. Um dos locais de crescimento de *H. ringens* é o município de São Francisco de Assis, que pertence à região da Campanha do Sudoeste (Figura 2).



Figura 2 – Local de coleta de *Hesperozygis ringens*, no município de São Francisco de Assis, RS. Foto obtida em 27/04/11.

Fonte: o autor.

A Campanha do Sudoeste abrange uma série de municípios do Rio Grande do Sul como Livramento, Uruguaiana, Quaraí, Alegrete, Rosário e São Gabriel, bem como parte de São Francisco de Assis, Bagé, Dom Pedrito, Lavras, Santa Maria, São Pedro, São Vicente e Itaqui (RAMBO, 1994). Dentre as formações existentes que compõem a vegetação da campanha, destaca-se a predominância do campo gramináceo (RAMBO, 1994). Algumas espécies nativas da campanha se destacam pelo odor das partes verdes, proporcionado pela presença de OE. Nesta região, os óleos produzidos pelas plantas parecem ter a finalidade de repelir os animais herbívoros e, segundo Rambo (1994), isto acontece em grande parte dos casos. Outra hipótese levantada é que estes óleos teriam a função de reduzir a temperatura da face adaxial da lâmina foliar, o que, por sua vez diminuiria a transpiração, uma vez que, os óleos se evaporam mais rapidamente que a água (RAMBO, 1994).

H. ringens é uma espécie arbustiva lenhosa de ocorrência em campos que integram o bioma Pampa. Uma das principais ameaças para as espécies nativas do Bioma Pampa são os núcleos de arenização, que ocorrem em áreas onde a cobertura vegetal foi removida devido a ações erosivas (ROVEDDER, 2007). Segundo Suertegaray (1998, apud ROVEDDER, 2007) a formação de areais pode ocorrer, principalmente, nos municípios de Alegrete, São Francisco de Assis, Itaqui, Cacequi, Manuel Viana e Quaraí. De acordo com Moreno (1961), o clima da região Sudoeste do estado do Rio Grande do Sul, pode ser classificado como CFa (Clima Subtropical ou Virginiano) e possui como principais características a temperatura do mês mais quente superior a 22°C e a temperatura do mês mais frio oscilando entre -3° e 18 °C.

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o potencial biológico e a variabilidade na produção do OE de *H. ringens*. Como objetivos específicos, este trabalho teve como alvo o estudo da variabilidade sazonal e individual do OE de *H. ringens*, bem como a avaliação do potencial alelopático e larvicida do OE em questão.

A presente dissertação está organizada na forma de dois manuscritos científicos e um item que aborda resultados adicionais. O tópico Resultados Adicionais apresenta dados referentes ao efeito do OE de *H. ringens* sobre larvas de Odonata, com determinação da CL₅₀. O Manuscrito Científico 1 descreve a análise da composição química do OE de *H. ringens* e seu potencial alelopático frente a três espécies monocotiledôneas (*Lolium multiflorum* Lam., *Avena strigosa* Schreb. e

Oryza sativa L.) e três espécies dicotiledôneas (*Bidens pilosa* L., *Lactuca sativa* L. e *Glycine max* (L.) Merr.). O Manuscrito Científico 2 analisa a influência sazonal no rendimento e na composição química do OE de folhas frescas de quatro indivíduos de *H. ringens*. Estão contidos nos referidos manuscritos: Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências utilizadas. Os resultados adicionais são apresentados na sequência. Estes contém introdução, a metodologia utilizada, bem como ação do OE de *H. ringens* frente a larvas de Odonata, juntamente com a descrição da composição química do óleo utilizado no estudo.

Na Discussão Geral, visou-se a realização de uma interpretação de resultados obtidos, correlacionando com resultados da literatura, buscando instigar novos estudos. Esta dissertação é finalizada com Conclusões, Referências Bibliográficas e Apêncides.

MANUSCRITOS CIENTÍFICOS

Manuscrito 1

PINHEIRO, C.G.; AMARAL, L.P.; ROLIM, J.M.; LONGHI, S.J.; MACHADO, S.L.O.; HEINZMANN, B.M. Essential Oil Of The Brazilian Native Species *Hesperozygis ringens*: A Potential Alternative To Control Weeds.

ESSENTIAL OIL OF THE BRAZILIAN NATIVE SPECIES *Hesperozygis ringens*: A POTENTIAL ALTERNATIVE TO CONTROL WEEDS

ABSTRACT

This study evaluated the allelopathic effect of the essential oil (EO) of *Hesperozygis ringens* using seeds of monocotyledonous and dicotyledonous, classified as bioindicators [*Avena strigosa* Schredb. and *Lactuca sativa* L.], weeds [*Lolium multiflorum* Lam. and *Bidens pilosa* L.] and crops [*Oryza sativa* L. and *Glycine max* (L.) Merr.]. The EO of fresh leaves was extracted in triplicate by hidrodistillation for a period of 2 h, and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). The EO was diluted in ethanol, Tween 20 and water and was tested at the concentrations of 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00%. Water and the highest concentration of the solvents used for dilution of the EO were used as controls. The seeds were sterilized with 70% ethanol and 6% calcium hypochlorite before treatments, and then they were immersed in the EO solutions for two minutes (125 seeds per treatment), transferred to petri dishes lined with filter paper moistened with 2 ml water, and stored in BOD germination chamber with temperature and photoperiod adjusted to each target species. The analyzed variables were germination, emergence velocity index, roots and shoot lengths, and total length of seedlings. Pulegone was the major compound of the EO, representing 82.02% of the total composition. Considering dicot seeds, the highest concentration of the EO inhibited completely the germination of *B. pilosa* without affecting the germination of *L. sativa* and *G. max*. On monocot seeds, the highest concentration of the EO affected the germination of *L. multiflorum* and *A. strigosa*, without affecting the germination of *O. sativa*. The results indicate that the weeds were more affected by the oil than the crops, indicating the potential of the EO of *H. ringens* to control weeds.

Keywords: Lamiaceae; chemical composition; allelopathy; dicots; monocots.

1 INTRODUCTION

Weeds are the main problem of the agriculture crops, causing an annual loss of million dollars around the world (FAO, 2009), and synthetic herbicides are often used to control weeds and undesirable plants. Although these products contribute to increased crop productivity, they also represent a long-term danger to the environment and animals due to its persistence in nature. Additionally, the constant use of synthetic herbicides resulted in plant evolution aiming adaptation by the selection of genetic traits conferring resistance (BUSI et al., 2013; EL-WAKEIL, 2013). The selection of these resistant biotypes (GELMINI et al., 2001) and the search for organic farming (RIGBY; CÁCERES, 2001) has led to growing interest on alternative methods to control weeds. In this context, herbicides based on natural products as essential oils have been highlighted (EL-WAKEIL, 2013). These natural products can be composed by allelochemicals with a large range of activities. They have distinct target sites when compared to traditional herbicides, and can be an alternative to control resistant weeds (MACÍAS et al., 2001).

Many species of Lamiaceae have showed allelopathic potential, and studies involving the evaluation of this effect suggest prospects for future applications (ANGELINI et al., 2003; KEKEÇ et al., 2013; SOUZA FILHO et al., 2009). Classified in this family, *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling is a woody herb, native in rocky fields of southeastern Rio Grande do Sul, southern Brazil. Its leaves produce high amounts of essential oil (EO), containing pulegone as major compound (RIBEIRO et al., 2010; VON POSER et al., 1996), which is a component of some EO that present allelopathic activity (ALONSO-AMELOT et al., 2006; NAJAR et al., 2013). Von Poser et al. (1996) observed the dominance of *H. ringens* in the sites where it occurs, and described the allelopathic effect of its EO on seeds of *Lactuca sativa* L., which is considered a bioindicator species for studies of inhibitory allelopathic activity on dicotyledonous seeds (SANDERSON et al., 2013). However, to correctly assess the prospects of application of EO in the control of weeds, besides testing their inhibitory activity on seeds of bioindicator plants, it is necessary to expand the range of target species. Thus the aim of this work was to evaluate the allelopathic effect of the EO of *Hesperozygis ringens* against seeds of species classified in mono- and dicotyledonous, and considered as undesirable species, bioindicators and crops. The

monocots chosen were *Lolium multiflorum*, *Avena strigosa* and *Oryza sativa*, whereas *Bidens pilosa*, *Lactuca sativa* and *Glycine max* were the dicots selected.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant Material

Leaves of *Hesperozygis ringens* were collected in São Francisco de Assis (S 29° 35' 43, 1"; W 055° 07' 33, 4"), Rio Grande do Sul, Brazil, in April 2012.

2.2 Essential oil extraction

Fresh leaves of *H. ringens* were extracted in triplicate by hidrodestillation using a Clevenger-type apparatus for 2 hours (KOC et al., 2013). After the extraction, the EO was transferred to a graduated cylinder for volume determination and stored in a freezer until analysis of chemical composition and biological tests.

2.3 Gas chromatograph analysis

An aliquot of 2 μL of essential oil was diluted into 1 mL of hexane and analyzed by an Agilent 6890 gas chromatograph coupled to an Agilent 5973 mass selective detector (GC/MS). The analysis was carried out on a HP5-MS capillary column (Hewlett Packard, 5% fenilmetilsiloxane, 30 m x 0.25 mm, film thickness: 0.25 μm) at 70 eV; Analysis conditions: split inlet 1:100; temperature program: 40°C for 4 min; 40 to 320 °C at 4 °C min^{-1} ; He as gas carrier; flow rate 1 mL min^{-1} ; injector and detector temperatures: 250 °C. The EO components were identified by comparison of their retention indices, determined by using a calibration curve of n-alkanes injected at the

same chromatographic conditions of the samples, and mass fragmentation patterns with literature data (ADAMS, 2009; NIST, 2010). The components of the EO were quantified by gas chromatography with flame ionization detection (GC/FID) on an Agilent 7890A. The analysis parameters were the same as described for GC/MS analysis, with injection in splitless mode, and injector and detector temperatures set at 300 °C.

2.4 Analysis of allelopathic activity

2.4.1 Germination bioassays

The EO of *H. ringens* was applied on seeds of monocotyledonous and dicotyledonous species. The seeds of monocots chosen as targets were oat (*Avena strigosa* Schreb., bioindicator), ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam., weeds) and rice (*Oryza sativa* L., crop). From the group of dicots, the selected as target seeds were lettuce (*Lactuca sativa* L., bioindicator), hairy beggar tick (*Bidens pilosa* L., undesirable species) and soya (*Glycine max* (L.) Merr., crop). The seeds of *Avena strigosa*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Lolium multiflorum* and *Lactuca sativa* were obtained from commercial lots, whereas the seeds of *Bidens pilosa* were collected in Boca do Monte, Santa Maria, RS, Brazil in January 2013.

The EO was tested at concentrations of 0.25, 0.50, 1.00, 2.50 and 5.00%. For the solutions 0.1% of Tween 20 and 0.9% of ethanol were firstly added to the EO, following by the appropriate volume of water. Among the treatments, a water control (WCT) and a solvent control (SCT) containing just the diluents (ethanol, Tween 20 and water) were also included. Before application of the treatments, the seeds were sterilized with 70% ethanol for 2 minutes, followed by 6% calcium hypochlorite for 5 minutes, according to methodology adapted from Rickli et al. (2011) and Martinazzo-Portz and Müller (2009). Before sterilization the seeds of *B. pilosa* were subjected to mechanical scarification, by rubbing up on an abrasive pad, aiming to break the seed coat, and allowing hydration of the embryo in less time (ADEGAS; VOLL; PRETE, 2003). For each treatment 125 seeds of the target species were immersed in the

solutions for 2 minutes, and afterwards the seeds were transferred to five petri dishes (9 cm of diameter) lined with filter paper and dampened with 2 mL of water. The seeds were stored in a BOD germinating chamber, with adjusted temperature and photoperiod for each target species. The seeds of *A. strigosa* were incubated at 20°C (± 2) in the light (24h) (SARTOR et al., 2009). The seeds of *B. pilosa*, *L. sativa*, *G. max*, *O. sativa* and *L. multiflorum* were incubated at 25°C (± 2) in the light/ dark (12/12 h) (BRASIL, 2009; FORTES et al., 2009; MAGIERO et al., 2009).

The germination was evaluated daily and the number of days of the experiment depended on the species behavior, and were considered closed when the seedlings growth begun to be affected by the petri dish space. The seeds with issued roots or shoots greater than 2 mm were considered germinated. The tests with the seeds of *B. pilosa*, *L. sativa*, *G. max*, *A. strigosa*, *O. sativa* and *L. multiflorum* ended at the ninth, eighth, seventh, ninth, seventh and eighth day, respectively. In the last day the lengths of roots and shoots of each plant were measured keeping the repeat controls. The Emergence Velocity Index (EVI) was calculated for each species considering the number of plants emerged in the tests using the formula proposed by Maguire (1962) (OLIVEIRA; SADER; ZAMPIERI, 1984): $EVI = N1/D1 + N2/D2 + N3/D3 + \dots + NL/DL$, where: N1; N2; NL= number of emerged plants in the first count, second count, last count; and D1; D2; DL= number of days from the sowing until the first count, second count, last count.

2.4.2 Experimental design and statistic analysis

Data are presented as mean (n= 5). Kolmogorov-Smirnov and Bartlett tests were used to check the normality and homogeneity of variances. To determine the differences between treatments, the significances were evaluated by one way ANOVA followed by Tukey test, considering the completely randomized design (CRD). Kruskal-Wallis and Mann Whitney non-parametric tests were applied when appropriate. The analyses were performed using the software ASSISTAT 7.6.

3 RESULTS

A total of 94.96% of the chemical composition of the EO from the leaves of *H. ringens* was identified (Table 1), and from the 27 identified constituents, the oxygenated monoterpene pulegone stands out as major compound (82.01%). The remaining identified components occurred in small percentages, below 2%, and among them other oxygenated monoterpenoids with structure related to pulegone were observed, as isopulegol (1.22%) and isopulegone (1.60%). Additionally, constituents classified as monoterpene hydrocarbons like limonene (1.82%) and β -E-cimene (1.84%) also occurred.

The EO of *H. ringens* affected all variables evaluated for the seeds of *Bidens pilosa* (Table 2). For the germination test, the statistical analysis indicated no differences among the controls (WCT and SCT) and the two lower concentrations of EO (0.25 and 0.5%) showing means ranging between 93.6 and 96.8%. However at 1.00 and 2.50% EO, germination was equally affected, presenting values of 80.8 and 81.6%, whereas the higher EO concentration (5.00%) inhibited completely the germination of *B. pilosa*. For the emergence velocity index of *B. pilosa*, table 2 showed the highest values for WCT and SCT (4.87 and 5.45, respectively), which demonstrated statistical difference from the higher EO concentrations (1.00, 2.50 and 5.00%). In the evaluation of the roots length of *B. pilosa*, only the treatment composed by the higher EO concentration (5.00%) was statistically different from the other ones with no roots to measure (Table 2). On the evaluation of the shoot lengths of *B. pilosa* the controls showed statistical differences from the EO concentrations higher than 0.5% (Table 2). For the total length of seedlings of *B. pilosa*, the controls WCT and SCT showed significant differences from the two highest EO concentrations (2.50 and 5.00%). For the seeds of *Lactuca sativa*, germination, emergence velocity index, roots length, and total length of seedlings were not affected by the different treatments, and no statistical differences among the treatments could be detected (Table 2).

For *Glycine max*, germination and the shoot lengths were not affected by the EO, and no statistical differences among treatments were detected (Table 2). For the emergence velocity index, the EO at 0.50% presented the higher value (8.66) but

was statistically equivalent to WCT, SCT and EO at 0.25, 1.00 and 2.50%. However, the EO at 5.00% showed the smaller emergence velocity index (7.33) and was statistically different only from the EO at 0.50%. Both controls, WCT and SCT, presented the greatest value for roots length (3.01 cm), showing no significant difference from the EO at 0.25, 0.50 and 1.00% (Table 2). On the other hand, the two highest EO concentrations (2.50 and 5.00%) were statistical lower than the other treatments (Table 2). For the total lengths of seedlings WCT, SCT and the EO at 0.25, 0.50 and 1.00% showed no statistical difference, but they were statistically higher than the EO at 5.00% (Table 2). The seeds of *Lolium multiflorum* were only affected by the highest concentration of EO tested (5.00%) (Table 2). For all parameters evaluated, both controls WCT and SCT, and the EO at concentrations of 0.25, 0.50, 1.00, and 2.50% showed no statistical differences.

The seeds of *Avena strigosa* were strongly affected by the EO of *H. ringens*, especially by the two higher concentrations (2.50 and 5.00%), which inhibited completely the germination (Table 2). For this variable the controls WCT and SCT, as well as the EO at 0.25% were significantly higher than the EO at 0.50, 1.00, 2.50 and 5.00% (Table 2). Similar to germination, the values of emergence velocity index for *A. strigosa* showed that WCT, SCT and the EO at 0.25% were statistically equivalent among them and higher than the EO at 0.50, 1.00, 2.50 and 5.00% (Table 2). In the evaluation of the root lengths of *A. strigosa*, the two controls (WCT and SCT) presented results of 2.44 and 2.35 cm, and no significant difference among them but they were statistically higher than the EO at 0.50, 2.50 and 5.00% (Table 2). By the evaluation of the shoot lengths for this species, WCT and SCT presented similar means of 4.47 and 4.04 cm, demonstrating to be statistically different from all EO concentrations (Table 2). For the total lengths of seedlings of *A. strigosa*, the results for WCT and SCT presented similar means (6.90 and 6.39 cm, respectively) being significantly higher than all EO concentrations (Table 2).

In the evaluation of the effect of the EO on the seeds of *Oryza sativa*, the highest concentration tested affected most parameters observed (Table 2). No significant differences could be detected on germination among the distinct treatments. The results for root length and total length of seedlings showed also no statistical differences among the two controls and the EO at 0.25, 0.50, 1.00 and 2.50%. However the EO at 5.00% affected significantly both variables (Table 2). Observing the values obtained for emergence velocity index, no statistical

differences were detected among both controls but they were significantly different from the EO at 5.00% (Table 2). In the evaluation of the shoot lengths of *O. sativa*, both controls did not differ. Additionally, WCT and the EO at 0.25, 0.50, 1.00 and 2.50% showed no statistical differences among them. However, the highest concentration of EO (5.00%) presented the lowest value of shoot lengths, which was statistically lower from all other treatments (Table 2).

