

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA

Leandro Gonçalves Leite

**EFEITO ANTIPROLIFERATIVO, GERMINAÇÃO DE SEMENTES E
DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Hesperozygis ringens* (BENTH.)
EPLING (LAMIACEAE)**

Santa Maria, RS
2021

Leandro Gonçalves Leite

**EFEITO ANTIPROLIFERATIVO, GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DIVERSIDADE
GENÉTICA DE *Hesperozygis ringens* (BENTH.) EPLING (LAMIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agrobiologia**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Liliana Essi
Coorientadora: Dr^a. Ana Cristina Mazzocato

Santa Maria, RS
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Leite, Leandro

EFEITO ANTIPROLIFERATIVO, GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Hesperozygis ringens* (BENTH.) EPLING (LAMIACEAE) / Leandro Leite.- 2021.
82 p.; 30 cm

Orientadora: Liliana Essi

Coorientadora: Ana Cristina Mazzocato
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2021

1. Espécie ameaçada 2. Plantas aromáticas 3. Marcadores moleculares 4. Teste *Allium cepa* 5. Bioma pampa I. Essi, Liliana II. Mazzocato, Ana Cristina III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, LEANDRO LEITE, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Leandro Gonçalves Leite

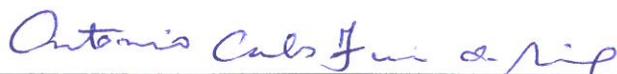
EFEITO ANTIPROLIFERATIVO, GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Hesperozygis ringens* (BENTH.) EPLING (LAMIACEAE)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agrobiologia**.

Aprovado em 10 de agosto de 2021:



Prof. Dr.ª Liliansa Essi (UFSM)
(Presidente / Orientadora)



Prof. Dr. Antonio Carlos Ferreira da Silva (UFSM)



Dr. Juliano Lino Ferreira (EMBRAPA)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por tudo e por mais uma oportunidade a mim concedida, em realizar este curso.

Em especial à minha mãe, Gleice Gonçalves, pela compreensão da minha ausência e pelo incentivo e apoio aos meus estudos.

À minha orientadora, Liliana Essi, pelas orientações durante todo o curso. Obrigado pela amizade, pela parceria nas coletas e por todos os ensinamentos no laboratório de genética.

À minha coorientadora, Ana Cristina Mazzocato, pelas orientações. Obrigado pela amizade e pelos ensinamentos na minha trajetória acadêmica desde a iniciação científica.

Aos meus colegas de laboratório, Maria, Letícia, Jean e Vitória, pelo convívio, pela troca de experiências e pelas descontrações.

À Raquel Stefanello, pela parceria e pela oportunidade de realizar trabalhos na área de sementes.

À professora Solange Tedesco, pelas orientações e por disponibilizar o laboratório de citogenética para a realização dos meus experimentos.

Às parcerias com laboratórios de outros departamentos da USFM. Agradeço à Nariane do PPG Ciência do Solo e ao Gustavo do LabMip.

Aos professores e colegas do PPG Agrobiologia, por todas as atividades realizadas durante o curso.

À Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino público, gratuito e de qualidade

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

EFEITO ANTIPROLIFERATIVO, GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Hesperozygis ringens* (BENTH.) EPLING (LAMIACEAE)

AUTOR: Leandro Gonçalves Leite

ORIENTADORA: Liliana Essi

COORIENTADORA: Ana Cristina Mazzocato

Hesperozygis ringens é uma espécie pertencente à *Lamiaceae*. Esta planta arbustiva é endêmica do Rio Grande do Sul e está localizada em áreas restritas de poucos municípios gaúchos. Popularmente conhecida como “espanta-pulga”, possui efeitos antiparasitários, anestésicos e alelopáticos em virtude dos compostos químicos dos óleos essenciais. Atualmente a espécie se encontra ameaçada de extinção e poucos são os estudos relacionados a sua conservação. Trabalhos realizados sobre os efeitos biológicos a torna uma planta promissora na elaboração produtos naturais para controle de parasitas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente e fisiologicamente *Hesperozygis ringens* como contribuição à conservação da espécie. Foram coletadas amostras dos municípios de Santa Maria, Caçapava do Sul, São Francisco de Assis e São Pedro do Sul. O teste *Allium cepa* foi utilizado para verificação da genotoxicidade de *H. ringens*. A diversidade genética foi analisada através de marcadores moleculares ISSR. As análises estatísticas foram realizadas nos softwares Sisvar, GenAlEx, Structure e PowerMarker. Os resultados apontaram que os extratos aquosos de *H. ringens* têm efeito antiproliferativo e não genotóxico sobre as raízes de *Allium cepa*. As populações apresentaram baixos índices de diversidade genética, porém configuram populações bem estruturadas geneticamente. As sementes de *H. ringens* obtiveram maiores taxas de germinação na presença de luz e na temperatura de 15 °C. São fundamentais, a busca de melhores estratégias de reprodução e a elaboração de planos de conservação da espécie e dos habitats.

Palavras-chave: Conservação. Espécie Ameaçada. Bioma Pampa. Óleos Essenciais. Genotoxicidade.