Table 1 – Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Hesperozygis ringens*.

RI ^a experimental	RI literature ^{b,c}	Compound	Percent composition	Class
843	-	NI	0.29	-
932	930	α -Pinene	0.33	MH ^c
947	953	Camphene	0.21	MH
972	968	β -Pinene	0.23	MH
975	976	1-Octen-3-ol	0.34	HH ^d
990	988	β -Myrcene	0.21	MH
1028	1022	Limonene	1.83	MH
1030	1030	Eucalyptol	0.25	MH
1048	1035	β -E-ocimene	0.79	MH
1051	1047	β -Z-ocimene	1.84	MH
1112	1106	Octen-1-ol acetate	0.14	OM ^e
1117	1113	<i>p</i> -Mentha-1.3.8-triene	0.15	MH
1166	1165	Isopulegol	1.22	OM
1178	1177	Isopulegone	1.61	OM
1110	1197	α -Terpineol	0.31	OM
1216	1207	Verbenone	0.41	OM
1221	-	NI	0.75	-
1256	1244	Pulegone	82.02	OM
1268	-	NI	0.12	-
1288	-	NI	0.70	-
1293	-	NI	1.31	-
1340	1344	δ - Elemene	0.21	SH ^f
1344	1343	Eucarvone	0.16	OM
1350	1351	α -Terpineol acetate	0.25	SH
1353	-	NI	0.21	-
1369	-	NI	0.12	-
1389	-	NI	0.30	-
1391	1394	Phenyl ethyl isobutanoate	0.11	PH ^g
1408	-	NI	1.07	-

Table 1, cont.

1424	1418	β -Caryophyllene	0.87	SH
1430	1438	α -Caryophyllene	0.17	SH
1433	-	NI	0.17	-
1481	1477	Germacrene D	0.13	SH
1498	1492	Elixene	0.32	SH
1500	1500	Bicyclogermacrene	0.26	SH
1583	1578	Spathulenol	0.26	OS ^h
1589	1581	Caryophyllene oxide	0.39	OS
Identified compounds			96.12	

^a RI=Retention index; ^bAdams, 2009; ^cNIST, 2010; ^dMH= Monoterpene hydrocarbon; ^eHH= Hydroxilated hydrocarbon; ^fOM= Oxygenated monoterpenoid; ^gSH= Sesquiterpene hydrocarbon; ^hPH=Phenylpropanoid; ⁱOS= Oxygenated sesquiterpenoid.

Table 2 – Germination (G), and emergence velocity index (EVI) of seeds, and root lengths (RL), shoot lengths (SL), and total lengths (TLS) of seedlings of *Bidens pilosa*, *Lactuca sativa*, *Glycine max*, *Lolium multiflorum*, *Avena strigosa* and *Oryza sativa* submitted to different concentrations (T) of EO of *Hesperozygis ringens*. WCT = water control; STC = solvent control.

Group	Species	T(%)	G(%)	EVI	RL (cm)	SL (cm)	TLS (cm)
Dicots	<i>B. pilosa</i>	WCT	94.4 a **	4.87 ab **	2.20 a *	2.16 a **	4.37 a**
		SCT	93.6 a	5.45 a	2.08 a	2.06 ab	4.14 a
		0.25	96.0 a	4.49 bc	1.97 a	1.98 abc	3.95 a
		0.50	96.8 a	4.67 b	2.29 a	1.82 c	4.12 a
		1.00	80.8 b	3.49 cd	2.08 a	1.74 c	3.82 ab
		2.50	81.6 b	2.82 d	1.68 a	1.14 d	2.82 b
		5.00	0.0 c	0.0 e	0.0 b	0.0 e	0.0 c
		Mean		77.6	3.68	1.56	1.76
	CV(%)		43.4	49.73	47.69	47.15	46.08
	<i>L. sativa</i>	WCT	97.6 **	10.38 **	2.49 **	0.69 b *	3.18 **
		SCT	94.4	10.64	2.83	0.87 ab	3.70
		0.25	98.4	11.15	3.48	1.05 a	4.53
		0.50	99.2	12.04	3.10	0.79 ab	3.89
		1.00	97.6	11.41	3.39	0.82 ab	4.21
		2.50	100.0	9.82	2.61	0.80 ab	3.41
		5.00	97.6	10.09	2.88	0.82 ab	3.70
		Mean		97.8	10.79	2.97	0.83
	CV(%)		3.2	11.77	22.17	19.06	20.39
	<i>G. max</i>	WCT	96.8 **	8.44 ab *	3.01 a *	2.98 **	6.01 ab**
		SCT	92.8	8.41 ab	3.01 a	2.34	7.58 a
		0.25	95.2	8.47 ab	1.69 a	3.00	6.91 ab
		0.50	97.6	8.66 a	1.75 a	3.01	6.99 ab
		1.00	98.4	8.37 ab	2.47 a	2.04	6.74 ab
		2.50	94.4	7.98 ab	0.83 b	2.77	5.82 b
5.00		94.4	7.33 b	0.20 b	1.87	3.97 c	
Mean			95.7	8.24	1.85	2.58	6.29
CV(%)		5.67	8.49	68.72	39.01	21.78	

Table 2, cont.

Monocots	<i>L. multiflorum</i>	WCT	74.4 a **	5.34 a **	4.49 a *	3.90 a *	8.39 a *
		SCT	76.8 a	5.32 a	3.82 ab	3.67 ab	7.50 ab
		0.25	74.4 a	5.08 a	3.36 ab	3.66 ab	8.01 ab
		0.50	65.6 ab	4.27 a	4.32 ab	3.72 ab	8.05 a
		1.00	76.0 a	4.58 a	3.87 ab	3.40 ab	7.27 ab
		2.50	72.0 ab	4.22 a	3.38 ab	3.49 ab	6.87 ab
		5.00	53.6 b	2.75 b	2.75 b	3.06 b	5.62 b
		Mean	70.4	4.51	3.86	3.56	7.39
	CV(%)	16.8	23.06	24.75	11.71	18.81	
	<i>A. strigosa</i>	WCT	50.4 a **	2.98 a **	2.44 a **	4.47 a **	6.90 a **
		SCT	64.0 a	3.67 a	2.35 ab	4.04 a	6.39 a
		0.25	54.4 a	2.16 a	1.58 b	2.37 b	3.94 b
		0.50	20.8 b	0.77 b	0.96 c	0.84 c	1.81 b
		1.00	16.0 b	0.69 b	1.06 bc	1.64 bc	2.70 b
		2.50	0.0 c	0.0 c	0.0 d	0.0 d	0.0 c
5.00		0.0 c	0.0 c	0.0 d	0.0 d	0.0 c	
Mean		29.03	1.47	1.91	1.19	3.11	
CV(%)	100.33	118.37	105.04	89.23	97.91		
<i>O. sativa</i>	WCT	91.2 **	9.69 a *	3.09 a *	3.64 ab *	6.67 a *	
	SCT	92.8	8.92 ab	2.69 a	3.98 a	6.67 a	
	0.25	86.4	8.59 b	2.24 a	3.88 ab	6.12 a	
	0.50	91.2	8.57 ab	3.03 a	3.22 b	6.25 a	
	1.00	93.6	9.10 ab	2.71 a	3.49 b	6.20 a	
	2.50	93.6	9.24 a	2.83 a	3.66 ab	6.49 a	
	5.00	55.2	3.45 c	0.92 b	0.46 c	1.38 b	
	Mean	86.3	8.18	2.50	3.19	5.69	
CV(%)	97.9	27.99	43.50	44.20	33.21		

Data are presented as mean (n= 5). * Means followed by different lowercase letters in columns indicate statistical differences (P<0.05); **Means followed by different lowercase letters in columns indicate statistical differences (P< 0.01).

4 DISCUSSION

According to literature reports the percentage of the monoterpenoid pulegone in the EO of *H. ringens* can range between 79.2- 96.63% (RIBEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2013; VON POSER et al., 1996). Some studies indicate that pulegone presents important bioactivities like acaricide (RIBEIRO et al., 2010) and insecticide (ROSSI; CANAVOSO; PALACIOS, 2012). Other monoterpenoids as thymol, carvacrol, α -pinene and 1,8-cineole were already found as main compounds in EO of Lamiaceae species with allelopathic effects (ANGELINI et al., 2003; MARCO et al., 2012) and also pulegone was already found as the main compound of EO with allelopathic activity (ALONSO-AMELOT et al., 2006). This compound presented toxic

effect on roots and mitochondrial respiration of *Cucumis sativa* L. (MUCCIARELLI et al., 2001). There are some studies with species of Lamiaceae described in literature indicating that it has a great potential to generate natural products with allelopathic effects (ARGYROPOULOS; ELEFTHEROHORINOS; VOKOU, 2008; GITSOPOULOS; CHATZOPOULOU; GEORGOULAS, 2013; KATO-NOGUCHI et al., 2013).

The highest concentration (5.00%) of the EO of *H. ringens* inhibited completely the germination of seeds of *B. pilosa*. Furthermore the second highest concentration (2.50%) also influenced negatively the main variables considered in this study, as germination, emergency velocity index, lengths of shoot lengths and total lengths of seedlings, indicating the allelopathic effect of the EO against this weed of crops and fields. Seeds of *B. pilosa* have been used in other studies about allelopathic effects of EO and already showed susceptibility to EO of some Lamiaceae species (ALONSO-AMELOT, 2006; BATISH et al., 2012). In the search for natural products with allelopathic effects, extractives obtained from species belonging to other families have also been tested on seeds of *B. pilosa*, as hydroalcoholic and aqueous extracts furnished promising results (CORSATO et al., 2010; CRUZ et al., 2002).

The seeds *L. multiflorum* were significantly affected by the highest EO concentration (5.00%) on all evaluated variables, indicating that the EO of *H. ringens* interferes in the germination and growth of this weed of some crops. *L. multiflorum* has been considered a weed plant and was used as target to test the allelopathic potential of aqueous extracts of *Avena sativa* L. and *A. strigosa* (HAGEMANN et al., 2010), affecting the development of these species. Among the Lamiaceae, the aqueous methanolic extracts of *Hyptis suaveolens* Poit showed allelopathic effect against *L. multiflorum* (MOMINUL ISLAM; KATO-NOGUCHI, 2013).

Although the seeds of the dicotyledonous bioindicator *L. sativa* had already been used in a study on the allelopathic activity of the EO of *H. ringens*, this species was included in our work since the methodology used by our group is distinct from the previously described by von Poser et al. (1996), which reported the inhibition of germination of the species by the EO containing 79.2% of pulegone. However, in the present work the seeds of *L. sativa* proving to be resistant to the EO of *H. ringens* at the tested concentrations. The use of distinct methodologies can explain the different results obtained in both studies (WIBE, 2004). Another factor that may be considered are the differences between cultivars, since the literature reports distinct results when

different cultivars of the same species were tested (GERALDO et al., 2000).

According to literature reports, there are many methods to evaluate the allelopathic effect of a product. Criteria as germination, velocity of emergency index, lengths of roots and shoots, and seedling growth are variables commonly used in these works (ALVES et al., 2004; HU; ZHANG; HU, 2013; MARCO et al., 2012; MOMINUL ISLAM; KATO-NOGUCHI, 2013). In the present study we choose to evaluate the allelopathic effects based on five variables frequently found in the literature, in order to get greater certainty in the obtained results.

The monocotyledonous bioindicator *A. strigosa* showed to be more susceptible to the EO of *H. ringens* than the dicotyledonous bioindicator. The two highest concentrations of the EO evaluated (2.50 and 5.00%) inhibited completely the germination of the seeds, suggesting that monocots in general may be susceptible to the EO of *H. ringens*. *A. strigosa* was already used as a target to test the allelopathic effect of natural products (SARTOR et al., 2009).

The seeds of *Glicine max* were less affected by the EO of *H. ringens*, but presented a higher susceptibility when compared to the dicotyledonous bioindicator *L. sativa*. The velocity of emergency and the evaluated lengths tends to be affected by the highest concentration of the EO (5.00%). On the other hand, the germination of soybean were not affected in the test, demonstrating that the EO at 5.00% interfere only with the dicotyledonous weed *B. pilosa* without affecting the final germination of *G. max*, suggesting the possible use of the EO of *H. ringens* for controlling the weed in soybean crops. Seeds of *G. max* and *B. pilosa* were already used in the same study as targets to test the allelopathic potential of natural products. The extract of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. affected the germination of *Bidens pilosa* L. without interfering on the germination of *G. max*, but the extract of *Sambucus australis* Cham. affected both species (FORTES et al., 2009).

Although the highest concentration of the EO of *H. ringens* (5.00%) influenced negatively the lengths and velocity of emergency of *O. sativa*, it did not significantly affect its germination. The comparison of these results with the effect of the EO on the undesirable monocot *L. multiflorum*, and the undesirable dicot *B. pilosa*, indicates that the crop *O. sativa* demonstrated to be less susceptible, and this fact also suggests the potential use of the EO of *H. ringens* to control weeds on organic culture systems. *O. sativa* has the inhibition of its germination by the EO of *Ravensara aromatica* Sonn. (Lauraceae) previously described

(ANDRIANJAFINANDRASANA et al., 2013).

According to Wink (2009), allelopathy is often caused by mixtures of multi-target secondary metabolites as EO, which have been selected during evolution to fulfill a role of chemical defense. Once the Pampa biome is covered mainly by grasses, the greater susceptibility presented by seeds of monocots to the EO of *H. ringens* could be explained considering the co-evolution of the involved plants. On the other hand, from the dicots including in this study, the most susceptible was *B. pilosa*, the only native species. These results are in accordance with Lankau (2012), which postulated that species which co-occur invest in allelopathic secondary compounds, suggesting that they responded evolutionarily to selection imposed by interspecific competition.

5 CONCLUSION

The EO of *Hesperozygis ringens* containing 82.02% of pulegone affected the development of seeds of monocots and dicots differently, and in general the first demonstrated greater susceptibility. Considering the dicots, the EO at 5.00% inhibited completely all evaluated variables of the weeds *Bidens pilosa* without affecting the development of the bioindicator *Lactuca sativa*. However, the seeds of *Glycine max* had EVI, root lengths and total lengths of seedlings significantly affected by the EO at 5.00%, although the germination was not affected. On the monocot seeds including in the study, the EO at 5.00% inhibited strongly the germination of the weeds *Lolium multiflorum*, without affecting significantly this variable on the crop *Oryza sativa*. The bioindicator *Avena strigosa* was the most susceptible from the target seeds evaluated, and had all parameters strongly inhibited already at the concentration of 2.50% EO. The results of this study demonstrated that the weeds were more affected by the EO than the crops, suggesting the potential use of the EO of *H. ringens* to control weeds in organic crop systems.

6 ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by research funds from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/PRONEX, process 10/0016-8) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq, process 470964/2009-0). Sérgio Luiz de Oliveira Machado and Solon Jonas Longhi are grateful to CNPq for their research fellowships; Carlos Garrido Pinheiro and Lúcio de Paula Amaral are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their graduate fellowships. Jéssica Mengue Rolim is grateful to Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico for his undergraduate scholarship.

7 REFERENCES

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography / quadrupole mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, 2007.

ADEGAS, F. S.; VOLL, E.; PRETE, C. E. C. Embebição e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 1, p. 21-25, 2003.

ALONSO-AMELOT, M. E. et al. Effects of *Minthostachys mollis* essential oil and volatiles on seedlings of lettuce, tomato, cucumber and *Bidens pilosa*. **Allelopathy Journal**, v. 18, n. 2, p. 267-275, 2006.

ALVES, M.C.S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1083-1086, 2004.

ANDRIANJAFINANDRASANA, S. N. et al. Allelopathic effects of volatile compounds of essential oil from *Ravensara aromatica* Sonnerat chemotypes. **Allelopathy Journal**, v. 31, n. 2, p. 333-344, 2013.

ANGELINI, L. G. et al. Essential oils from Mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n.21, p. 6158-6164, 2003.

ARGYROPOULOS, E. I.; ELEFTHEROHORINOS, I. G.; VOKOU, D. In vitro evaluation of essential oils from Mediterranean aromatic plants of the Lamiaceae for weed control in tomato and cotton crops. **Allelopathy Journal**, v. 22, n. 1, p. 69-78, 2008.

BATISH, D. R. et al. Chemical characterization and phytotoxicity of volatile essential oil from leaves of *Anisomeles indica* (Lamiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 104–109, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, **Regras para análise de sementes**. Brasília: LANARV/SNDA/MA. 2009.

BUSI, R. et al. Herbicide-resistant weeds: from research and knowledge to future needs. **Evolutionary Applications**, v. 6, n. 8, p. 1218-1221, 2013.

CRUZ, M. E. S. et al. Allelopathic effect of *Cymbopogon citratus* and *Artemisia absinthium* on seeds of *Bidens pilosa*. **Acta Horticulturae**, v. 569, n. 27, p. 229-233, 2002.

EL-WAKEIL, N. E. Botanical Pesticides and Their Mode of Action. **Gesunde Pflanzen**, v. 65, p. 125–149, 2013.

FAO. (2009) **The lurking menace of weeds**.

<http://www.fao.org/news/story/en/item/29402/icode/> (Accessed on May. 3rd 2013).

FORTES, A. M. T. et al. Efeito alelopático de sabugueiro e capim-limão na germinação de limão na germinação de picão-preto e soja. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 2, p. 241-246, 2009.

GELMINI, G. A. et al. Resistência de biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da enzima ALS utilizados na cultura de soja. **Bragantia**, v. 60, n. 2, p. 93-99, 2001.

GERALDO, J.; ROSSIELLO, R. O. P.; ARAÚJO, A. P.; PIMENTEL, C. Diferenças em crescimento e produção de grãos entre quatro cultivares de milho pérola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 1367-1376, 2000.

GITSOPOULOS, T. K.; CHATZOPOULOU, P.; GEORGOULAS, I. Herbicidal effects of *Satureja hortensis* L. and *Melissa officinalis* L. essential oils on germination and root length of *Lolium rigidum* L. and *Phalaris brachystachys* L. grass weeds.

HAGEMANN, T. R. et al. Potencial alelopático de extratos aquosos foliares de aveia sobre azevém e amendoim-bravo. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 509-518, 2010.

Hellenic Plant Protection Journal. v. 6, n. 1. 2, p. 49-54, 2013.

HU, G.; ZHANG, Z.; HU, B. Allelopathic potential of *Parthenium hysterophorus* L. extracts on seed germination and seedling growth of two crops. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 11, n. 3-4, p. 1460-1462, 2013.

KATO-NOGUCHI, H. et al. A novel allelopathic substance, 13-epi-orthosiphol N, in *Orthosiphon stamineus*. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 1-5, 2013.

KEKEÇ, G. et al. Genotoxic effects of catmint (*Nepeta meyeri* Benth.) essential oils on some weed and crop plants. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 6, p. 504-513, 2013.

KOC, S. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 316–319, 2013.

LANKAU, R. A. Coevolution between invasive and native plants driven by chemical competition and soil biota. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 28, p. 11240-11245, 2012.

MACÍAS, F. A. et al. The use of allelopathic studies in the search for natural herbicides. **Journal of Crop Production**, v. 4, p. 237-255, 2001.

MAGIERO, E. C. et al. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 317-324, 2009.

MARCO, C. A. et al. Chemical composition and allelopathic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 1, p. 157-160, 2012.

MARTINAZZO-PORTZ, T.; MÜLLER, S. F. Germinação de Sementes de *Bidens pilosa* Submetido a Preparados Homeopáticos de *Bidens pilosa*. **Revista Brasileira De Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 4484-4488, 2009.

MOMINUL ISLAM, A. K. M.; KATO-NOGUCHI, H. Plant growth inhibitory activity of medicinal plant *Hyptis suaveolens*: could allelopathy be a cause? **Emirates Journal of Food Agriculture**, v. 25, n. 9, p. 692-701, 2013.

MUCCIARELLI, M. et al. Effect of (+)- pulegone and other oil components of *Mentha x piperita* on cucumber respiration. **Phytochemistry**, v. 57, p. 91-98, 2001.

NAJAR, B. et al. Essential oil from tunisian Lamiaceae as crop germination inhibitors. **Acta Horticulturae**, v. 997, p. 225-230, 2013.

NIST/ EPA/ NIH mass spectral library and search/ analysis programs. Hoboken, NJ: J. Wiley and Sons, 2010.

OLIVEIRA, J. C.; SADER, R.; ZAMPIERI, R. A. Efeito da idade sobre a emergência e vigor de sementes de Maracujá-Amarelo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 6, n. 2, p. 37-44, 1984.

RIBEIRO, V. L. S. et al. Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2506-2509, 2010.

RICKLI, H. C. et al. Efeito alelopático de extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. em alface, soja, milho, feijão e picão-preto. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 473-484, 2011.

RIGBY, D.; CÁCERES, D. Organic farming and the sustainability of agricultural systems. **Agricultural Systems**, v. 68, p. 21-40, 2001.

ROSSI, Y. E.; CANAVOSO, L.; PALACIOS, S. M. Molecular response of *Musca domestica* L. to *Mintostachys verticillata* essential oil, (4R) (+)-pulegone and menthone. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 336–342, 2012.

SANDERSON, K. et al. Allelopathic influence of the aqueous extract of jatropha on lettuce (*Lactuca sativa* var. Grand Rapids) germination and development. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 11, n. 1, p. 641-643, 2013.

SARTOR, L. R. et al. Alelopatia de acículas de *Pinus taeda* na germinação e no desenvolvimento de plântulas de *Avena strigosa*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, 2009.

SILVA, L. L. et al. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013.

SOUZA FILHO, A. P. S. et al. Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 389-396, 2009.

VON POSER, G. L. et al. Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian Lamiaceae *Hesperozygis ringens* (BENTH.) Epling and *Hesperozygis rhododon* Epling. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1829-1832. 1996.\

WIBE, A. How the choice of method influence on the results in electrophysiological studies of insect olfaction. **Journal of insect physiology**, v. 50, n. 6, p. 497-503, 2004.

WINK, M. Evolutionary Advantage and Molecular Modes of Action of Multi-Component Mixtures Used in Phytomedicine. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 10, p. 996-1009, 2009.

Manuscrito 2

PINHEIRO, C. G.; MACHADO, C. M.; AMARAL, L. P.; ALMEIDA, C. A. A.; LONGHI, S. J.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Scents From Brazilian Pampa Grassland: Seasonal Variability Of The Essential Oil Of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling.

SCENTS FROM BRAZILIAN PAMPA GRASSLAND: SEASONAL VARIABILITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling.

ABSTRACT

This study was developed to evaluate the effect of seasonality on the yield and chemical composition of the essential oil (EO) of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling, a native species from the Brazilian Pampa. Leaves were collected from four specimens of a single population in each of the four seasons for a year and were extracted in triplicate by hydro-distillation for 2 hours. The yield of EO (% w/w) was calculated on a fresh weight basis (FWB), and the 16 oil samples were analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography with flame ionisation detector (GC-FID). Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA) were used as statistical tools to evaluate differences in chemical composition. The highest yields were obtained in autumn, spring and summer, while the lowest were detected in winter. Oxygenated monoterpenoids were the predominant class of chemical constituents in the EO obtained in all seasons, showing the highest contents in autumn and summer, and pulegone was identified as a major compound. The EO samples were divided into three chemical groups by HCA and PCA and were assigned to the same group, except for the three samples gathered in winter. The results showed a seasonal influence on the yield and chemical composition of the EOs and suggested low intrapopulation variability.

Keywords: Lamiaceae; seasonality; yield; chemical composition; oxygenated monoterpenoids, pulegone

1 INTRODUCTION

The Brazilian Pampa is located in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil, between 28°00' S and 34°00' S, and 49°30' W and 58°00' W. This biome contains subtropical and temperate climates, has four well-defined seasons and is characterised by the presence of grassland with scattered trees and shrubs as the dominant vegetation types. Furthermore, the soil is fragile due to its sandy texture as a result of its sedimentary rock origin; in combination with the often harsh climatic conditions, this fragility has led to severe soil degradation, which compromises human activity and contributes to the low social development index presented by this region (IBGE, 2014; ROESCH et al., 2009).

Currently, research pertaining to natural resources has grown in importance and is the basis for the development of sustainable uses of biodiversity, aiming to provide new opportunities and alternative sources of income for the local population. Moreover, the restoration of degraded soils by native plant species is considered strategic for their conservation. Essential oils (EO) are a natural resource often produced by the native species of the south Brazilian grassland. *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling (Lamiaceae) is a woody herb, 20 to 50 cm high, native to rocky fields of the Pampa biome with a very branched stem (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006; VON POSER et al., 1996). Some studies have described a high production of essential oil by its leaves, with pulegone as major component (RIBEIRO et al., 2010; VON POSER et al., 1996). This species is known by the vernacular name “espanta-pulga” (literally “to keep fleas away”) (VON POSER et al., 1996) and is used for its anti-parasitic properties. The acaricidal activity of its EO has also been reported (RIBEIRO et al., 2010). Von Poser et al. (1996) observed the dominance of *H. ringens* at the sites where it occurs and described the allelopathic effect of its essential oil on seeds of *Lactuca sativa*.

Considering the above-described characteristics of the species, the goal of this study was to compare the yield and chemical composition of the EO obtained from fresh leaves of four individuals of *Hesperozygis ringens* belonging to a single population in four different seasons (autumn, winter, spring and summer) of a year. Trying to detect possible seasonal and intrapopulation variability, the data were analysed using the hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component

analysis (PCA) statistical tools.

2 METHODOLOGY

2.1 Plant Material

Plant material was collected in São Francisco de Assis (S 29° 35' 43, 1"; W 055° 07' 33, 4"), Rio Grande do Sul, Brazil, between April 2012 and January 2013. Four specimens of *H. ringens* were chosen in the native growth area, and some of their leaves were collected in each season (autumn, winter, spring and summer).

2.2 Essential oil extraction

The essential oil was obtained from the fresh leaves of *H. ringens* by hydro-distillation using a Clevenger-type apparatus for 2 hours (KOC et al., 2013). Plant material from each specimen was extracted in triplicate, and the EO was then transferred to a graduated cylinder and weighed, followed by yield determination as % w/w on fresh weight basis (FWB). The samples were transferred to amber glass bottles and stored in a freezer until the constituents were analysed.

2.3 Chromatographic analysis

A 2 µL aliquot of essential oil was diluted with 1 mL of hexane and analysed by an Agilent 6890 gas chromatograph coupled to an Agilent 5973 mass selective detector (GC/MS). The analysis was carried out on a HP5-MS capillary column (Hewlett Packard, 5% phenyl, 95% methylsiloxane, 30 m x 0.25 mm, film thickness: 0.25 µm) at 70 eV. Analysis conditions: split inlet 1:100; temperature program: 40°C

for 4 min; 40 to 320 °C at 4 °C min⁻¹; He as a gas carrier; flow rate 1 mL min⁻¹; injector and detector temperatures: 250 °C. The EO components were identified by comparison of their retention indices, determined by a calibration curve of n-alkanes injected under the same chromatographic conditions as the samples and mass fragmentation patterns from literature data (ADAMS, 2009; NIST, 2010). The components of the EO were quantified by gas chromatography with flame ionisation detection (GC/FID) on an Agilent 7890A in triplicate. The analysis parameters were the same as those described for the GC/MS analysis, with injection in splitless mode and the injector and detector temperatures set at 300 °C.

2.4 Statistical analysis

The yields of the essential oils and the contents of pulegone and oxygenated monoterpenoids were evaluated by descriptive statistics, performed in a spreadsheet (Excel ®). For the analysis of the yields, a bifactorial design (4x4) was used: Factor 1 - seasons (autumn, winter, spring and summer), and Factor 2 - specimens (1, 2, 3 and 4), providing 16 treatments with 3 replications each, totalling 48 observations. The yield results were submitted to Kolmogorov-Smirnov and Bartlett tests to check the normality and homogeneity of variances, respectively. The differences in yields were evaluated individually and seasonally by two-way ANOVA, followed by a Tukey test. The data regarding the amounts of pulegone and oxygenated monoterpenoids were submitted to a Friedman test using Assistat version 7.6 Beta.

For the definition of chemical groups using the composition of EO, hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were performed, examining the relative percentages of the 25 major constituents ($\geq 1\%$). For HCA, Euclidean distance was used as a dissimilarity measure, while a horizontal dendrogram was obtained by the Single Linkage method. Based on the distances between samples, the Single Linkage was chosen as an amalgamation rule. The PCA was used to determine the variables (constituents) that influenced the formation of groups (MARDIA et al., 1994). For purposes of analysis, each sample of EO was considered a "case" and each constituent a "descriptor variable". Analyses were performed using the software Statistica 6.0.

3 RESULTS

Table 1 shows the results regarding descriptive statistic analysis of yield and the contents of oxygenated monoterpenoids and pulegone for the 16 analysed samples of EOs.

Table 1 – Descriptive statistics of the yield on fresh weight basis and contents of oxygenated monoterpenoids (OM) and pulegone (P) of the essential oils obtained from the leaves of *Hesperozygis ringens* in four seasons of collection.

V (%)	Mean (%)	S.E.	Mode	S	S ²	V _{Min.}	V _{Máx.}	N	CL(95%)	CV (%)
Yield	2.79	0.16	A	0.89	0.81	1.13	4.43	48	0.32	31.89
OM	80.69	2.04	A	8.17	66.77	60.75	87.79	16	4.35	10.13
P	72.80	3.14	A	12.58	158.38	43.14	83.91	16	6.71	17.29

* V = Variables; S.E. = standard error; S = standard deviation; S² = variance; V_{Min.} = minimum value; V_{Max.} = maximum value; N = number; CL = confidence limits; CV = coefficient of variation; A = Amodal.

Comparison of the average yields for the different specimens in all collection seasons (Table 2) shows that, in general, specimen 4 showed more potential for EO production. However, autumn, spring and summer seem to have produced better EO yields in comparison to winter, which generated smaller amounts of EO.

GC-MS and GC/FID analysis allowed the identification of 36 compounds in the 16 EO samples, which were classified into six different chemical classes (Figure 1). On average, autumn and summer showed higher contents of oxygenated monoterpenoids (OM), which were the major constituents in all seasons (Table 2). These two seasons also produced higher contents of pulegone. A significant decrease in the relative amount of OM could be observed in winter. This season also saw an increase of the content of sesquiterpene hydrocarbons (13.9%), which are found only in small proportions, approximately 2%, in autumn, spring and summer (Figure 1).

Table 2 – Averages (%) of yields of essential oil from the leaves of four specimens of *Hesperozygis ringens* extracted in distinct seasons, mean contents of oxygenated monoterpenoids and pulegone.

Season	Specimen				Oxygenated monoterpenoids	Pulegone
	1	2	3	4		
Autumn	3.46 a A	3.07 a AB	3.01 b B	3.48 b A	86.20 a	81.17 a
Winter	1.45 c B	1.43 b B	1.15 c B	1.91 c A	68.52 c	54.13 c
Spring	2.32 b D	2.83 a C	3.59 a B	4.38 a A	82.77 b	76.91 b
Summer	3.31 a A	2.64 a B	3.33 ab A	3.17 b A	85.27 a	79.02 ab

Data are expressed as mean values (n = 3 for the yields and n = 4 for oxygenated monoterpenoids and pulegone). For yields, different lowercase letters in the same columns indicate significant differences between the distinct seasons for the same specimen, and different capital letters in the rows indicate significant differences between distinct specimens in the same season. Tukey test ($P < 0.05$). For oxygenated monoterpenoids and pulegone, different lowercase letters in the same columns indicate significant difference between the distinct seasons. Friedman test ($P < 0.05$).

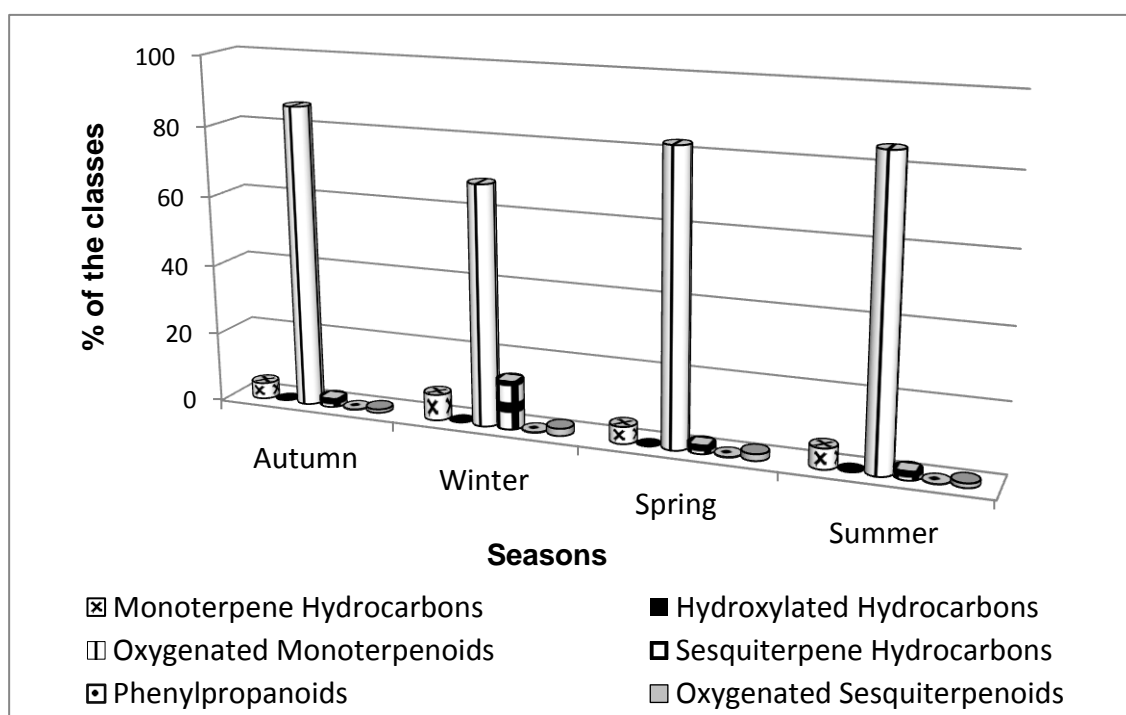


Figure 1 – Mean percentage of the major chemical classes of the constituents identified in the essential oils from the leaves of four specimens of *H. ringens* considering the different seasons.

In addition to OM, the second class of constituents most frequently found was the monoterpene hydrocarbons (Figure 1), which had means of 4.6, 7.5, 4.9 and 5.9% in autumn, winter, spring and summer, respectively. Furthermore, the oxygenated sesquiterpenoids were detected in small percentages, between 1 and 2%, in all seasons. Finally, the hydroxylated hydrocarbons and phenylpropanoids occurred as trace components, with percentages smaller than 1%.

The PCA, considering the 25 components present in amounts exceeding 1.0%, showed 15 principal components (PC), with the first representing 40.81% of the total variance, including the major compound pulegone. The second PC contributed 19.56% of the total variance and is represented by β -myrcene, α -terpineol, ledol and caryophyllene oxide. PCs 3, 4 and 5 provided 13.27, 7.31 and 4.81% of the total variance and are represented by non-identified component 2 (NI2), spathulenol and NI6, respectively. The first five PCs had eigenvalues greater than 1 and explained 85.76% of the total variance (Figure 2).