ABSTRACT

ANTIPROLIFERATIVE EFFECT, SEED GERMINATION AND GENETIC DIVERSITY OF *Hesperozygis ringens* (BENTH.) EPLING (LAMIACEAE)

AUTHOR: Leandro Gonçalves Leite
ADVISOR: Liliana Essi
CO-ADVISOR: Ana Cristina Mazzocato

Hesperozygis ringens is a species belonging to Lamiaceae. This shrub plant is endemic to the Rio Grande do Sul and is located in restricted areas of a few municipalities in the Rio Grande do Sul. Popularly known as "espanta-pulga", it has antiparasitic, anesthetic and allelopathic effects due to the chemical compounds of essential oils. Currently, the species is threatened with extinction and there are few studies related to its conservation. Studies carried out on the biological effects make a plant promising in elaborating natural products for parasite control. This work aimed to genetically and physiologically characterize *Hesperozygis ringens* to contribute to the conservation of the species. Samples were collected from the municipalities of Santa Maria, Caçapava do Sul, São Francisco de Assis and São Pedro do Sul. The *Allium cepa* test was used to verify the genotoxicity of *H. ringens*. The genetic diversity was analyzed using ISSR molecular markers. The statistical analyzes were performed using Sisvar, GenAlEx Structure and PowerMarker softwares. The results showed that the aqueous extracts of *H. ringens* has an antiproliferative and non-genotoxic effect on *Allium cepa* roots. The population presented lower genetic diversity indexes, however, they configure genetically well-structured groups. The seeds of *H. ringens* had higher germination rates in the presence of light and at a temperature of 15 °C. The search for better reproduction strategies and the preparation of conservation plans for the species and habitats are fundamental.

Keywords: Conservation. Endangered Species. Pampa Biome. Essential Oils. Genotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 -	Mapa de distribuição de <i>Hesperozygis ringens</i> . Os pontos de coleta marcados estão de acordo com os registros do <i>SpeciesLink</i>	18
Figura 1.2 -	<i>Hesperozygis ringens</i> . (A) Planta próxima as rochas em Caçapava do Sul; (B) abertura das flores de uma planta em São Pedro do Sul.....	20
Figura 2.1 -	Planta adulta (A) e sementes (B) de <i>Hesperozygis ringens</i>	32
Figura 2.2 -	Tempo médio em dias de germinação das sementes de <i>Hesperozygis ringens</i>	36
Figura 3.1 -	<i>Hesperozygis ringens</i> no seu habitat em solos pedregosos típicos da sua espécie (A,B).....	43
Figura 3.2 -	Infusões preparadas com as folhas secas de <i>H. ringens</i> . A numeração identifica os tratamentos do experimento conforme a Tabela 3.2: T5 – Tratamento 5; T6 – Tratamento 6; T7 – Tratamento 7; T8 – Tratamento 8; T9 – Tratamento 9; T10 – Tratamento 10; T3 – Tratamento 3; T4 – Tratamento 4.....	47
Figura 3.3 -	Análise mitótica em <i>Allium cepa</i> L.: (A) Células em divisão celular em T1: água. Destaque para metáfase e anáfase; (B) Células em interfase em T10: 8g.L ⁻¹ SP; e (C,D) Formação de pontes em T4: 8g.L ⁻¹ SM. Escala = 20 µm.....	51
Figura 4.1 -	<i>Hesperozygis ringens</i> em seu habitat: (A) morfologia de uma flor típica das lamiáceas; (B) espécie com hábito arbustivo.....	58
Figura 4.2 -	Mapa de distribuição das populações de <i>H. ringens</i> no Rio Grande do Sul.....	59
Figura 4.3 -	Padrões de bandas das quatro populações de <i>H. ringens</i> . h – Diversidade.....	64
Figura 4.4 -	(A) Teste de Mantel que mostra a correlação entre distância genética e distância geográfica e (B) UPGMA com informações sobre a co-ancestralidade das quatro populações de <i>H. ringens</i> . GD – Distancia genética; GDD – Distância geográfica; SM – Santa Maria; CP – Caçapava do Sul; SF – São Francisco de Assis e SP – São Pedro do Sul.....	65
Figura 4.5 -	Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das quatro populações de <i>H. ringens</i> . Populações: SM – Santa Maria. CP – Caçapava do Sul; SF – São Francisco de Assis e SP – São Pedro do Sul.....	66
Figura 4.6 -	Delta K (ΔK) para diferentes números estimados de populações (K).....	67
Figura 4.7 -	Gráfico de barras mostrando a estrutura genética das populações de <i>H. ringens</i> usando o método Bayesiano. Legenda: SM (1), CP(2), SF (3) e SP (4).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Germinação (%) de sementes de <i>Hesperozygis ringens</i> , submetidas a diferentes temperaturas na presença e ausência de luz, 21 dias após a semeadura.....	35
Tabela 2.2 - Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de <i>Hesperozygis ringens</i> , submetidas a diferentes temperaturas na presença e ausência de luz, 21 dias após a semeadura.....	38
Tabela 3.1 - Lista dos vouchers de <i>H. ringens</i> das populações utilizadas no estudo.....	46
Tabela 3.2 - Lista dos tratamentos do teste <i>Allium cepa</i>	46
Tabela 3.3 - O índice mitótico em cada um dos tratamentos e o número de células encontradas em cada fase do ciclo celular.....	49
Tabela 4.1 - Lista dos vouchers de <i>H. ringens</i> das populações utilizadas no estudo.....	61
Tabela 4.2 - Número de fragmentos obtidos através de marcadores moleculares ISSR em cada primer.....	63
Tabela 4.3 - Médias de índices de diversidade genética para os sete <i>primers</i> , obtidas pelo GenAEx.....	63
Tabela 4.4 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) das quatro populações inferidas de <i>H. ringens</i> produzido no GenAEx.....	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	OBJETIVOS.....	11
1.1.1	Objetivos Geral	11
1.1.2	Objetivos Específicos	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	LAMIACEAE.....	12
2.2	TESTE <i>Allium cepa</i>	13
2.3	MARCADORES MOLECULARES.....	14
3	CAPÍTULO 1: <i>Hesperozygis ringens</i> (Benth.) Epling (Lamiaceae): uma revisão	17
3.1	INTRODUÇÃO.....	18
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.3	COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	21
3.4	PROPRIEDADES ANTIPARASITÁRIAS.....	23
3.5	PROPRIEDADES ALELOPÁTICAS.....	24
3.6	PROPRIEDADES ANESTÉSICAS.....	25
3.7	CONCLUSÃO.....	26
3.8	REFERÊNCIAS.....	26
4	CAPÍTULO 2: Germinação de sementes de <i>Hesperozygis ringens</i> (Benth.) Epling (Lamiaceae) – uma espécie endêmica e ameaçada	31
4.1	INTRODUÇÃO.....	32
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.4	CONCLUSÃO.....	39
4.5	REFERÊNCIAS.....	39
5	CAPÍTULO 3: Efeito antiproliferativo de extratos aquosos de <i>Hesperozygis ringens</i> (Benth.) Epling (Lamiaceae) pelo teste <i>Allium cepa</i>	42
5.1	INTRODUÇÃO.....	43
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.4	CONCLUSÃO.....	52
5.5	REFERÊNCIAS.....	52
6	CAPÍTULO 4: Diversidade genética de <i>Hesperozygis ringens</i> (Benth.) Epling (Lamiaceae): situação atual em populações naturais do Rio Grande do Sul, Brasil	56
6.1	INTRODUÇÃO.....	57
6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	61
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
6.4	CONCLUSÃO.....	70
6.5	REFERÊNCIAS.....	70
7	DISCUSSÃO	74
8	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	78

INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um país com ampla biodiversidade. Somente no território brasileiro estima-se uma biota entre 170 e 210 mil espécies, correspondendo em torno de 13% da riqueza mundial (LEWINSOHN; PRADO, 2005). As plantas compõem um dos grupos mais bem estudados no Brasil, com ocorrência de aproximadamente 35 mil espécies, dessas, em torno de 20 mil (55%) são endêmicas. As angiospermas compõem a maior riqueza abrigando 32.086 espécies. As briófitas contam com 1.524 espécies, samambaias e licófitas com 1.253 espécies e as gimnospermas com 23 espécies (COSTA; PERALTA, 2015; PRADO et al., 2015; ZAPPI et al., 2015).

A ciência da biodiversidade inclui a descrição de novas espécies, suas interações com outras espécies e/ou com o ambiente, estudos dos processos ecológicos e evolutivos, com enfoque nos serviços ambientais, valor cultural e socioeconômico da biodiversidade. Estudos nessa área também buscam mecanismos e estratégias para uso sustentável e conservação das espécies (JOLY et al., 2011).

Com o avanço das pesquisas e das novas descobertas, existe a grande preocupação com as extinções de espécies causadas pelo ser humano. Hoje, centenas de milhares de espécies extintas podem ser conhecidas a partir dos registros fósseis. Porém, estimativas indicam que a extinção de espécies resultante de ações antrópicas é de 100 a 1.000 vezes maior em comparação com a natural, já tendo causado a perda (imperceptível) de milhares delas (BARNOSKY et al., 2011).

Nas décadas recentes, a cada ano são descritas 200 espécies novas para a flora brasileira, o que demonstra que o grupo está em constante atualização. Oficialmente são reconhecidas 2.113 espécies vegetais ameaçadas de extinção no Brasil. No entanto, nesses dados não estão incluídos indicadores de perda de diversidade genética em nível de populações e desconsidera as várias espécies que entram em extinção e nem sequer foram descritas (STEHMANN; SOBRAL, 2017).

Um dos ramos no estudo da biodiversidade compreende a sistemática que tradicionalmente se baseava em caracteres morfológicos. Nas décadas recentes, com o avanço da tecnologia, passou-se a utilizar as ferramentas em nível molecular para estudos filogenéticos (JOLY et al., 2011).

A vasta riqueza de espécies proporciona a pesquisa científica e tecnológica de produtos naturais. Essa área multidisciplinar que envolve químicos, biólogos e farmacologistas, busca metabólitos e substâncias com potencial para o desenvolvimento de protótipos de cosméticos, fármacos, agroquímicos e suplementos alimentares (STEHMANN; SOBRAL, 2017).