The sesquiterpenoids caryophyllene (c18), viridiflorol (c24) and spathulenol (c22), together with the non-identified compounds NI6 (c25) and NI5 (c17), provided a small contribution to PCs 1 and 2 (Figure 2). The comparison of Figures 2A and B shows that the compounds NI3 (c15), NI4 (c16), ledol (c21) and caryophyllene oxide (c23) are related to the second winter sample (WIN2), while pulegone (c14) has a smaller correlation with the winter samples (WIN1, WIN2, WIN3 and WIN4) than with the other seasons' samples.

The hierarchical cluster analysis (HCA) promoted the division of the samples into three chemical groups (A, B and C) (Figure 3). Group A is represented by the samples obtained in autumn (AUT 1-4), spring (SPR 1-4), summer (SUM 1-4) and a single sample from winter (WIN 2). All of these samples exhibited concentrations of pulegone that ranged between 68.12 and 83.91%. Group B consisted of only the first sample obtained in winter (WIN 1), while the last group (C) encompassed the two remaining samples of this season (WIN 3 and 4).

In the second winter sample (WIN 2), the concentration of pulegone (68.12%) was lower than in the samples from the other seasons but similar enough to be classified in group A. The first winter sample (WIN 1) showed a lower concentration of pulegone (59.37%); therefore, the HCA formed a new group with this sample. In addition, two winter samples, WIN 3 and WIN 4, presented similar concentrations of pulegone (45.89 and 43.14, respectively) and were classified in the third group

(Figure 3). This analysis demonstrated the greater chemical variability on the EO samples obtained in winter.

Within group A (Figure 3), spring samples 1 and 3 showed more similarity, evidenced by their smaller Euclidean distance. A similar situation occurred with samples 3 and 4 obtained in autumn. In this season, samples 1 and 2 also presented a strong similarity but had a greater Euclidean distance than samples 3 and 4. This distinction can be explained by the lower concentrations of pulegone in the first two samples (AUT 1 and AUT 2) compared with the other two (AUT 3 and AUT 4). Sample 2 obtained in summer (SUM 2) presented a greater Euclidean distance than the other three samples obtained in this season, which can be explained by its lower concentration of pulegone.

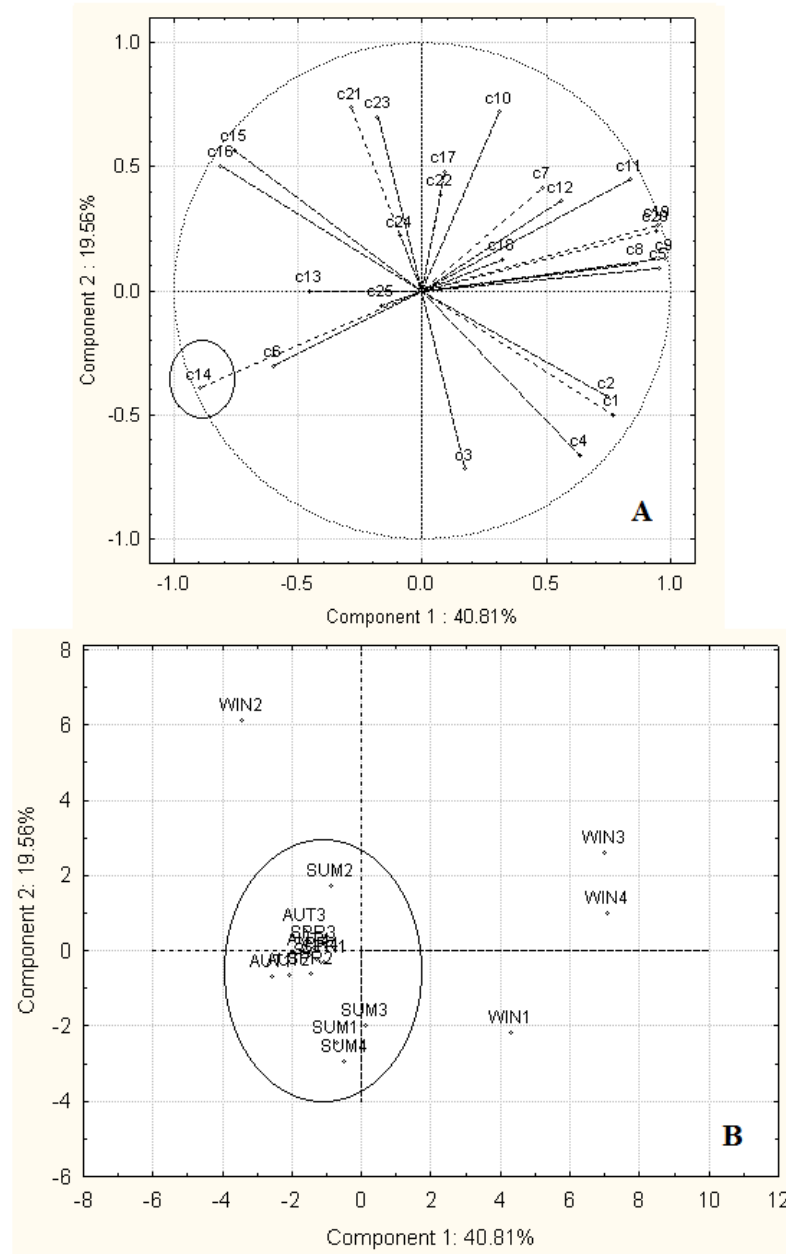


Figure 2 – Representation of the variables (A) and samples (B) on the plans of principal components 1 and 2, considering the 25 major constituents of the 16 essential oil samples obtained from the fresh leaves of *Hesperozygis ringens* in different seasons. The ellipses highlight pulegone (c14) and the samples from autumn (AUT 1-4), spring (SPR 1-4) and summer (SUM 1-4).

c1 = α -Pinene; c2 = β -Pinene; c3 = β -Myrcene; c4 = Limonene; c5 = Eucalyptol; c6 = β -E-ocimene; c7 = Linalool; c8 = Isopulegol; c9 = Isopulegone; c10 = α -Terpineol; c11 = Verbenone; c12 = NI1; c13 = NI2; c14 = Pulegone; c15 = NI3; c16 = NI4; c17 = NI5; c18 = Caryophyllene; c19 = Germacrene D; c20 = Elixene; c21 = Ledol; c22 = Spathulenol; c23 = Caryophyllene oxide; c24 = Viridiflorol; c25 = NI6. AUT 1-4, WIN 1-4, SPR 1-4 and SUM 1-4= Samples of EO obtained in autumn, winter, spring and summer, respectively.

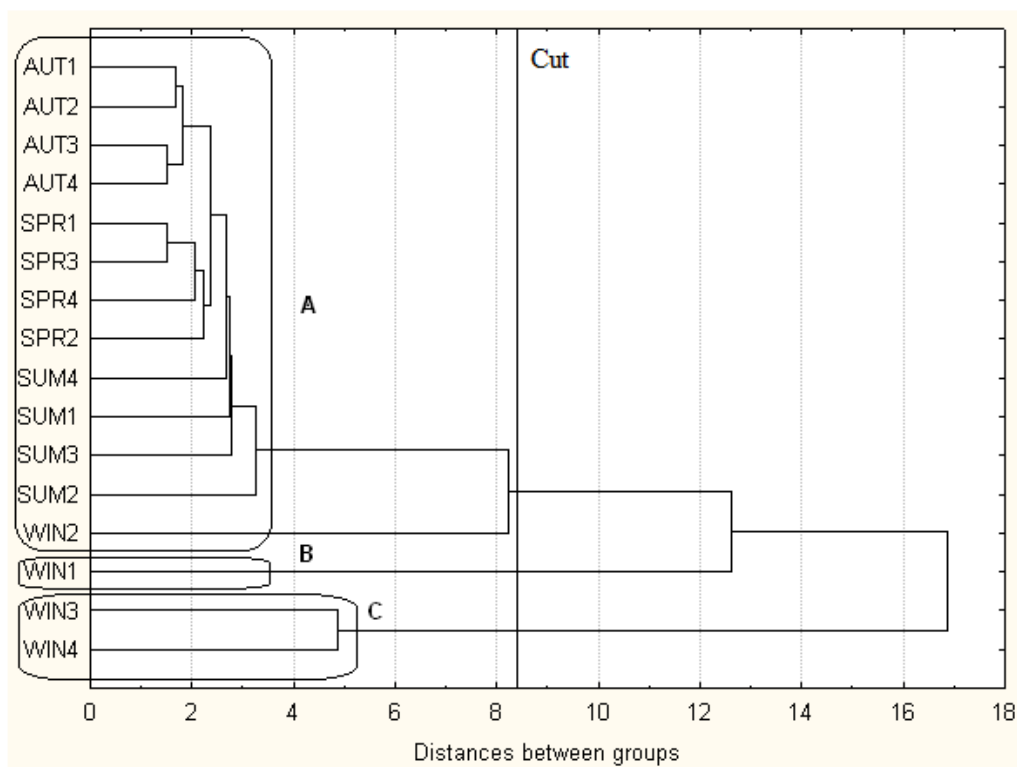


Figure 3 – Dendrogram generated by HCA of the chemical composition of 16 samples of essential oils obtained from the leaves of *Hesperozygis ringens*, highlighting groups A, B and C.

AUT 1-4, WIN 1-4, SPR 1-4 and SUM 1-4: Samples of EO obtained in autumn, winter, spring and summer, respectively

4 DISCUSSION

Some studies have reported EO yields for the leaves of *H. ringens* considering both the fresh and dry weight bases (FRACARO, 2006; RIBEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2013; VON POSER et al., 1996). In the present study, the yields were expressed in fresh weight basis because different authors have described EO loss in the leaves of Lamiaceae species and changes in the chemical composition of the oil due to drying processes (ARGYROPOULOS; MÜLLER, 2014; SELLAMI et al., 2012). During drying, the moisture moves by diffusion from the interior of the leaves to surface and can carry the EO with it, thus affecting the productivity (ARGYROPOULOS; MÜLLER, 2014). According to Venskutonis (1997), depending on the drying method, the biological structure of the oil gland trichomes of some

Lamiaceae species can be strongly affected.

The yields obtained for the EO of *H. ringens* show a dependence on seasonality, which has also been described in previous studies for other species of Lamiaceae (GAZIM et al., 2010). Beyond the season and drying state of the plant material, the EO yield and composition can be affected by other factors, such as stage of plant development, light, temperature, soil, altitude, rainfall, and harvest time (BLANK et al., 2005; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; LAKUSIC et al., 2011; LIMA et al., 2003). The production of secondary metabolites and the composition of complex mixtures such as EO can also be influenced by other environmental conditions, such as pollution, climate, and diseases (FIGUEIREDO et al., 2008).

Other studies regarding the EO from fresh leaves of *H. ringens* reported approximately 4.0% higher yields compared to the corresponding data found in this work (RIBEIRO et al., 2010; VON POSER et al., 1996). *Hesperozygis* species are characterised by high yields of EO when the fresh material is extracted. The leaves of *H. rhododon* presented a yield of 1.0%, whereas the aerial parts of *H. marifolia* had a yield of 2.0% (GONZÁLES-CHAVEZ et al., 2011; VON POSER et al., 1996). In general, species classified in the Lamiaceae stand out by presenting high potential for essential oil production (MECHERGUI et al., 2010; MONFARED; GHORBANLI, 2010; OZCAN et al., 2011; RAINA et al., 2013; SAEI-DEHKORDI et al., 2010; TOUATI et al., 2011; ZOUARI et al., 2011).

Considering the analysed seasons, autumn, spring and summer showed higher EO yields. Analysing the seasonal influence in the EO production of the Lamiaceae species, summer usually stands out as the season that provides the highest EO content. This observation may indicate a positive influence of higher temperatures that, together with precipitation, can positively affect the vegetative growth (BOTREL et al., 2010; SANTOS et al., 2012). Another factor to be considered is flowering. According to the field observations of this study, the flowering of *H. ringens* begins in spring, continues strongly in summer and remains in autumn. Thus, the EO yields found suggest that EO production may be related to the flowering period. Similar behaviour has been described in other Lamiaceae species, which were found to present the maximum EO production at the peak of flowering (BOTREL et al., 2010; LAKUŠIĆ et al., 2011; PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2012). However, exceptions to this trend were also detected in Lamiaceae (GAZIM et al., 2010); therefore, the yields of all species with the potential to produce essential oil

should be assessed considering the phenological phases and the variables to which the plants are commonly subjected. In contrast, lower levels of essential oil in winter can be related to the greater number of rainy days in southern Brazil during the winter months (SILVA et al., 2007), which can remove the EO from the leaves, causing losses because the structures for EO storage in Lamiaceae species are located on the surface (SANDES et al., 2012).

Analysing the specimens reveals that their yields indicate low intrapopulation variability, which is not surprising. According to Fracaro and Echeverrigaray (2006), intrapopulation variability in *H. ringens* may exist, but it is lower than the interpopulation variability, suggesting limited gene flow between populations. Qualitative and quantitative chemical variations of the EO can be observed within and between populations, indicating a relationship with the geographic distribution and its importance for species survival in its natural habitat (FRACARO, 2006). The variations in the EO production between individuals of other Lamiaceae species among and within populations have been already described (AGOSTINI et al., 2006; LAKUŠIĆ et al., 2013; LUKAS et al., 2013; MUNÓZ-BERTOMEU et al., 2007), and the geographic distribution has proven to be the primary determinant controlling its diversity within populations (TRINDADE et al., 2008) or among them (AGOSTINI et al., 2006).

According to literature reports, the percentage of pulegone in the EO of *H. ringens* can range between 79.2-96.63% (SILVA et al., 2013; VON POSER et al., 1996). Some studies indicate biological effects of this constituent, such as allelopathic, acaricide and insecticide (BASBAGCI; ERLER, 2013; MUCCIARELLI et al., 2001; RIBEIRO et al., 2010). This OM can also be found in other *Hesperozygis* species, usually at lower concentrations, but it is frequently the major compound of the EO, as in *H. marifolia* (40.75% of (R)-pulegone) (GONZÁLES-CHAVEZ et al., 2011) and *H. myrtoides*, (44.4%) (MARTINI et al., 2011). In the case of *H. rhododom*, the major compound is menthone (43.4%), a monoterpenoid derivative with similar structure, while pulegone also occurs at high percentages (29.6%) (VON POSER et al., 1996).

Considering the variations of the contents of OM and pulegone between seasons, autumn and summer had a statistically similar department, yielding the highest contents. Seasonal variation in monoterpenoid contents has been reported previously in other Lamiaceae species (BOTREL et al., 2010; SANTOS et al., 2012),

and the levels of (+)-pulegone have also been shown to be influenced by seasonality in *Micromeria fruticosa*, reaching maximal content during the summer (DUDAI et al., 2001).

Studies regarding the chemical composition of the EO from different species of Lamiaceae indicate that they are composed mainly of monoterpenoids (HUSSAIN et al., 2013; KOC et al., 2013; MORO et al., 2011; TOUATI et al., 2011; YOUSEFZADEH et al., 2013). This result is not surprising because the well-known biosynthetic processes of terpenoids in plants are genetically controlled, and species classified in the same family often present major compounds of the same class (LUKAS, 2013; NAJAFIAN, 2014).

The analyses by PCA and HCA indicate a slight seasonal influence on the EO of *H. ringens*, with the oil obtained from leaves collected in winter showing the greatest differences compared to other seasons. Considering that different enzymes responsible for the formation of terpenoids are stimulated by ultraviolet-B and photosynthetically active radiation (BEHN et al., 2010), the results of this work suggest that the conditions imposed on the species in winter, i.e. the shorter and overcast days characteristic of this season in southern Brazil, may have negatively influenced the yield of EO and its pulegone content. Beyond monoterpenoids, the seasonality can also influence the contents of sesquiterpenoids (BOTREL et al., 2010; FREIRE et al., 2006; GAZIM et al., 2010). The collection time of the plant material is an important factor because the amount, and sometimes the nature, of the active constituents are often not constant throughout the year (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Considering that autumn, spring and summer produced the highest yields of EO and at the same time provided high contents of OM and pulegone, this study indicates these seasons as the most appropriate to collect the leaves of *H. ringens* to obtain EO. Considering the high yields of EO and its chemical composition, almost exclusively constituted by pulegone, new studies should be conducted with *H. ringens* to search for ways to cultivate and reproduce the species. Comparing the individual yields, specimens 1, 3 and 4 would be indicated as mother plants to collect seeds or for *in vitro* propagation experiments aiming to produce seedlings.

5 ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/PRONEX, process 10/0016-8). Carlos Augusto Mallmann and Solon Jonas Longhi Longhi are grateful to Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) for their research fellowships; Carlos Garrido Pinheiro and Lúcio de Paula Amaral are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their graduate fellowships. Césare Mattioda Machado is grateful to CNPq for his undergraduate scholarship.

6 REFERENCES

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2009.

AGOSTINI, G. et al. Essential oil variability within and among populations of *Cunila incisa* Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 802-808, 2006.

ARGYROPOULOS, D.; MÜLLER, J. Changes of essential oil content and composition during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 118–124, 2014.

BASBAGCI, G., ERLER, F. Evaluation of some essential oils and their major components against mushroom scatopsid flies as fumigants. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 22, n. 11, p. 3170-3178, 2013.

BEHN, H. et al. Ultraviolet-B and photosynthetically active radiation interactively affect yield and pattern of monoterpenes in leaves of peppermint (*Mentha piperita* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7361–7367, 2010.

BLANK, A. F. et al. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo

essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 1, p. 73-78, 2005.

BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

DUDAI, N. et al. Developmental Control of Monoterpene Content and Composition in *Micromeria fruticosa* (L.) Druce. **Annals of Botany**, v. 88, n. 3, p.349-354, 2001.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226, 2008.

FRACARO, F. **Ecologia molecular, variabilidade genética, química e cultivo in vitro de *Hesperozygis ringens* Benth.** 2006. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of southern Brazil. **Biochemical Genetics**, v. 44, p. 479-490, 2006.

FREIRE, C. M. M.; MARQUES, M. O. M.; COSTA, M. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 161–166, 2006.

GAZIM, Z. C. et al. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 8, p. 5509-5524, 2010.

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

GONZÁLES-CHAVEZ, M. M. et al. Fungicidal properties of the essential oil of *Hesperozygis marifolia* on *Aspergillus flavus* Link. **Molecules**, v. 16, n.3 , p. 2501-2506. 2011.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two *Thymus* species from the Pakistani flora. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 185-192, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE (2014). **Descobrimos os biomas brasileiros**. Available online: <http://www.ibge.gov.br>. Accessed on 14 January 2014.

KOC, S. et al. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 316–319, 2013.

LAKUŠIĆ, B. S. et al. Environmental and seasonal impacts on the chemical composition of *Satureja horvatii* Silic (Lamiaceae) essential oils. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 3, p. 483-493, 2011.

LAKUŠIĆ, B. S. et al. Variations in essential oil yields and compositions of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) at different developmental stages. **Botanica SERBICA**, v. 37, n. 2, p. 127-139, 2013.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

LUKAS, B.; SCHMIDERER, C.; NOVAK, J. Phytochemical diversity of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* (Lamiaceae) from Austria. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 106–113, 2013.

MARDIA, K. V.; KENT, J. T.; BIBBY, J. M. **Multivariate analysis**, pp. 213-244, pp. 360-384, 1994.

MARTINI, M. G. et al. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Ocimum selloi* and *Hesperozygis myrtooides*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 1027-1030, 2011.

MECHERGUI, K. et al. Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Letswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1745–1749, 2010.

MONFARED, A.; GHORBANLI, M. Composition of the essential oil of *Salvia leriifolia* Benth. growing wild in around of two mines in Iran. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 4, n. 1, p. 13-17, 2010.

MORO, A. et al. Effects of Agronomic Practices on Volatile Composition of *Hyssopus officinalis* L. Essential Oils. **Molecules**, v. 16, p. 4131-4139, 2011.

MUCCIARELLI, M. et al. Effect of (+)- pulegone and other oil components of *Mentha x piperita* on cucumber respiration. **Phytochemistry**, v. 57, p. 91-98, 2001.

MUNÓZ-BERTOMEU, J.; ARRILLAGA, I.; SEGURA, J. Essential oil variation within and among natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 479-488, 2007.

NAJAFIAN, S. Storage conditions affect the essential oil composition of cultivated Balm Mint Herb (Lamiaceae) in Iran. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 575–581, 2014.

NIST/ EPA/ NIH mass spectral library and search/ analysis programs. Hoboken, NJ: J. Wiley and Sons, 2010.

OZCAN, M. M.; et al. Chemical Composition Of Essential Oils Of *Phlomis Grandiflora* H.S. Thompson Var. *Grandiflora* Flowers And Leaves Of Turkish Origin. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, p. 125–132, 2011.

PÉREZ-SÁNCHEZ, R.; GÁLVEZ, C.; UBERA, J. L. Bioclimatic influence on essential oil composition in South Iberian Peninsular populations of *Thymus zygis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 1, p. 71-81, 2012.

RAINA, A. P.; KUMAR, A.; DUTTA, M. Chemical characterization of aroma compounds in essential oil isolated from “Holy Basil” (*Ocimum tenuiflorum* L.) grown in India. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, n. 5, p. 1727-1735, 2013.

RIBEIRO, V. L. S. et al. Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2506-2509, 2010.

ROESCH, L. F. W. et al. The Brazilian Pampa: a fragile biome. **Diversity**, v. 2, p. 182-198, 2009.

SAEI-DEHKORDI, S. S. et al. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1562–1567, 2010.

SANDES, S. S. et al. Estruturas secretoras foliares em patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.]. **Scientia Plena**, v. 8, n. 5, p. 1-6, 2012.

SANTOS, V. M. C. S. et al. Seasonal variation of vegetative growth, essential oil yield and composition of menthol mint genotypes at southern Brazil. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 5, p. 790-798, 2012.

SELLAMI, I. H. et al. Drying sage (*Salvia officinalis* L.) plants and its effects on content, chemical composition, and radical scavenging activity of the essential oil. **Food Bioprocess Technol**, v. 5, p. 2978–2989, 2012.

SILVA, J. C. S. et al. Análise de distribuição de chuva para Santa Maria, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 67–72, 2007.

SILVA, L. L. et al. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013.

TOUATI, B. et al. Chemical Composition of the Leaf and Flower Essential Oils of Tunisian *Lavandula dentata* L. (Lamiaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 1560-1569, 2011.

TRINDADE, H. et al. Genetic diversity and chemical polymorphism of *Thymus caespitosus* from Pico, São Jorge and Terceira islands (Azores). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 790–797, 2008.

VENSKUTONIS, P. R. Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus 376 vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). **Food Chemistry**, v. 59, n. 2; p. 219-227, 1997.

VON POSER, G. L. et al. Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian lamiaceae *Hesperozygis ringens* (BENTH.) Eplig and *Hesperozygis rhododon* Eplig. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, n. 7, p.1829-1832. 1996.

YOUSEFZADEH, S. et al. Effects of Azocompost and urea on the herbage yield and contents and compositions of essential oils from two genotypes of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) in two regions of Iran. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1407-1413, 2013.

ZOUARI, N. et al. Chemical composition, angiotensin I- converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). **Food and Bioprocess Processing**, v. 89, p. 257-265, 2011.

RESULTADOS ADICIONAIS

Na sequência é apresentada parte referente aos testes de avaliação da atividade larvicida do OE de *H. ringens*, frente as larvas de Odonata. Os resultados foram apresentados em evento internacional, nas “XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores del Grupo Montevideo”, realizado em Corrientes, Argentina, no mês de outubro de 2013.

Análise de composição química e atividade larvicida do óleo essencial de *Hesperozygis Ringens* (Benth.) sobre larvas de Coenagrionidae (Odonata).

1 Introdução

Muitos fatores podem afetar as populações de peixes durante os estágios iniciais de desenvolvimento, como as condições ambientais, habitat, competição, entre outros (LOUARN e CLOAREC, 1997). Doenças e predadores são fatores que causam uma série de prejuízos econômicos aos piscicultores, podendo levar à inviabilização dos seus empreendimentos (FONSECA et al., 2004). A predação das larvas, pós-larvas e alevinos por ninfas de insetos da Ordem Odonata, também conhecidas popularmente por "libélulas ou lavadeiras", podem resultar na perda total de produção de juvenis. Além disso, esses insetos também podem representar um entrave em programas de repovoamento de peixes, dificultando a obtenção de alevinos (FONSECA et al., 2004; SOARES; HAYASHI; REIDEL, 2003).

Informações na literatura sobre o controle da predação por larvas de Odonata são escassas. O uso de organofosforados, como metil paration e a adição de diesel isoladamente ou em conjunto com querosene em açudes são práticas de controle de insetos relatadas, com fortes impactos ambientais associados (ALMEIDA; AGUIAR; MORAES, 2005; GONZÁLEZ; LEAL, 1995). Extratos de espécies vegetais, como óleos essenciais, não apenas repelem insetos, como também possuem atividades inseticidas. Esses produtos naturais representam potenciais alternativas aos

pesticidas sintéticos, podendo reduzir as chances de ocorrer impactos negativos para o ambiente e a saúde humana (ISMAN, 2000; ISMAN; MACHIAL, 2006; SINGH; UPADHYAY, 1993).

A família Lamiaceae destaca-se não apenas por apresentar espécies produtoras de óleos essenciais, mas também por diversos de seus representantes fornecerem OE em quantidades que possibilitem o estudo de suas atividades biológicas, por exemplo de potencial larvicida (CAVALCANTI et al., 2004; FURTADO et al., 2005; KALAIVANI; SENTHIL-NATHAN; MURUGESAN, 2012; KOVENDAN et al., 2012). Dentre as espécies pertencentes à Lamiaceae, merece destaque *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling Segundo Von Poser et al. (1996), *H. ringens* é uma erva lenhosa nativa, que ocorre em campos rochosos no sudeste do Rio Grande do Sul, sendo dominante nos locais onde existe, indicando ação alelopática. A espécie, conhecida popularmente como “espanta-pulga”, é muito utilizada como inseticida natural, por produzir um óleo essencial (OE) rico em pulegona (FRACARO, 2006).

Considerando-se as diferentes possibilidades de aplicação do OE envolvendo suas atividades biológicas, o presente trabalho tem como objetivos analisar o rendimento e a composição química do OE de folhas frescas de *Hesperozygis ringens*, bem como analisar sua ação larvicida sobre Coenagrionidae (Odonata).

2 Material e Métodos

2.1 Coleta do material vegetal

Ramos de *Hesperozygis ringens* foram coletados aleatoriamente de indivíduos no município de São Francisco de Assis (coordenadas: S 29° 35' 43,1"; W 055° 07' 33,4"), em abril de 2011. Após a coleta, o material foi levado até o Laboratório de Extrativos Vegetais, para que ocorresse o procedimento de extração do OE das folhas frescas. Material testemunha identificado pelo Prof. Solon Jonas Longhi foi depositado no Herbário do Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brasil (exsicata SMDB 13.427).

2.2. Extração do óleo essencial

A extração do OE ocorreu em triplicata, por processo de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger por 2 h (KOC et al., 2013). O OE foi armazenado em frasco âmbar em temperatura de -4 °C até a análise química e o teste biológico. O rendimento do OE foi calculado considerando a proporção m/m (%) e sua composição química foi analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), conforme descrito por Silva et al. (2012).

2.3. Coleta das larvas de Coenagrionidae

Larvas de Coenagrionidae foram coletadas em tanques de peixes do Departamento Zootecnia da UFSM, em Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil em outubro de 2011. Três amostragens foram realizadas pela manhã, utilizando redes entomológicas para capturar as larvas presentes no substrato das margens do açude. Os espécimes coletados foram acondicionados em sacos plásticos contendo água do mesmo lago. Após os experimentos, as larvas foram armazenadas em etanol a 70% para que ocorresse a identificação, que foi efetuada de acordo com Carvallho (2007).

2.4. Avaliação de atividade larvicida

Para avaliar a atividade larvicida do OE de *H. ringens* contra Coenagrionidae, foram testadas diferentes concentrações (10, 50, 75 e 100 $\mu\text{L.L}^{-1}$) para determinar a relação concentração-resposta.

Os experimentos foram realizados em aquários de capacidade para 1 litro, contendo cinco larvas e 0,5 L de água. As amostras de óleo foram diluídas em etanol a 95% (1:5), antes da sua adição à água. Controles de água e etanol também foram avaliados. Cada tratamento foi avaliado em triplicata, com cinco larvas por aquário,

selecionadas de acordo com a semelhança morfológica, porém de tamanhos heterogêneos, visando simulação de condições encontradas em viveiros de aquicultura. Larvas vivas e mortas foram contabilizadas por um período de 19 h após o início do experimento, devido à mortalidade observada no controle de água neste período de tempo, em um experimento prévio. As larvas foram consideradas mortas quando não respondiam a estímulos, ou quando apresentavam posições anormais e não ascendiam à superfície (SANTOS et al. 2012).

2.5 Análise estatística

O valor da concentração letal 50% (CL_{50}) e o intervalo de confiança 95% para o teste larvicida foram calculados por análise de Probitos (FINNEY, 1971). Os valores referentes à ocorrência de predação entre larvas foram descontados dos resultados de mortalidade antes da submissão à análise estatística.

3 Resultados

A identificação das larvas ocorreu até o nível de gênero, dessa forma, foram identificados os gêneros *Acanthagrion*, *Homeoura*, *Ischnura* and *Oxyagrion* (COSTA; SOUZA; OLDRINI, 2004).

O óleo de *H. ringens*, de coloração amarelada, apresentou densidade de 0,93 g/mL e rendimento (m/m) de 2,94%. Foi identificada 99,07% da composição química do OE (Tabela 1). Dos 11 componentes identificados, destaca-se a pulegona, correspondente a 95,18% do total. Também foram encontrados outros mono e sesquiterpenoides, porém, em baixas concentrações.

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de folhas de *Hesperozygis ringens*.

IR ^a experimental	IR literatura ^{b,c}	Componente	Percentual
927	930	α-Pineno	0,29
967	968	Sabineno	0,14
968	966	β-Pineno	0,25
977	980	1-Octen-3-ol	tr ^d
987	988	β-Mirceno	0,24
1024	1026	Limoneno	1,28
1048	1050	β- <i>E</i> -Ocimeno	0,54
1100	1099	β-Linalol	0,54
1171	1171	Neo-Isopulegol	0,31
1247	1239	Pulegona	95,18
1418	1418	β-Cariofileno	0,27
Componentes identificados			99,07

^a IR=Índice de retenção; ^bAdams; ^cNIST; ^d tr= Traço (<0,05%).

Em relação aos resultados do experimento prévio realizados com os controles de água e etanol com larvas de Coenagrionidae ao longo de 19 horas, estes não ocasionaram mortalidade nesse período de tempo.

A concentração de 10 µL.L⁻¹ apresentou mortalidade de 6,67%, enquanto que a de 50 µL.L⁻¹ demonstrou 26,67%. Já as concentrações mais altas de OE, de 75 e 100 µL.L⁻¹, foram detectadas médias de mortalidade de 46,67 e 86,67%, respectivamente. Esses resultados permitiram obter o valor relativo à CL₅₀, que foi de 69,05 µL.L⁻¹ (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade larvicida do óleo essencial de folhas de *Hesperozygis ringens* contra larvas de Coenagrionidae em tratamento de 19 horas.

Concentração do óleo essencial (µL L ⁻¹)	Média de Mortalidade ± EPM (%)	CL ₅₀ (µL L ⁻¹) 95% (Intervalo de confiança)
10	6,67±6,67	
50	26,67±17,64	69,05 (54,47-84,15)
75	46,67±6,67	
100	86,67±6,67	

DISCUSSÃO GERAL

O Brasil é um país rico em espécies da família Lamiaceae, cujos óleos apresentam diversas bioatividades, como bactericida, fungicida e inseticida (LIMA; CARDOSO, 2007). Dentro desta família, encontra-se o gênero *Hesperozygis* apresentando estudos promissores que incentivam as pesquisas científicas com seus representantes. O gênero é formado por seis espécies, destacando-se *H. myrtoides*, *H. marifolia*, *H. rhododon* e *H. ringens* que já apresentaram pesquisas propalando seus potenciais antimicrobiano, fungicida, alelopático, larvicida e anestésico (GONZÁLES-CHAVEZ et al., 2011; MARTINS et al, 2011; RIBEIRO et al, 2010; SILVA et al., 2013; VON POSER et al 1996).

Os pesticidas são considerados substâncias químicas que foram concebidas para eliminar ou retardar o crescimento de pragas que prejudicam o desenvolvimento de espécies desejadas pelos seres humanos (EL-WAKEIL, 2013). Os pesticidas químicos são tóxicos e representam um perigo em longo prazo para o ambiente e os seres humanos, devido a sua permanência na natureza ou tecido do organismo, podendo contaminar ambientes aquáticos e matar formas de vida úteis (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001; EL-WAKEIL, 2013;). Produtos agrotóxicos são divididos em classes como acaricida, fungicida, herbicida, inseticida e larvicida, e buscam elevar a produção, melhorar a qualidade dos produtos de interesse e reduzir trabalho bem como gastos de energia (COUTINHO et al., 2005). Segundo os mesmos autores, porém, o uso indiscriminado e pouco criterioso desses produtos apresenta sérias consequências ao ambiente e a saúde humana.

Pesticidas botânicos são produtos químicos biodegradáveis, extraídos de plantas, de menor impacto ao ambiente e, ao contrário de pesticidas convencionais que se baseiam em um único ingrediente ativo, compreendem uma variedade de compostos químicos (EL-WAKEIL, 2013). Os extrativos vegetais são um dos principais tipos de produtos botânicos utilizados para controle de pragas e são produzidos comercialmente a partir de diversas fontes botânicas. São utilizados tradicionalmente para repelir insetos, proteger grãos armazenados, combater pragas agrícolas e fungos patogênicos responsáveis por doenças pré e pós-colheita (EL-WAKEIL, 2013; ISMAN, 2000; ISMAN; MACHIAL, 2006).

O desenvolvimento de pesticidas botânicos à base de OE é favorecido por

fatores como o custo relativamente baixo dos ingredientes ativos e a composição química formada por misturas complexas de constituintes que muitas vezes atuam em processos fisiológicos e comportamentais, (EL-WAKEIL, 2013). Devido à composição química complexa dessas misturas, a resistência de pragas tende a ocorrer mais lentamente que em pesticidas sintéticos (ISMAN; MACHIAL, 2006). Outro fator determinante que beneficia a utilização dos óleos como pesticidas é sua volatilização, que permite que o mesmo permaneça por tempo limitado na área, diminuindo os riscos para o ambiente, conseqüentemente, organismos inofensivos serão menos afetados como resultado da atividade residual mínima (EL-WAKEIL, 2013; ISMAN; MACHIAL, 2006).

Hesperozygis ringens é evidenciada por apresentar notável produção de OE e elevado teor de pulegona na sua composição química (RIBEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2013; VON POSER et al., 1996). Compreendendo a necessidade da descoberta de novas finalidades para produtos botânicos e considerando as características do OE de *H. ringens* descritas na literatura, foram realizados testes visando analisar seu potencial alelopático. Os resultados demonstraram que o óleo da espécie, na maior concentração testada, afetou consideravelmente o desenvolvimento das espécies indesejáveis *Lolium multiflorum* e *Bidens pilosa*, inibindo completamente a germinação da última. Apesar da mesma concentração do óleo retardar a germinação de *Oryza sativa* e *Glycine max*, afetando os comprimentos das plântulas das mesmas, não prejudicou significativamente as germinações finais dessas grandes culturas, indicando que as espécies indesejáveis foram mais suscetíveis à ação do óleo de *H. ringens*, conforme descrito no Manuscrito 1. Além disso, o OE já na concentração de 1% prejudicou significativamente a germinação, velocidade de emergência e o comprimento de partes aéreas de *Bidens pilosa*, sem afetar *Glycine Max*, prejudicando apenas as partes aéreas de *Oryza sativa*. Esses resultados sugerem a possibilidade do OE da espécie se tornar um herbicida botânico, porém, para tal ideia ser consolidada são necessárias novas pesquisas envolvendo a atividade da pulegona isolada; verificação da germinação das sementes e produção de mudas de *H. ringens*; e verificação da possibilidade de obtenção do OE através de processos biotecnológicos, entre outros.