Neste estudo é apresentada *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling (Lamiaceae), espécie que vem sendo estudada em diferentes áreas de pesquisa em virtude da ação dos óleos essenciais que possui. Os trabalhos realizados sobre os efeitos biológicos tornaram esta planta promissora na elaboração de produtos naturais podendo substituindo os produtos sintéticos no controle de parasitas. Porém esta espécie se encontra ameaçada de extinção e poucos são os estudos relacionados a sua conservação.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar geneticamente e fisiologicamente *Hesperozygis ringens* como contribuição à conservação da espécie.

Objetivos Específicos

- Apresentar uma revisão de literatura sobre *H. ringens* com as suas características e potencialidades do óleo essencial.
- Avaliar a germinação de sementes de *H. ringens* em diferentes condições de temperatura e luminosidade;
- Avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos das infusões de *H. ringens*;
- Analisar a estrutura e a diversidade genética entre e dentro das populações de *H. ringens*.

A dissertação está constituída de uma revisão de literatura, seguida por quatro capítulos que correspondem a um artigo completo. Todos os artigos, inclusive aqueles já submetidos às revistas científicas, estão aqui apresentados nas normas MDT. Ao final, estão inseridas uma discussão geral e a conclusão do trabalho.

REVISÃO DE LITERATURA

LAMIACEAE

Lamiaceae (*Labiatae*) apresenta 236 gêneros e 7170 espécies distribuídas pelo mundo (GIULIETTI et al., 2005). No Brasil, ela é representada por 45 gêneros (3 endêmicos) e 527 espécies (346 endêmicas) (ANTAR et al., 2021). Estudos taxonômicos recentes apontaram esses números estão aumentando, como a inclusão de duas novas subfamílias em *Lamiaceae* transferidas de *Verbenaceae*: *Callicarpoideae* e *Tectonoideae* (LI; OLMSTEAD, 2017).

A grande diversidade é representada por ervas, arbustos e árvores. A família é bastante conhecida pela presença de compostos da classe dos terpenoides ou terpenos, conhecidos como óleos essenciais. Esses produtos secundários ou naturais sintetizados pelas plantas, estão relacionados com a interação com outros organismos: na atração de polinizadores, na defesa contra herbívoros e patógenos, na simbiose com microrganismos e na competição com outras plantas (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

As propriedades desses compostos também têm sido de interesse humano, sendo utilizados como matéria-prima para produtos da indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e perfumaria (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993). Entre as espécies mais conhecidas pela população estão aquelas cujas folhas são utilizadas na preparação de chás: hortelã (*Mentha* sp. L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), boldo (*Plectranthus barbatus* Andrews), a melissa (*Melissa officinalis* L.) e etc.; e outras como temperos: orégano (*Origanum vulgare* L.), poejo (*Cunila microcephala* Benth.), manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e etc. (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006).

Nas lamiáceas, alguns óleos essenciais atuam como agentes antioxidantes no combate aos radicais livres, os quais são ingeridos pelo consumo de alimentos ou bebidas que os contenham. Outros, possuem atividades bactericida, fungicida e inseticida (LIMA; CARDOSO, 2007), atuando como um agente natural com potencial para substituir o uso de agrotóxicos sintéticos, minimizando os efeitos danosos destes produtos ao ambiente e a saúde humana (SPADOTTO, 2006).

Uma das espécies que possui este potencial é *Hesperozygis ringens*, na qual através deste estudo pretende-se, através do bioindicador *Allium cepa*, detectar ou não efeitos genotóxicos e citotóxicos.

TESTE *Allium cepa*

O uso de bioindicadores tem sido proposto como um método confiável para detectar distúrbios ambientais causados por uma ampla quantidade e variedade de poluentes lançados no ambiente. São utilizadas como bioindicadores, diversas espécies de microrganismos, fungos, animais e plantas (GONZÁLEZ-ZUARTH et al., 2014).

Os bioensaios com *Allium cepa* possibilitam a verificação da possível genotoxicidade de diversos tipos de agentes físicos, químicos e biológicos (FISKESJÖ, 1985). O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) valida os ensaios de aberração cromossômica em raízes de *A. cepa*, como um teste eficiente para monitoramento *in situ* de genotoxicidade de poluentes ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

O teste de *A. cepa* pode ser utilizado, por exemplo, em acidentes de vazamento de petróleo, em que permite o avaliar efeito dos hidrocarbonetos de petróleo sobre os seres vivos expostos a essas áreas atingidas, assim como aquelas que passaram por medidas de retenção e limpeza (LEME; MARIN-MORALES, 2007).

Além de avaliar os impactos no ambiente, o teste *A. cepa* também avalia os efeitos de substâncias citotóxicas e genotóxicas de extratos de plantas medicinais e produtos naturais. Plantas usualmente utilizadas como chás para o tratamento de doenças podem conter substâncias que causam danos à saúde e o teste avalia o efeito das infusões sobre as raízes de *A. cepa* (BAGATINI; SILVA; TESDESCO, 2007). Trabalhos desenvolvidos com arnica (*Solidago microglossa* DC.), camomila (*Matricaria recutita* L.), carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) DC.) e malva-santa (*Plectranthus barbatus* Andrews) por exemplo, sem exceções apresentam pelo menos um efeito danoso às células (BAGATINI et al., 2009; BEZERRA; OLIVEIRA, 2016; PINHO et al., 2010; VIEIRA et al., 2009).

Produtos naturais na área de cosméticos também são avaliados quanto ao uso e as substâncias presentes nesses óleos. Estudos realizados com a babosa (*Aloe vera* (L.) Burm. f.), em especial seu gel que possui grande eficiência em acelerar a regeneração de células da pele, puderam apontar através de seus resultados que a aplicação em doses usuais não apresenta efeitos mutagênicos (STURBELLE et al., 2010).

Em estudos com própolis, destacam-se os seus efeitos antagônicos em que no teste *A. cepa*, constatou-se a possível ação antimutagênica (DA SILVA; BOSSO; CARDOSO, 2015). A própolis possui propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes, podendo ser utilizada na elaboração de cremes, xampus, doces, entre outros (PARK et al., 1998).

Com relação a *Hesperozygis ringens*, são encontrados estudos do grande potencial da espécie para fabricação de produtos à base do óleo essencial. Porém há uma carência de informações sobre possíveis efeitos tóxicos ou outros efeitos danosos, bem como a precariedade de informações existentes sobre as populações conhecidas. Uma espécie com alto potencial de uso farmacêutico ou veterinário precisa ter a dinâmica reprodutiva compreendida, para que as populações possam ser conservadas, e a espécie possa ser eventualmente propagada para utilização, sem risco de desaparecimento. Até o momento, apenas um estudo populacional foi realizado com a espécie e este não abrangeu toda a sua distribuição, que ocorre em cinco municípios (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006). Para o estudo de genética de populações, marcadores moleculares são ferramentas que proporcionam grande riqueza de informações.

MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares consistem em fragmentos de DNA obtidos por técnicas da biotecnologia que servem como ferramenta para diversos estudos genéticos, principalmente na variabilidade entre diferentes indivíduos com base no polimorfismo encontrado nas sequências de DNA (HOFFMANN, BARROSO, 2006; NADEEM et al., 2018). Os marcadores moleculares são muito bem valorizados em pesquisas da área da genética pela sua capacidade de distinguir genótipos (GROVER; SHARMA, 2016).

As primeiras moléculas a serem utilizadas como marcadores foram metabólitos secundários. Porém, a disponibilidade limitada, a instabilidade e outros fatores restringiram seu uso. Posteriormente, os marcadores enzimáticos, isoenzimas e aloenzimas, ganharam espaço por um breve período até a disponibilidade de marcadores de DNA. Estes últimos, se tornaram uma importante ferramenta, devido à estabilidade, ao custo-efetividade e à facilidade de uso. Essas vantagens

possibilitaram diversas aplicações, incluindo o mapeamento do genoma (GROVER; SHARMA, 2016).

Os marcadores moleculares auxiliam na caracterização genética de diversas espécies e as relações taxonômicas e evolutivas, fornecendo informações importantes para identificar áreas prioritárias em programas de preservação e para a compreensão da diversidade genética de espécies que estão em ameaça de extinção. Além disso, podem servir de auxílio no controle da endogamia e, conseqüentemente, na sustentabilidade dos recursos genéticos (ROSA; PAIVA, 2009; SOUZA, 2015).

As relações entre organismos ou genes, na filogenia molecular, são investigadas através da comparação entre homólogos de sequências de DNA ou proteínas. A abordagem filogenética clássica está baseada nas características morfológicas de um organismo, diferentemente da abordagem molecular, que depende das sequências de nucleotídeos (RNA e DNA) e das sequências de aminoácidos de uma proteína que são obtidas através de técnicas modernas. Através da comparação de moléculas homólogas de diferentes organismos, pode-se estabelecer um grau de similaridade, revelando uma relação de hierarquia em uma árvore filogenética (PATWARDHAN; RAY; ROY, 2014). Nos diferentes aspectos da evolução dos genomas, os marcadores moleculares podem identificar espécies, diferenciar raças ou subespécies, identificar linhagens maternas e paternas, inferir a origem e variabilidade genética intra e interpopulacional de espécies (ROSA; PAIVA, 2009).

A utilidade e resolução dos marcadores de DNA foram aprimoradas consideravelmente com o avanço das técnicas de hibridização de ácidos nucleicos, reação em cadeia da polimerase (PCR) e, posteriormente, sequenciamento de DNA (GROVER; SHARMA, 2016). Nas últimas décadas, várias técnicas de marcadores moleculares foram desenvolvidas e exploradas mundialmente em diferentes sistemas. Porém, apenas algumas destas técnicas receberam aceitação em nível global, dentre elas: RFLPs, RAPDs, AFLPs, ISSRs, SSRs e SNPs (GROVER; SHARMA, 2016; NADEEM et al., 2018).