Para que um OE venha a ser utilizado como pesticida botânico, além de reconhecer seu potencial, torna-se impreterível descobrir qual o período mais

adequado para sua coleta, uma vez que a sazonalidade é um dos fatores que exercem influência sobre as características do óleo (BOTREL et al., 2010; GAZIM et al., 2010). Através das análises de rendimento do OE de *H. ringens* realizadas no período de um ano, constatou-se que primavera e verão foram as estações em que a espécie produziu maior quantidade de óleo, embora no outono a espécie também tenha demonstrado uma elevada produtividade. Em relação à composição química do OE, a classe predominante foi a dos monoterpenóides oxigenados, com o composto pulegona apresentando-se como majoritário em todas as amostras analisadas. Porém, apesar da classe e do composto destacarem-se em todas as estações, foram outono e verão que proporcionaram seus maiores teores, conforme observado no Manuscrito 2.

Através das observações a campo deste estudo, foi possível observar que durante as três estações em que o óleo teve melhores rendimentos com elevados teores de monoterpenóides oxigenados em sua composição química, havia flores nos indivíduos de *H. ringens*, sugerindo que o florescimento da espécie proporciona um estímulo para produção de OE. Este fato é sustentado por outros estudos com espécies de Lamiaceae que também tiveram seus rendimentos elevados em períodos de florescimento (BOTREL et al., 2010; LAKUŠIĆ et al., 2011; PÉREZ-SÁNCHEZ; GÁLVEZ; UBERA, 2012). Durante o inverno as flores não foram visualizadas, período em que a produção de óleo e os teores de monoterpenóides oxigenados na composição foram afetados, demonstrando ser a estação mais desfavorável para coleta. Entretanto, durante esta estação foram detectados os maiores teores de sesquiterpenóides, sugerindo que este fato pode estar relacionado com a defesa que esta classe proporciona contra o ataque de fungos, que podem ocorrer devido às baixas temperaturas e umidade elevada, visto que o sesquiterpenóides possuem atividade antifúngica descrita na literatura (ZANARDI et al., 2012). As variações entre as concentrações de mono e sesquiterpenóides durante as estações do ano também podem estar relacionadas às condições climáticas da região, uma vez que a literatura apresenta relatos que indicam essa influência (BARROS, et al., 2009).

O fato de o verão ser uma das estações a apresentar rendimentos mais elevados de OE e ao mesmo tempo apresentar um dos maiores teores de monoterpenóides oxigenados é um indicativo de que esta estação é a mais propícia para a coleta do material vegetal visando à obtenção deste extrativo. Além disso, a

pulegona, presente em altas concentrações no óleo da espécie, possibilita que novos estudos sejam feitos almejando encontrar novas aplicações para esse OE, visto que o referido composto já possui efeitos biológicos descritos na literatura como acaricida, larvicida, inseticida e alelopático (BASBAGCI; ERLER, 2013; MUCCIARELLI et al., 2001, RIBEIRO et al., 2010; ROSSI; CANAVOSO; PALACIOS, 2012).

Conforme relatado no manuscrito 2, a influência da sazonalidade na composição química do OE e o uso de PCA como uma ferramenta para sua avaliação já foram relatados anteriormente em espécies da família Lamiaceae (FREIRE; MARQUES; COSTA, 2006; GAZIM et al., 2010). Por outro lado, a sazonalidade pode também influenciar a atividade do óleo, como foi detectado no OE de *Ocimum gratissimum* L. do quimiotipo eugenol, que apresentou maior concentração de sesquiterpenóides e maior efeito no sistema nervoso central quando o material vegetal foi coletado na primavera (FREIRE; MARQUES; COSTA, 2006).

Analisando-se individualmente os resultados de rendimento e composição química do OE foi possível observar variações, conforme descrito no Manuscrito 2. Esse acontecimento não é inesperado, posto que oscilações quantitativas e qualitativas no OE de indivíduos da mesma espécie já constam na literatura (FRACARO, 2006) e podem ser explicadas pela variabilidade genética intraespecífica existente em *H. ringens* (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006). Variações químicas e genéticas podem ser fundamentais, pois estão associadas à produção de metabólitos secundários, os quais são responsáveis pela adaptação da espécie no ambiente (FRACARO, 2006). Além da espécie estudada, variações intraespecíficas no OE de outras espécies de Lamiaceae também já foram relatadas na literatura (AGOSTINI et al., 2006; LAKUŠIĆ et al., 2013; LUKAS; SCHMIDERER; NOVAK, 2013; MUNÓZ-BERTOMEU; ARRILLAGA; SEGURA, 2007; TRINDADE et al., 2008).

O local de coleta das folhas da espécie é considerado campo rupestre, onde o terreno é arenoso possuindo elevações pedregosas. Atualmente, *H. ringens* se encontra na lista de espécies ameaçadas de extinção (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008), fato esse decorrente principalmente em consequência das formas de renovação de pastagens do local, como queimadas e limpeza de espécies consideradas invasoras dos campos para criação de gado. A coleta de material

vegetal para fins medicinais, influenciando negativamente a sua disponibilidade no ambiente e a baixa eficiência na propagação por sementes também são fatores que podem estar contribuindo para o risco de extinção dessa espécie (FRACARO,2006). Considerando a elevada produção de OE demonstrada pelo indivíduo 4 em todas as estações e os destacados teores de pulegona presentes no óleo deste mesmo indivíduo, acredita-se que este espécime seja o mais recomendado, dentre os avaliados, para servir como planta matriz para coleta de sementes e propágulos visando produção de mudas. Sabendo-se que poucas populações da espécie são conhecidas e reconhecendo o risco de extinção, novos estudos visando a propagação de *H. ringens* se fazem necessários.

Segundo Zaniboni Filho, a predação das larvas, pós-larvas e alevinos por ninfas de insetos da Ordem Odonata, também conhecidas popularmente por "libélulas ou lavadeiras" podem causar perdas consideráveis na piscicultura (2000, apud FONSECA et al., 2004). Visando a aquicultura sustentável fundamentada em práticas que respeitem o meio ambiente, pesquisas sobre produtos naturais para controle de pragas apresentam-se como caminhos a serem explorados (TOMAZELLI JUNIOR et al., 2011).

Em relação ao teste de atividade larvicida realizado, foi possível observar que o OE de *H. ringens* possui ação tóxica sobre as larvas da ordem Odonata, sobretudo na concentração mais elevada em avaliação. Este efeito pode ser consequência do alto teor de pulegona presente na sua composição química do óleo, uma vez que este composto já possui atividade larvicida relatada na literatura (MICHAELAKIS et al., 2011; RIBEIRO et al., 2010). Este resultado indica que o OE da espécie pode servir como um agente larvicida natural contra as fases iniciais de desenvolvimento de insetos da ordem Odonata, contudo, para tal definição ocorrer, novos estudos serão primordiais a fim de detectar a possível ação do OE sobre os alevinos das espécies de peixe que comumente são predados por larvas de Odonata, visto que o OE de *H. ringens* já possui efeito anestésico sobre jundiás descrito na literatura (SILVA et al., 2013). Além do OE da espécie em estudo, os óleos de outros representantes da família Lamiaceae já tiveram seus potenciais larvicidas descritos na literatura (CALCAVANTI et al., 2004; CONTI, et al., 2012; DELL'AGLI et al., 2012; EL-SHAZLY, HUSSEIN, 2004; ERLER; CETIN, 2009; FURTADO et al., 2005; KALAIVANI; SENTHIL-NATHAN; MURUGESAN, 2012; KUMAR et al., 2012). Foi encontrado na literatura apenas um relato de produto natural testado contra larvas

da ordem Odonata, onde o extrato alcoólico de *Melia azedarach* L. apresentou efeito tóxico sobre esta praga de alevinos (TOMAZELLI JUNIOR et al., 2011).

No Brasil, o bioma Pampa se restringe ao Rio Grande do Sul e ocupa 63% do território do estado (IBGE, 2004). Aspectos frequentemente encontrados neste bioma, como terrenos arenosos e com elevações rochosas (ROESCH et al., 2009), são características marcantes do local de coleta do material vegetal alvo do presente estudo. Este bioma ainda apresenta em sua vegetação espécies ameaçadas de extinção das famílias *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Cactaceae*, *Malvaceae*, *Moraceae*, *Myrtaceae* e *Lamiaceae*, ressaltando-se nessa última, *H. ringens*, espécie endêmica do Pampa gaúcho (FREITAS et al., 2010).

Fatores como o aumento das práticas agrícolas, a implementação de florestas cultivadas, a utilização flexível de leis ambientais, o sobrepastoreio e fogo sobre solos arenosos, seguidos de erosões e processos de arenização ameaçam o referido bioma, podendo tornar ainda mais alarmante a situação das espécies ameaçadas de extinção (FREITAS et al., 2010; ROESCH et al., 2009). Além disso, a perda da cobertura vegetal expõe o material arenoso à incidência dos agentes erosivos, favorecendo os processos de degradação (ROVEDDER, 2007). Outro aspecto prejudicial para *H. ringens* é a baixa variabilidade intrapopulacional (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006). A endogamia proporciona a homozigose, que acarreta o aumento na fixação de alelos deletérios, eleva o aborto de sementes e reduz a taxa de fecundação e germinação de sementes da espécie (FRACARO, 2006),

Com base nas informações sobre os perigos que circundam as espécies endêmicas do bioma Pampa, torna-se evidente a necessidade de elaboração de planos de conservação de germoplasma e reprodução de *H. ringens*, visando à retirada da mesma da lista de espécies ameaçadas de extinção. Fracaro (2006) sugere a criação de microreservas e áreas de conservação, com o monitoramento da variabilidade genética para evitar a perda de alelos importantes. Em resposta ao teste de micropropagação, além de *H. ringens* demonstrar limitações no enraizamento, com baixo número de plantas enraizadas, estas ainda apresentaram dificuldades de aclimação, em consequência da ineficiência do sistema radicular (FRACARO, 2006). O mesmo autor ainda menciona que as sementes da espécie apresentaram baixa germinação e que as estacas têm enraizamento limitado. Estes aspectos preocupantes demonstram que novas pesquisas ainda precisam ser

realizadas, objetivando alcançar alternativas para a sobrevivência de *H. ringens*.

As técnicas de cultura de tecidos possibilitam o cultivo asséptico de qualquer parte viva da planta constituída por frações de tecidos, órgãos ou células em suspensão em um meio de cultura sintético, visando à geração de novas plantas (LAMEIRA et al., 2000). Estudos de cultura de tecidos de outras espécies da família Lamiaceae podem ser encontrados na literatura (DODE, et al., 2003; FRANÇOISE et al., 2007; MAKUNGA; VAN STADEN, 2008; WANG; WU, 2010). Esta é uma alternativa a ser explorada visando à obtenção de OE, uma vez que, até o momento, a espécie apresentou dificuldades de multiplicação nos estudos realizados.

A vegetação é um fator primacial para a estabilidade do bioma Pampa e durante as estratégias de recuperação é importante considerar a conservação ou restauração deste elemento, principalmente em locais onde já foram detectados focos de degradação (ROVEDDER, 2007). Alternativas para a recuperação de solos degradados utilizando espécies nativas pode ser considerada uma estratégia para sua conservação. Na busca por conter processos de arenização e recuperação de áreas arenizadas no sudoeste do Rio Grande do Sul, o método de revegetação com as culturas de cobertura aveia-preta (*Avena strigosa* Schieb.) e um tremoço nativo do bioma Pampa (*Lupinus albescens* H. et Arn.) foi utilizado (ROVEDDER; ELTZ, 2008). Os autores constataram que os cultivos de aveia preta e aveia preta + tremoço apresentaram alta eficiência na redução do transporte de areia indicando a possibilidade de utilização de espécies nativas do bioma para conter a expansão de areais.

A investigação de OE de espécies nativas e a descoberta de finalidades para os mesmos é de importância estratégica, pois pode estimular a produção conciliada com a conservação das espécies em propriedades rurais, fornecendo assim, novas possibilidades de obtenção de renda para populações locais e a permanência de remanescentes e fragmentos vegetais nas propriedades. A biodiversidade é capaz de gerar inúmeros benefícios socioeconômicos devido ao seu potencial como matéria-prima para diversos fins, contudo, para que se possa explorar adequadamente este potencial, é primordial assegurar a manutenção e disponibilidade dos recursos no meio ambiente (FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006).

CONCLUSÕES

- Sobre sementes de dicotiledôneas, o óleo essencial das folhas frescas de *Hesperozygis ringens* na concentração de 5,00% inibiu completamente a germinação da planta daninha *Bidens pilosa*, sem afetar significativamente a germinação da bioindicadora de *Lactuca sativa* e da cultura *Glycine max*;
- Sobre sementes de monocotiledôneas, o óleo essencial de folhas frescas de *H. ringens* na concentração de 5,00% afetou significativamente a germinação da planta daninha *Lolium multiflorum* e inibiu completamente a germinação da bioindicadora *Avena strigosa*, sem afetar a germinação da cultura *Oryza sativa*;
- O rendimento do óleo essencial de folhas frescas de *H. ringens* demonstrou ser influenciado pela sazonalidade, sendo maior nas estações da primavera, verão e outono;
- O rendimento do óleo essencial de folhas frescas de *H. ringens* também apresentou variabilidade individual, sendo que, dos quatro indivíduos avaliados, foi maior nos indivíduos 1, 3 e 4;
- Os óleos essenciais de folhas dos indivíduos coletadas no outono, primavera e verão apresentaram composições químicas semelhantes;
- A composição química do óleo essencial das folhas frescas de *H. ringens* apresentou a pulegona como o constituinte majoritário e os monoterpenoides oxigenados como classe predominante em todas as estações, porém outono e verão forneceram os maiores teores de pulegona bem como da respectiva classe;
- Primavera, verão e outono demonstraram ser as estações mais favoráveis para a coleta do material vegetal visando a obtenção do OE de *H. ringens*,

com destaque para o verão por apresentar um dos maiores rendimentos e demonstrar os teores mais elevados de monoterpenoides oxigenados;

- O óleo essencial das folhas frescas de *H. ringens* apresentou uma CL_{50} de $69,05 \mu\text{L.L}^{-1}$ frente a larvas de Odonata.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.

AGOSTINI, G. et al. Essential oil variability within and among populations of *Cunila incisa* Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 802-808, 2006.

ALMEIDA, L. C.; AGUIAR, L. H.; MORAES, G. Effect of methyl parathion on the muscle and brain acetylcholinesterase activity of matrinxã (*Brycon cephalus*). **Ciência Rural**, v. 35, p. 1412-1416, 2005.

ANGELINI, L. G. et al. Essential oils from Mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6158-6164, 2003.

BARROS, F. M. C. et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

BASBAGCI, G., ERLER, F. Evaluation of some essential oils and their major components against mushroom scatopsid flies as fumigants. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 22, n. 11, p. 3170-3178, 2013.

BELTRAME, J. M. et al. Estudo de obtenção de óleos essenciais e fatores de influência em sua composição. In: II ENDICT- Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica. **Anais da...** Toledo. Universidade Federal do Paraná. p. 31-35. 2010. Disponível em: <<http://www.utfpr.edu.br/toledo/estrutura-universitaria/diretorias/dirppg/ii-endict-encontro-de-divulgacao-cientifica-e-ecnologica/copyofQBeltrameetal3135.pdf>> Acesso em 03 out. 2010.

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

BORGES, C. S. et al. Efeitos citotóxicos e alelopáticos de extratos aquosos de *Ricinus communis* utilizando diferentes bioindicadores. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 5, n. 3, p. 15-20, 2011.

BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae, em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BRITO, J. P.; OLIVEIRA, J. E. M.; BARTOLI, S. A. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, p. 96-103, 2006.

CANSIAN, R. L. et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rowher). **Revista Perspectiva**, Erechim. v. 34, n. 127, p. 123-133, 2010.

CASTELO, A. V. M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; RESCK, I. S. Rendimento e análises espectroscópicas (RMN H, C; IV) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do cerrado. **Revista Cerne**, v. 16, n. 4, p. 573-584, 2010.

CAVALCANTI, E. S. B. et al. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 541-544, 2004.

CHAGAS, A. C. S. et al. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

CONTI, B. et al. Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 2013-2021, 2012.

COSTA, J. M.; SOUZA, L. O. I.; OLDRINI, B. B. Chave para famílias e gêneros das larvas de Odonata citadas para o Brasil: comentários e registros bibliográficos. **Publicações Avulsas do Museu Nacional**, v. 99, p.1-44, 2004.

COUTINHO, F. B. C. et al. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

DELL'AGLI, M. et al. Anti-plasmodial and insecticidal activities of the essential oils of aromatic plants growing in the Mediterranean area. **Malaria Journal**, v. 11, p. 219, 2012.

DINIZ, A. C. B.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Botânica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 443-450, 2007.

DODE, L. B. et al. *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 435-437, 2003.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste, Mato Grosso – análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001.

EL-SHAZLY, A. M.; HUSSEIN, K. T. Chemical analysis and biological activities of the essential oil of *Teucrium leucocladum* Boiss. (Lamiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 665-674, 2004.

EL-WAKEIL, N. E. Botanical pesticides and their mode of action. **Gesunde Pflanzen**, v. 65, p. 125–149, 2013.

ERASMO, E. A. L.; PINHEIRO, L. L. A.; COSTA, N. V. Levantamento fitossociológico das comunidades de plantas infestantes em áreas de produção de arroz irrigado cultivado sob diferentes sistemas de manejo. **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p. 195-201, 2004.

ERLER, F.; CETIN, H. Components from the essential oils from two *Origanum* species as larvicides against *Euproctis chrysorrhoea* (Lepidoptera: Lymantriidae). **Journal of Agricultural Urban Entomology**, v. 26, n. 1, p. 31-40, 2009.