No presente estudo serão utilizados os marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Esses foram desenvolvidos de tal maneira que nenhum conhecimento prévio do genoma da espécie é necessário. *Primers* baseados em uma sequência de repetição podem ser produzidos com uma âncora 3' degenerada. A reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) resultante amplifica uma sequência

entre dois SSRs (*Simple Sequence Repeat*), produzindo um sistema de marcadores multiloculares útil para impressão digital (*fingerprinting*), análise de diversidade e mapeamento de genomas. Em uma reação típica há a produção de 20 a 100 bandas por amostra, dependendo do *primer* e da espécie (GODWIN; AITKEN; SMITH, 1997).

Os marcadores moleculares ISSR são altamente polimórficos em comparação a RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), sendo bastante utilizados em estudos sobre filogenia, biologia evolutiva diversidade genética, marcação de genes, mapeamento de genoma (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

Nesse contexto, marcadores moleculares como os ISSR podem ser úteis para a compreensão da dinâmica de populações naturais de espécies ameaçadas de extinção. Este foi o marcador utilizado para buscar compreender a diversidade genética das populações de *Hesperozygis ringens* e de seus indivíduos.

CAPÍTULO 1: *Hesperozygis ringens* (BENTH.) EPLING (LAMIACEAE): UMA REVISÃO

Leandro Gonçalves Leite, Mariana Marques Wolf, Ana Cristina Mazzocato, Liliana Essi

RESUMO

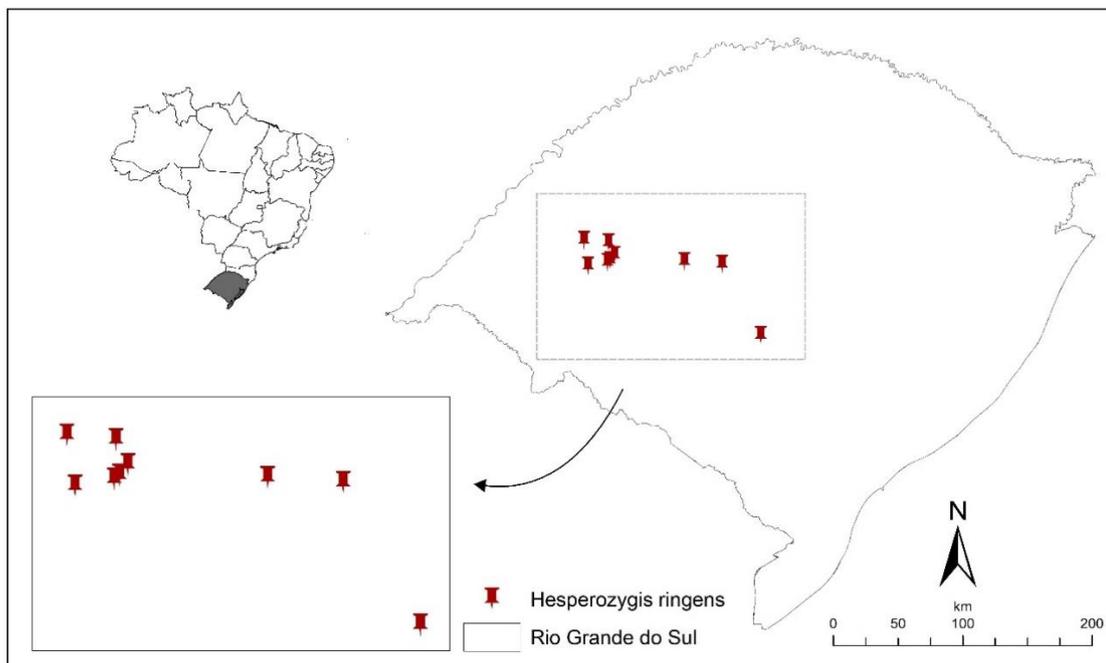
Hesperozygis ringens é uma espécie nativa e endêmica do Rio Grande do Sul pertencente à Lamiaceae. Essa planta arbustiva está distribuída em cinco municípios gaúchos e encontrada em regiões restritas próximo a locais arenosos e pedregosos. O forte odor característico da espécie é proporcionado pelo óleo essencial, mais especificamente a pulegona como o principal constituinte. Este trabalho propôs, por meio de uma revisão, apresentar o potencial de *H. ringens* em diversas linhas de ação pelas propriedades dos óleos essenciais assim como a sua composição química. Estudos realizados mostraram a ação antiparasitária e alelopática em algumas espécies de pragas, parasitas e plantas daninhas, o que a favorece como alternativa na produção de antiparasitários e herbicidas naturais. Outras propriedades se destacam na atividade anestésica e bactericida para o controle de microrganismos parasitas de peixes, aspectos de grande interesse na piscicultura. Mais recentemente, foi detectado a presença do ácido rosmarínico, responsável pelas propriedades medicinais. Com todos os estudos que estão sendo desenvolvidos, *H. ringens* torna-se uma espécie promissora, porém atualmente essa espécie se encontra ameaçada de extinção. Como forma de propagação, a estaquia pode ser uma alternativa de reprodução.

Palavras-chave: Espécie Ameaçada. Antiparasitário. Alelopatia. Produtos Naturais. Labiatae.