FAZOLIN, M. et al. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p.175-204, 2000.

- FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M.; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção**, v. 13, n. 3, p. 489-501, 2006.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis**. University Printing House, Cambridge. 1971.
- FLECK, N. G.; CANDEMIL, C.R.G. Interferência de plantas daninhas na cultura de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Ciência Rural**, v. 25, n. 1, p. 27-32, 1995.
- FONSECA, A. R. et al. Levantamento de espécies de Odonata associadas à tanques de piscicultura e efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre ninfas de *Pantala flavescens* (Fabricius, 1798) (Odonata: Libellulidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, p. 25–29, 2004.
- FRACARO, F. **Ecologia molecular, variabilidade genética, química e cultivo *in vitro* de *Hesperozygis ringens* Benth.** 2006. 89 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.
- FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S.; Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of southern Brazil. **Biochemical Genetics**, v.44, p. 479-490, 2006.
- FRANÇOISE, B. et al. Growth optimization of *Zataria multiflora* Boiss. tissue cultures and rosmarinic acid production improvement. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 19, p. 3395-3399, 2007.
- FREIRE, C. M. M.; MARQUES, M. O. M.; COSTA, M. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 161-166, 2006.
- FREITAS, E. M. et al. Floristic diversity in areas of sandy soil grasslands in southwestern Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 112-130, 2010.
- FURTADO, R. F. et al. Atividade larvívica de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p.843-847, 2005.
- GAZIM, Z. C. et al. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in southern Brazil. **Molecules**, v. 15, p. 5509-5524, 2010.

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

GONZÁLEZ, A. V.; LEAL, J. M. Predation potential of some aquatic insects (*Pantala*, *Coenagrion*, *Tropisternus*, *Notonecta* and *Sigara*) on common carp fry. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 5, p. 77-82, 1995.

GONZALES-CHAVEZ, M. M. et al. Fungicidal properties of the essential oil of *Hesperozygis marifolia* on *Aspergillus flavus* Link. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2501-2506, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Mapa de Biomas do Brasil, primeira aproximação**. Rio de Janeiro: IBGE. 2004. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em 02 de maio de 2012.

ISMANN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, p. 603–608, 2000.

ISMANN, M. B.; MACHIAL, C. M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. **Naturally Occuring Bioactive Compounds**, v. 3, p. 29–44, 2006.

JAKIEMIU, E. P. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 90 f., 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos)-Universidade Federal do Paraná, 2008.

KALAIVANI, K.; SENTHIL-NATHAN, S.; MURUGESAN, A. G.. Biological activity of selected Lamiaceae and Zingiberaceae plant essential oils against the dengue vector *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 1261-1268, 2012.

KEKEÇ, G. et al. Genotoxic effects of catmint (*Nepeta meyeri* Benth.) essential oils on some weed and crop plants. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 6, p. 504-513, 2013.

KOC, S. et al. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 316-319, 2013.

- KOVENDAN, K. et al. Studies on larvicidal and pupicidal activity of *Leucas aspera* Willd. (Lamiaceae) and bacterial insecticide, *Bacillus sphaericus*, against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston. (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 195-203, 2012.
- KUMAR, P. et al. Efficacy of *Mentha x piperita* and *Mentha citrata* essential oils against housefly, *Musca domestica* L. **Industrial Crops and Products**. v. 39, p. 106–112, 2012.
- LAKUŠIĆ, B. S. et al. Environmental and seasonal impacts on the chemical composition of *Satureja horvatii* Silic (Lamiaceae) essential oils. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 483-493, 2011.
- LAKUŠIĆ, B. S. et al. Variations in essential oil yields and compositions of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) at different developmental stages. **Botanica Serbica**, v. 37, n. 2, p. 127-139, 2013.
- LAMEIRA, O. A. et al. **Cultura de tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 66).
- LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.
- LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Fitos**, v. 3, p. 14-24, 2007.
- LINDMAN, C. A. M.; FERRY, M. G. **A vegetação no Rio Grande do Sul**. São Paulo, EDUSP/Livraria Itatiaia Editora LTDA., Belo Horizonte. 1974. 377 p.
- LOUARN, H. L.; CLOAREC, A. Insect predation on pike fry. **Journal of Fish Biology**. v. 50, p. 366–370, 1997.
- LUKAS, B.; SCHMIDERER, C.; NOVAK, J. Phytochemical diversity of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* (Lamiaceae) from Austria. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 106-113, 2013.
- MAKUNGA, N. P.; VAN STADEN, J. An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 63-72, 2008.

MARTINS, M. G. et al. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Ocimum selloi* and *Hesperozygis myrtooides*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 1027- 1030, 2011.

MICHAELAKIS, A. et al. Larvicidal evaluation of three *Mentha* species essential oils and their isolated major components against the West Nile virus mosquito. **Hellenic Plant Protection Journal**, v. 4, n. 2, p. 35-43, 2011.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Lista oficial das espécies ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul**. Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 2008. 55 p.

MORENO, J. A. **Clima do Rio Grande do Sul**. Secretaria da Agricultura. Porto Alegre. 1961. 41 p.

MUCCIARELLI, M. et al. Effect of (+)- pulegone and other oil components of *Mentha x piperita* on cucumber respiration. **Phytochemistry**, v. 57, p. 91-98, 2001.

MUNÓZ-BERTOMEU, J.; ARRILLAGA, I.; SEGURA, J. Essential oil variation within and among natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 479-488, 2007.

NIST/ EPA/ NIH mass spectral library and search/ analysis programs. Hoboken, NJ: J. Wiley and Sons, 2005.

PÉREZ-SÁNCHEZ, R.; GÁLVEZ, C.; UBERA, J. L. Bioclimatic influence on essential oil composition in South Iberian Peninsular populations of *Thymus zygis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 1, p. 71-81, 2012.

PINTO JUNIOR, A. R. et al. Bioatividade de óleos essenciais de sassafrás e eucalipto em cascudinho. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 637-343, 2010.

RAMBO, B. **A Fisionomia do Rio Grande do Sul**. 3. ed. Editora Unisinos. 1994. 473 p.

RIBEIRO, V. L. S. et al. Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2506-2509, 2010.

RODRIGUES, A. C. et al. Efeito alelopático de folhas de bamburral [*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.] sobre a germinação de sementes de sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.), rabanete (*Raphanus sativus* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 3, p. 487-493, 2012.

ROESCH, L. F. W. et al. The Brazilian Pampa: a fragile biome. **Diversity**, v.2, p.182-198, 2009.

ROSSI, Y. E.; CANAVOSO, L.; PALACIOS, S. M. Molecular response of *Musca domestica* L. to *Mintostachys verticillata* essential oil, (4R)(+)-pulegone and menthone. **Fitoterapia**, v. 83, p. 336–342, 2012.

ROVEDDER, A. P. M. **Potencial do *Lupinus albescens* Hook. & Arn. para recuperação de solos arenizados do Bioma Pampa**. 2007. 126 f. Tese (doutorado em Ciência do Solo) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria., 2007.

ROVEDDER, A. P. M.; ELTZ, F. L. F. Revegetação com plantas de cobertura em solos arenizados sob erosão eólica no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 1, 2008.

SANTOS, G.K.N. et al. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 254-260, 2012.

SANTOS R. I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**, p.403-434. 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. 5 ed. Editora da UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis, 2003.

SCHWAB, W.; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; LEWINSOHN, E. Biosynthesis of plant-derived of flavor compounds. **The Plant Journal**, v. 54, p. 712-732, 2008.

SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais-Potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SILVA, L. L. et al. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v.11, n. 2, p. 443-451, 2013.

SILVA L. L. et al. Essential oil of *Ocimum gratissimum* L.: anesthetic effects, mechanism of action and tolerance in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 350-353, p. 91-97, 2012.

SINGH, G.; UPADHYAY, R. K. Essential oils-a potent source of natural pesticides. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 52, p. 676-683, 1993.

SOARES, C. M.; HAYASHI, C.; REIDEL, A. Predação de pós-larvas de curimba (*Prochilodus lineatus*, Valenciennes, 1836) por larvas de Odonata (*Pantala*, Fabricius, 1798) em diferentes tamanhos. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 25 p. 95–100, 2003.

SOUZA, T. J. T. **Determinação da composição química e avaliação preliminar das atividades antioxidante e anticolinesterásica dos óleos voláteis de espécies de Eupatorium L. (Asteraceae)**. 2007. 225f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SOUZA FILHO, A. P. S.; et al. Atividade potencialmente alelopática do óleo essencial de *Ocimum americanum*. **Planta Daninha**, v. 27, p. 499-505, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 4ª Ed., 2009, p. 848.

TOMAZELLI JÚNIVOR, R. et al. Efeito do extrato de *Melia azedarach* L. sobre a predação de alevinos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) por larvas de *Neuraeschna* (Odonata: Aeshnidae). **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 19-25, 2011.

TRINDADE, H. et al. Genetic diversity and chemical polymorphism of *Thymus caespititius* from Pico, São Jorge and Terceira islands (Azores). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 790-797, 2008.

VITTI, A. M. S; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos florestais**, v. 17, 2003.

VON POSER, G. L. et al. Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian Lamiaceae *Hesperozygis ringens* (BENTH.) Eplig and *Hesperozygis rhododon* Eplig. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, n. 7, p.1829-1832, 1996.

WANG, J. W.; WU, J. Y. Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue cultures. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 88, p. 437–449, 2010.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. Mas afinal, o que são Óleos Essenciais? **Informativo CRQ-V**, v. 11, n. 105, p. 6-7, 2007.

ZANARDI, L. M. et al. Sesquiterpenos produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis cassiae* com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2233-2236, 2012.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Chemical composition of the essential oils from leaves of four specimens of *Hesperogyzis ringens* obtained in autumn.

Compound	Max RI ^a	Min RI ^b	RI References ^{c,d}	Specimen EO (%)				Classes
				1	2	3	4	
NI ^e	843	843	-	0.28	0.29	0.26	0.27	-
α -Pinene	932	932	930	0.32	0.33	0.35	0.44	MH ^f
Camphene	947	947	953	0.21	0.20	0.14	0.12	MH
Sabinene	972	972	970	-	0.23	0.26	0.26	MH
β -Pinene	974	975	968	0.22	0.35	0.37	0.45	MH
1-Octen-3-ol	975	975	976	0.33	-	-	-	HH ^g
β -Myrcene	989	990	988	0.20	0.22	0.25	0.31	MH
Limonene	1028	1028	1022	1.82	1.72	1.10	1.97	MH
Eucalyptol	1030	1030	1030	0.25	0.22	0.27	0.26	MH
β - <i>E</i> -ocimene	1048	1048	1035	0.78	-	-	-	MH
β - <i>Z</i> -ocimene	1048	1051	1047	1.84	0.78	0.75	0.72	MH
Linalool	1100	1100	1100	-	1.84	1.53	2.31	OM ^h
Octen-1-ol acetate	1111	1112	1106	0.14	-	-	-	OM
<i>p</i> -Mentha-1.3.8-triene	1117	1117	1113	0.14	0.14	0.12	0.12	MH
NI	1139	1139	-	-	-	-	0.12	-
Isopulegol	1165	1166	1165	1.22	1.18	0.84	0.63	OM
Isomenthone	1165	1166	1165	-	-	-	0.83	OM
Isopulegone	1177	1178	1177	1.60	1.57	1.50	1.44	OM
α -Terpineol	1191	1201	1197	0.30	0.10	0.63	0.26	OM
Verbenone	1202	1215	1207	0.40	0.32	0.32	0.29	OM
NI	1211	1217	-	-	0.23	0.33	0.47	-
NI	1217	1217	-	-	0.45	0.50	-	-
NI	1221	1221	-	0.75	0.78	0.75	0.78	-
Pulegone	1255	1255	1244	82.01	81.00	80.90	80.77	OM
NI	1268	1269	-	0.12	0.12	0.13	0.12	-
NI	1288	1288	-	0.69	0.71	0.67	0.63	-
NI	1293	1294	-	1.30	1.32	1.32	1.31	-
NI	1307	1307	-	-	0.10	0.36	-	-
δ -Elemene	1340	1341	1344	0.20	0.22	0.29	0.22	SH ⁱ
Eucarvone	1344	1344	1343	0.16	0.17	0.21	0.21	OM
α -Terpineol acetate	1350	1351	1351	0.24	0.25	0.25	0.29	SH
NI	1353	1353	-	0.20	0.20	0.20	0.19	-
NI	1369	1369	-	0.11	0.12	0.13	0.11	-
NI	1389	1389	-	0.30	0.30	0.29	-	-
Phenyl ethyl isobutanoate	1389	1391	1394	0.10	0.10	0.11	0.27	P ^j

Apêndice 1, cont.

NI	1396	1396	-	-	-	-	0.12	-
NI	1407	1408	-	1.07	0.93	0.78	0.64	-
β -Caryophyllene	1424	1425	1418	0.86	0.91	1.15	0.83	HS
α -Caryophyllene	1430	1430	1438	0.17	0.17	0.17	0.15	HS
NI	1433	1433	-	0.16	0.15	0.16	0.15	-
NI	1457	1458	-	-	0.11	0.13	0.11	-
NI	1472	1472	-	-	-	0.18	-	-
Germacrene D	1481	1481	1477	0.12	0.14	0.19	0.16	HS
Elixene	1498	1498	1492	0.32	0.31	0.25	0.25	HS
Bicyclogermacrene	1500	1500	1500	0.26	0.28	0.34	0.29	HS
NI	1524	1528	-	-	0.18	0.44	0.22	-
NI	1558	1558	-	-	-	0.13	-	-
Spathulenol	1583	1584	1578	0.25	0.32	0.39	0.43	OS ^l
Caryophyllene oxide	1587	1589	1581	0.38	0.10	0.12	0.60	OS
Viridiflorol	1590	1590	1590	-	0.47	0.61	-	OS
NI	1598	1598	-	-	0.10	0.12	0.12	-
Aromadendrene epoxide<allo->	1643	1643	1641	-	0.10	0.10	0.11	OS
Identified components				94.97	93.081	94.4	91.20	

^aMax RI= Maximum retention index value; ^bMin RI= Minimum retention index value; References: ^cAdams; ^dNIST. ^eNI= Non-identified; fMH= Monoterpene hydrocarbon; ^gHH=Hydroxilated hydrocarbon; ^hOM= Oxygenated monoterpenoid; ⁱSH= Sesquiterpene hydrocarbon; ^jP= Phenylpropanoid; ^lOxygenated sesquiterpenoid.

Apêndice 2 – Chemical composition of the essential oils from leaves of four specimens of *Hesperogyzis ringens* obtained in winter.

Compound	Max RI ^a	Min RI ^b	RI Literature ^{c,d}	Specimen EO (%)				Classes
				1	2	3	4	
NI ^e	838	855	-	0.10	0.67	0.10	0.10	-
α -Pinene	931	932	930	1.34	-	0.74	1.03	MH ^f
Camphene	946	947	953	0.34	0.18	0.13	0.15	MH
Sabinene	970	972	970	0.42	-	0.35	0.10	MH
β -Pinene	973	974	968	1.13	-	0.79	0.94	MH
β -Myrcene	988	989	988	1.31	-	1.11	1.14	MH
Limonene	1026	1028	1026	4.12	0.25	2.64	4.41	MH
β -Z-ocimene	1048	1048	1047	-	1.42	-	-	MH
Eucalyptol	1028	1030	1037	1.29	-	1.56	-	MH
NI	1090	1090	-	-	0.13	-	-	-
Linalool	1098	1099	1100	2.18	2.41	1.92	1.68	OM ^g
Octen-3-yl acetate <1->	1113	1117	1113	0.74	0.39	0.23	0.19	HH ^h
NI	1119	1119	-	-	0.19	-	-	-

Apêndice 2, cont.

<i>p</i> -Menthone	1129	1129	1129	-	0.12	-	-	MH
NI	1133	1133	-	-	0.17	-	-	-
NI	1136	1136	-	-	0.16	-	-	-
NI	1146	1146	-	-	0.16	-	-	-
Isopulegol	1163	1165	1156	3.33	1.40	2.97	3.35	OM
Isopulegone	1175	1177	1177	4.91	1.52	6.60	6.29	OM
α -Terpineol	1192	1199	1197	0.24	0.60	1.01	0.28	OM
NI	1195	1195	-	-	0.31	-	-	-
Verbenone	1210	1213	1205	1.57	1.53	5.68	3.51	OM
2,6-Dimethyl- 3,5,7-octatriene-2- ol. . <i>E.E.</i>	1216	1216	1209	-	0.75	-	-	OM
NI	1213	1216	-	0.78	-	0.12	0.32	-
NI	1215	1221	-	1.58	1.45	1.78	1.06	-
NI	1226	1229	-	0.10	0.10	0.10	0.10	-
NI	1234	1233	-	-	0.12	-	-	-
Pulegone	1249	1254	1244	59.35	68.12	45.11	43.13	OM
NI	1266	1269	-	-	0.26	0.10	0.13	-
NI	1278	1280	-	0.10	0.25	-	-	-
NI	1284	1287	-	0.15	1.53	0.10	0.10	-
NI	1287	1292	-	0.32	2.82	0.10	0.10	-
NI	1306	1306	-	-	0.25	-	-	-
δ - Elemene	1339	1341	1344	0.29	0.12	0.50	0.52	SH ⁱ
Eucarvone	1344	1347	1343	0.72	0.28	0.99	0.97	OM
α -Terpineol acetate	1349	1355	1351	0.16	0.45	0.10	0.12	SH
NI	1352	1353	-	-	0.46	-	-	-
NI	1369	1369	-	-	0.30	-	-	-
NI	1361	1370	-	0.10	0.11	0.10	0.10	-
NI	1381	1383	-	0.13	0.16	0.10	0.12	-
NI	1388	1398	-	0.10	0.64	0.12	0.10	-
Phenyl ethyl isobutanoate	1390	1395	1394	0.10	0.22	0.10	0.19	P ^j
NI	1396	1396	-	-	0.25	-	-	-
NI	1401	1407	-	1.17	1.28	0.99	0.57	-
β -Caryophyllene	1419	1424	1418	1.15	0.64	1.23	1.38	HS
NI	1424	1427	-	0.10	0.11	0.10	0.10	-
α -Caryophyllene	1429	1430	1438	0.10	0.39	0.10	-	HS
Aromadendrene	1432	1432	1440	-	0.30	-	-	HS
NI	1438	1438	-	-	0.15	-	-	-
NI	1445	1448	-	0.57	0.14	0.54	0.71	-
NI	1453	1457	-	0.18	0.13	0.25	0.29	-
Germacrene D	1481	1498	1489	2.46	0.67	5.24	5.00	HS
Elixene	1495	1499	1492	5.44	0.29	13.37	15.38	HS
NI	1515	1525	-	0.18	0.33	0.10	0.18	-
NI	1527	1533	-	0.10	0.20	0.10	0.10	-

Apêndice 2, cont.

NI	1553	1558	-	0.10	0.30	0.10	0.31	-
NI	1559	1566	-	0.10	-	0.10	0.10	-
Ledol	1584	1584	1588	-	1.26	-	-	OS ^l
Spathulenol	1578	1587	1582	0.44	0.56	0.46	0.71	OS
Caryophyllene oxide	1581	1590	1581	0.29	2.02	0.28	0.46	OS
Viridiflorol	1589	1598	1590	-	0.27	-	0.72	OS
NI	1616	1616	-	0.37	0.20	0.42	-	-
Aromadendrene epoxide<allo->	1637	1644	1541	0.26	0.33	0.47	0.49	OS
NI	1660	1665	-	0.15	-	0.16	0.41	-
Identified components				93.61	87.06	93.68	95.62	

^aMax RI= Maximum retention index value; ^bMin RI= Minimum retention index value; References: ^cAdams; ^dNIST. ^eNI= Non-identified; ^fMH= Monoterpene hydrocarbon; ^gOM= Oxygenated monoterpene; ^hHH=Hydroxylated hydrocarbon; ⁱSH= Sesquiterpene hydrocarbon; ^jP= Phenylpropanoid; ^lOxygenated sesquiterpenoid.

Apêndice 3 – Chemical composition of the essential oils from leaves of four specimens of *Hesperogyis ringens* obtained in spring.

Compound	Max RI ^a	Min RI ^b	RI Literature ^{c,d}	Specimen EO (%)				Classes
				1	2	3	4	
NI ^e	843	843	-	0.35	0.29	0.29	0.31	-
α -Pinene	932	932	930	0.50	0.38	0.40	0.48	MH ^f
Camphene	947	947	953	0.20	0.17	0.16	0.11	MH
Sabinene	972	972	970	0.30	0.26	0.29	0.30	MH
β -Pinene	975	975	968	0.49	-	0.42	0.51	MH
β -Myrcene	990	990	988	0.47	0.40	0.40	0.41	MH
Limonene	1028	1028	1022	2.71	2.21	2.19	2.37	MH
β -Z-ocimene	1048	1048	1041	0.88	0.66	0.69	0.59	MH
Linalool	1100	1100	1099	1.53	1.64	1.42	1.98	OM ^g
<i>p</i> -Mentha-1.3.8-triene	1117	1118	1113	0.24	0.16	-	0.15	MH
NI	1130	1130	-	0.10	-	-	-	-
NI	1133	1133	-	0.10	0.10	-	0.10	-
Isopulegol	1165	1166	1165	2.00	1.74	1.55	1.29	OM
Isopulegone	1178	1178	1177	1.74	1.56	1.52	1.49	OM
NI	1191	1191	-	0.17	0.27	0.21	0.11	-
α -Terpineol	1196	1199	1197	0.29	0.33	0.36	0.35	OM
Verbenone	1212	1212	1207	0.40	0.41	0.38	0.26	OM
NI	1213	1215	-	0.41	0.45	0.39	0.40	-
NI	1217	1219	-	0.82	0.61	0.49	0.24	-
NI	1221	1221	-	0.82	0.72	0.77	0.78	-
NI	1230	1230	-	-	0.10	-	-	-
Pulegone	1251	1253	1244	77.19	75.03	76.52	78.88	OM

Apêndice 3, cont.

NI	1267	1268	-	0.16	0.16	0.14	0.12	-
NI	1280	1280	-	0.15	-	0.11	-	-
NI	1286	1288	-	0.73	0.64	0.70	0.71	-
NI	1292	1293	-	1.49	1.34	1.41	1.28	-
NI	1306	1306	-	-	0.11	0.11	0.39	-
δ- Elemene	1344	1344	1344	0.16	0.19	0.22	0.24	SH ^h
Eucarvone	1350	1350	1343	0.21	0.29	0.32	0.31	OM
α-Terpineol acetate	1353	1353	1351	0.20	0.27	0.28	0.35	SH
NI	1369	1369	-	0.18	0.19	0.17	0.14	-
NI	1388	1388	-	0.29	0.26	0.28	0.31	-
Phenyl ethyl isobutanoate	1390	1390	1394	0.13	0.13	0.13	0.12	P ⁱ
NI	1369	1369	-	-	-	-	0.14	-
NI	1406	1407	-	0.51	0.32	0.47	0.39	-
β-Caryophyllene	1424	1425	1418	0.75	1.09	1.07	0.88	SH
α-Caryophyllene	1430	1430	1438	0.17	0.16	0.17	0.19	SH
NI	1432	1433	1440	0.20	0.88	0.19	0.17	-
NI	1468	1473	-	0.10	0.87	0.34	0.22	-
Germacrene D	1498	1498	1496	0.39	0.45	0.44	0.33	SH
Elixene	1500	1500	1492	0.24	0.28	0.37	0.35	SH
NI	1522	1534	-	0.16	-	0.13	-	-
NI	1562	1562	-	-	0.88	-	-	-
NI	1567	1567	-	-	0.87	-	-	-
Spathulenol	1574	1584	1578	0.61	0.20	1.06	0.79	OS ^j
Caryophyllene oxide	1587	1587	1581	0.22	-	-	0.17	OS
Viridiflorol	1590	1590	1590	0.88	-	1.09	0.83	OS
Aromadendrene epoxide<allo->	1643	1644	1641	0.20	0.75	0.51	0.27	OS
NI	1658	1659	-	-	0.37	0.30	-	-
NI	1661	1662	-	-	0.55	0.48	-	-
NI	1676	1676	-	-	0.15	-	-	-
NI	1724	1724	-	-	0.16	-	-	-
NI	1759	1759	-	-	0.24	-	-	-
NI	1813	1814	-	-	1.49	0.84	-	-
NI	1825	1825	-	-	0.36	-	-	-
Identified components				93.41	88.81	92.08	94.09	

^aMax RI= Maximum retention index value; ^bMin RI= Minimum retention index value; References: ^cAdams; ^dNIST. ^eNI= Non-identified; ^fMH= Monoterpene hydrocarbon; ^gOM= Oxygenated monoterpene; ^hSH= Sesquiterpene Hydrocarbon; ⁱP= Phenylpropanoid; ^jOxygenated sesquiterpenoid.

Apêndice 4 – Chemical composition of the essential oils from leaves of four specimens of *Hesperogyzis ringens* obtained in summer.

Compound	Max RI ^a	Min RI ^b	RI Literature ^{c,d}	Specimen EO (%)				Classes
				1	2	3	4	
NI ^e	843	850	-	0.12	0.19	0.27	0.16	-
α -Pinene	931	932	930	0.62	-	0.72	0.71	MH ^f
Camphene	946	947	953	0.11	0.23	0.18	-	MH
Sabinene	971	972	970	0.36	-	0.30	0.30	MH
β -Pinene	974	975	968	0.67	-	0.58	0.66	MH
1-Octen-3-ol	978	978	976	0.10	-	-	-	HH ^g
β -Myrcene	989	990	988	0.63	0.29	0.70	0.69	MH
NI	1002	1002	-	-	0.11	0.13	-	-
NI	1022	1023	-	-	-	0.15	0.11	-
Limonene	1027	1030	1022	3.44	0.50	3.73	3.59	MH
Eucalyptol	1029	1031	1030	-	0.18	0.43	0.16	MH
β -Z-ocimene	1047	1048	1041	0.46	1.00	0.82	0.55	MH
NI	1087	1088	-	-	0.15	0.16	0.12	-
Linalool	1099	1100	1099	1.22	1.69	1.08	1.26	OM ^h
<i>p</i> -Mentha-1.3.8-triene	1116	1117	1113	-	0.31	0.27	0.14	MH
NI	1129	1129	-	-	-	0.13	0.14	-
NI	1144	1145	-	-	0.19	0.20	-	-
NI	1154	1154	-	-	-	0.21	-	-
Isopulegol	1164	1167	1156	0.71	2.09	2.04	1.50	OM
Isopulegone	1177	1179	1177	1.62	2.40	2.77	2.17	OM
α -Terpineol	1196	1199	1197	-	0.37	0.24	-	OM
NI	1207	1207	-	0.29	-	-	-	-
Verbenone	1211	1214	1207	0.16	1.40	1.04	0.48	OM
NI	1215	1215	-	-	1.22	0.85	-	-
NI	1219	1219	-	-	0.55	0.51	-	-
NI	1221	1224	-	0.53	-	0.45	1.02	-
Pulegone	1248	1252	1244	83.91	75.24	75.40	81.52	OM
NI	1266	1266	-	-	-	0.12	-	-
NI	1279	1279	-	-	0.24	0.20	-	-
NI	1285	1291	-	0.24	0.51	0.47	0.27	-
NI	1291	1296	-	0.52	1.45	1.23	0.68	-
NI	1339	1339	-	-	0.20	0.12	-	-
δ -Elemene	1341	1343	1344	0.21	0.36	0.19	0.15	SH ⁱ
Eucarvone	1345	1349	1343	0.13	0.20	0.15	0.18	OM
α -Terpineol acetate	1351	1351	1351	0.12	0.20	0.14	0.13	SH
NI	1367	1368	-	-	0.21	0.16	-	-
NI	1386	1386	-	-	0.18	-	-	-
Phenyl ethyl isobutanoate	1386	1389	1390	0.11	-	0.17	0.10	P ^j
NI	1405	1408	-	0.54	0.39	0.20	0.25	-
β -Caryophyllene	1423	1426	1418	1.23	2.18	0.64	0.77	SH

Apêndice 4, cont.

α -Caryophyllene	1428	1431	1438	-	0.23	0.10	-	SH
NI	1431	1442	-	-	0.25	0.16	-	-
NI	1457	1458	-	0.11	0.43	0.20	0.13	-
NI	1480	1481	-	0.14	-	-	0.11	-
Germacrene D	1496	1498	1495	0.12	-	0.47	0.28	SH
Elixene	1497	1500	1492	0.19	0.72	0.28	0.23	SH
Bicyclogermacrene	1499	1499	-	-	0.46	-	-	SH
NI	1523	1525	-	-	0.22	0.11	0.11	-
NI	1532	1532	-	-	-	0.16	-	-
NI	1584	1584	-	-	-	-	0.35	-
NI	1556	1556	-	-	-	0.12	-	-
Spathulenol	1582	1584	1578	0.35	1.09	0.40	0.14	OS ^l
Caryophyllene oxide	1585	1590	1581	0.49	0.45	0.29	0.19	OS
NI	1588	1588	-	-	0.46	0.19	-	-
NI	1626	1628	-	0.14	0.31	-	0.20	-
Aromadendrene epoxide<allo->	1641	1643	1641	0.13	0.74	0.16	0.16	OS
NI	1661	1662	-	0.13	0.26	0.13	0.15	-
Identified components					97.09	92.89	93.40	96.14

^aMax RI= Maximum retention index value; ^b Min RI= Minimum retention index value; References: ^cAdams; ^dNIST. ^eNI= Non-identified; ^fMH= Monoterpene hydrocarbon; ^gHH=Hydroxilated hydrocarbon; ^hOM= Oxygenated monoterpene; ⁱSH= Sesquiterpene hydrocarbon; ^jP= Phenylpropanoid; ^lOxygenated sesquiterpenoid.

Apêndice 5 – ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hesperozygis ringens* (Benth.) SOBRE LARVAS DE COENAGRIONIDAE (ODONATA). resumo apresentado na XIX Jornadas de Jovens Pesquisadores da Associação de Universidades Grupo Montevidéu/AUGM – 2013.

ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *HESPEROZYGIS RINGENS* (BENTH.) SOBRE LARVAS DE COENAGRIONIDAE (ODONATA).

CARLOS GARRIDO PINHEIRO¹
 CÉSARE MATTIODA MACHADO²
 DANIELA THOMAS DA SILVA³
 LENISE DE LIMA SILVA⁴
 LÚCIO DE PAULA AMARAL⁵
 MATEUS MARQUES PIRES⁶
 BERNARDO BALDISSEROTTO⁷
 SOLON JONAS LONGHI⁸
 CARLA BENDER KOTZIAN⁹
 BERTA MARIA HEINZMANN¹⁰

Universidade Federal de Santa Maria.
 Centro de Ciências Rurais.
 Santa Maria - Brasil.

carlosgp07@yahoo.com.br¹ - cesaremmachado@hotmail.com² - dthomasdasilva@gmail.com³ - ls.lenise@gmail.com⁴ - lpamaralengflorestal@gmail.com⁵ - mateusmpires@hotmail.com⁶ - bbaldisserotto@hotmail.com⁷ - longhi.solon@gmail.com⁸ - modrizalok@hotmail.com⁹ - berta.heinzmann@gmail.com¹⁰.

Fatores como doenças e predadores podem afetar populações de peixes durante seus estágios iniciais de vida, causando uma série de prejuízos econômicos aos piscicultores, podendo até inviabilizar investimentos. Dentre esses problemas, destaca-se a predação das larvas, pós-larvas e alevinos por ninfas de insetos da Ordem Odonata, também conhecidas popularmente por "libélulas ou lavadeiras". O Brasil possui uma grande diversidade de espécies vegetais capazes de fornecer produtos não-madeireiros como óleos essenciais. A família Lamiaceae se destaca por apresentar espécies produtoras de óleos essenciais, capazes de proporcionar diversos estudos com seus óleos, visando testar diferentes atividades, como a larvicida. Dentre as espécies pertencentes à Lamiaceae, merece destaque *Hesperozygis ringens* BENTH. A espécie é conhecida popularmente como "espanta-pulga", sendo muito utilizada como inseticida natural, por produzir um óleo essencial rico em pulegona. O trabalho teve como objetivo analisar a composição química do óleo essencial (OE) de *Hesperozygis ringens* e avaliar sua atividade frente a larvas de libélulas de Coenagrionidae, responsáveis por perdas na piscicultura. Ramos aleatórios de *H. ringens* foram coletadas de diversos indivíduos, em São Francisco de Assis, RS, em abril de 2011, e o óleo essencial foi extraído por hidrodestilação por 2 h, em triplicata. O óleo foi armazenado em frasco âmbar em temperatura de -4 °C até que a análise química e o teste biológico ocorressem. O rendimento m/m (%) do óleo foi calculado. Também foi realizada análise de composição química do óleo por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM). Nos testes biológicos, foram utilizadas larvas de Coenagrionidae coletadas em tanques de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria. Os espécimes foram coletados com redes entomológicas e acondicionados em sacos plásticos contendo água do mesmo lago. Após os experimentos, as larvas foram armazenadas em etanol (70%) para que ocorresse a identificação. Para avaliar a atividade larvicida do óleo essencial contra Coenagrionidae, foram testadas diferentes concentrações (10, 50, 75 e 100 µL.L⁻¹) para determinar a relação de concentração- resposta. Os

experimentos foram realizados em aquários de capacidade de 1 litro, contendo cinco larvas de *Coenagrionidae* e 0.5 L de água. As amostras de óleo foram diluídas em etanol 95% (1:5), antes da adição de água. Controles de água e etanol também foram avaliados. Cada tratamento foi avaliado em triplicata, com cinco larvas por aquário, selecionadas de acordo com a semelhança morfológica, porém de tamanhos heterogêneos, visando simulação de condições encontradas em viveiros de aquicultura. Após o início dos tratamentos, as larvas mortas e vivas foram contabilizadas em diferentes tempos, sendo a última contagem realizada a 19 horas após o início do experimento. O valor da concentração letal 50% (CL_{50}) e o intervalo de confiança 95% para o teste larvicida foram calculados por análise Probit. Foram consideradas diferenças significativas a níveis de $p < 0.05$ utilizando SPSS. Os valores referentes a ocorrência de predação entre larvas foram descontados dos resultados de mortalidade antes da submissão à análise estatística. A identificação das larvas ocorreu até o nível de gênero, sendo identificados os tipos *Acanthagrion*, *Homeoura*, *Ischnura* e *Oxyagrion*. O óleo essencial de *H. ringens* apresentou rendimento de 2.94% e 99.07% de sua composição química foi identificada. Onze componentes foram identificados, destacando-se como compostos majoritários a pulegona (95.18%) e limoneno (1.28%). Os controles de água e etanol não apresentaram mortalidade de larvas ao longo das 19 horas de experimento. A concentração mais elevada ($100 \mu\text{L L}^{-1}$) apresentou a primeira contagem de larvas mortas há 1 hora após a aplicação da solução, apresentando 20% de mortalidade, enquanto que a última contagem ocorreu 19 horas após a aplicação, apresentando 86.67%. Para a concentração de $75 \mu\text{L L}^{-1}$ a primeira contagem de larvas mortas ocorreu há 2 horas após o início dos testes, com 13.33% de mortalidade, enquanto que a última contagem (19 horas) apresentou 46.67%. As concentrações de 10, 50, 75 e $100 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram médias de mortalidade de 6.67; 26.67; 46.67 e 86.67%, respectivamente. A CL_{50} foi de $60.05 \mu\text{L L}^{-1}$, indicando que o óleo essencial de *H. ringens* apresenta potencial para ser utilizado no controle de larvas da ordem Odonata.

Palavras chave: larvas de libélulas; Lamiaceae; inseticida biológico.