INTRODUÇÃO

A família *Lamiaceae* (*Labiatae*) apresenta 236 gêneros e 7170 espécies distribuídas pelo mundo (GIULIETTI et al., 2005). No Brasil, ela é representada por 70 gêneros (7 endêmicos) e 589 espécies (356 endêmicas) (ANTAR et al, 2021). O gênero *Hesperozygis* Epling está distribuído pelo sudeste e sul do país com sete espécies descritas: *H. dimidiata* Epling & Math., *H. kleinii* Epling & Játiva, *H. myrtoides* (A. St.-Hil. ex Benth.) Epling, *H. nitida* (Benth.) Epling, *H. rhododon* Epling, *H. ringens* (Benth.) Epling e *H. spathulata* Epling (ANTAR; OLIVEIRA, 2021). A espécie *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling, nativa do Rio Grande do Sul, é uma planta arbustiva, aromática, popularmente conhecida como “espanta-pulga”, distribuída em locais restritos nos campos rochosos e arenosos da região central e oeste do estado. Foram encontradas populações nos municípios de Alegrete, São Francisco de Assis, Caçapava do Sul e Santa Maria (DE FREITAS et al., 2010; FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006; SCHAEFER; ESSI, 2017) (Figura 1.1).

Figura 1.1 – Mapa de distribuição de *Hesperozygis ringens*. Os pontos de coleta marcados estão de acordo com os registros do *SpeciesLink*.



Fonte: Mapa construído no software Qgis.

As regiões do sudoeste do Rio Grande do Sul, como São Francisco de Assis e Alegrete, vêm passando por transformações devido ao processo de arenização, que

ocorre naturalmente principalmente em consequência dos ventos e da precipitação, causando a movimentação do solo, retirada da cobertura vegetal e soterramentos. A paisagem também é afetada pela fragilidade do ecossistema pelas atividades agropecuárias que ocorrem de modo indiscriminado (ROVEDDER et al., 2005). Por conta desses fatores, plantas endêmicas das localidades entram em situação de risco, incluindo *H. ringens* que se encontra na Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014).

Para a compreensão da situação da espécie em relação à variabilidade genética das suas populações, estudos com populações de Alegrete, São Francisco de Assis e Caçapava do Sul mostraram que as populações estão bem estruturadas, com pouca variabilidade intraespecífica, porém entre as populações são significativamente distintas. O que presumem os fenômenos de deriva genética e endogamia (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006).

Além de conhecer a situação em que espécies ameaçadas se encontram também é necessária a busca por metodologias que deem suporte na reprodução e propagação dos indivíduos. A propagação por meio da estaquia foi verificada em *H. ringens* com: estacas apicais e não apicais; material oriundo de casas de vegetação e do campo; e de dois tipos de substratos com cascas de arroz. Os resultados mostraram ser um método viável com alta taxa de enraizamento, principalmente naquelas desenvolvidas em casas de vegetação, o que contribui para a produção e o estabelecimento das plantas em viveiros (SIQUEIRA et al., 2020).

Com relação às características estruturais, *H. ringens* apresenta flores com morfologia típica das lamiáceas: bilabiadas, zigomorfas, diclamídeas e pentâmeras. Apresenta folhas opostas, forma: ovada, consistência: membranácea, indumento: pilosa a tomentosa, bases e ápices: agudos, margem: inteira/crenulada, tamanho: variando 1,5 a 2,2 cm de comprimento e 0,7 a 2,2 cm de largura (ANTAR; OLIVEIRA, 2021; VIANA et al., 2018) (Figura 1.2).

Figura 1.2 – *Hesperozygis ringens*. (A) Planta próxima as rochas em Caçapava do Sul; (B) abertura das flores de uma planta em São Pedro do Sul.



Fonte: Leite L.G. e Essi L.

Quanto a características anatômicas dos órgãos vegetativos, há a presença de tricomas glandulares e não glandulares nas folhas e caules. As folhas apresentam duas formas de estômatos dialelocíticos acima da epiderme e a presença de lipídios nas paredes celulares da endoderme. Espaços intercelulares são encontrados no caule e idioblastos fenólicos são encontrados nas raízes. Em todos os órgãos vegetativos estão espalhados uma grande quantidade de cristais (PINHEIRO; OLIVEIRA; HEINZMANN, 2018).

O objetivo deste trabalho foi apresentar uma revisão sobre *Hesperozygis ringens*, incluindo as características externas e internas da planta, habitat, a composição química do óleo essencial e as suas propriedades.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta revisão foi realizada por meio de uma pesquisa nas seguintes bases de dados: Periódicos Capes, Scielo, Google Scholar e Pubmed. Foram utilizados artigos publicados em revistas científicas, uma dissertação e dados de endereços eletrônicos da Flora do Brasil 2020 e do Ministério do Meio Ambiente. Como base deste artigo, iniciou-se a busca por "*Hesperozygis ringens*" em qualquer data. Todos os trabalhos encontrados neste primeiro levantamento foram inseridos no trabalho. A partir deste ponto, novas buscas por termos afins foram realizadas: "*Hesperozygis*", "Lamiaceae",

“Óleos essenciais”, “Pulegona” e “Produtos naturais”. De acordo com as informações obtidas, a apresentação deste artigo ficou dividida em quatro seções, a primeira sobre a composição química do óleo essencial e as demais sobre as suas propriedades antiparasitárias, alelopáticas e anestésicas.

COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Várias espécies inseridas na família Lamiaceae são bastante conhecidas por serem plantas aromáticas, especialmente pelos compostos químicos nelas contidos que são de interesse humano. Essas substâncias hidrofóbicas voláteis com características próprias constituem os óleos essenciais, metabólitos secundários sintetizados pela própria planta. Os óleos essenciais podem ser extraídos de várias partes do corpo do vegetal e as suas propriedades variam de acordo com o tipo, a quantidade e a interação entre os compostos que os formam (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; LUBBE, VERPOORTE, 2011).

Lamiaceae apresenta compostos secundários da classe dos terpenoides ou terpenos, conhecidos como óleos essenciais. Esses produtos secundários ou naturais sintetizados pelas plantas, estão relacionados com a interação com outros organismos: na atração de polinizadores, na defesa contra herbívoros e patógenos, na simbiose com microrganismos e na competição com outras plantas (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). As propriedades desses compostos beneficiam as plantas e o próprio ser humano que os utiliza como matéria-prima para produtos da indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e perfumaria (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993).

Nas lamiáceas, alguns óleos essenciais atuam como agentes antioxidantes no combate aos radicais livres, os quais são ingeridos pelo consumo de alimentos ou bebidas que os contenham. Outros, possuem atividades bactericida, fungicida e inseticida (LIMA; CARDOSO, 2007), atuando como um agente natural com potencial para substituir o uso de agrotóxicos sintéticos, minimizando os efeitos danosos destes produtos ao ambiente e a saúde humana (SPADOTTO, 2006). Inseridas na família se encontram plantas usualmente utilizadas pela população humana como chás e temperos, como espécies dos gêneros: *Cunila* D. Royen ex L., *Hyssopus* L., *Lavandula* L., *Melissa* L., *Mentha* L., *Ocimum* L., *Origanum* L., *Plectranthus* L'Hér., *Rosmarinus* L. e *Salvia* L. (BATTISTI et al., 2013; MAMADALIEVA et al., 2017). Além das espécies com suas propriedades já conhecidas e amplamente divulgadas se faz

necessário ainda estudos sobre espécies ainda pouco conhecidas, mas com potencial para produção de produtos naturais como *H. ringens*.

Testes histoquímicos detectaram proteínas, lipídios, óleo essenciais, resinas oleosas, flavonoides, alcaloides e compostos fenólicos não somente nas folhas, mas também nas pétalas de *H. ringens*. Os lipídios totais, resinas oleosas e os óleos essenciais estão presentes principalmente nos tricomas glandulares e no mesofilo das folhas e nos tricomas glandulares e superfície das pétalas (PINHEIRO et al., 2018)

Para a extração, identificação, quantificação e isolamento dos componentes químicos presentes no óleo essencial das folhas de *H. ringens*, diversos trabalhos com diferentes abordagens contribuíram para uma melhor compreensão da sua constituição. Entre as metodologias utilizadas se encontram: a extração através de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, extração assistida por ultrassom (UAE-EtOH), fluido supercrítico (SFE-CO₂), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia gasosa – detector por ionização de chama (GC-FID) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (RIBEIRO et al., 2010; ROSA et al., 2019; TONI et al., 2014; VON POSER et al., 1996).

De acordo com um levantamento dos dados obtidos nos trabalhos citados acima foram identificados mais de 20 componentes químicos no óleo essencial de *H. ringens*. As principais substâncias em maior abundância são os terpenos, mais especificamente os monoterpenos pulegona (79 % a 96 %), limoneno (0,7 a 2,7 %) e linalol (0,5 % a 1,6 %), as demais substâncias com valores geralmente abaixo de 1% (RIBEIRO et al., 2010; ROSA et al., 2019; TONI et al., 2014; VON POSER et al., 1996).

A identificação dos compostos contidos no extrato de *H. ringens* com UAE-EtOH, foi realizada por UPLC-MS (Cromatografia Líquida de Ultra Performance com espectrômetro de massa). Os compostos fenólicos detectados no extrato são conhecidos devido as suas propriedades medicinais. O constituinte presente em maior quantidade é o ácido rosmarínico, um polifenol relacionado às atividades antioxidantes, anticarcinogênicas, anti-inflamatórias, anti-hipertensivas e hepatoprotetoras (DOLWITSCH et al, 2020; LIN et al. 2017; LOU et al. 2016).

Fatores genéticos e ambientais, como luz, temperatura, água, solo e altitude podem causar mudanças e diferenças na composição e o rendimento dos óleos essenciais (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2012; PRINS; VIEIRA; FREITAS, 2010). Em *H. ringens*, a sazonalidade é um fator que influencia no rendimento, sendo os mais altos no outono, primavera e verão e menores no inverno (PINHEIRO et al., 2016).

Em outras espécies do mesmo gênero também se verificam algumas diferenças na composição dos óleos. *Hesperozygis myrtoides* (A. St.-Hil. ex Benth.) Epling também apresenta pulegona (21,4% a 44,4%), isomentona (32,7% a 47,7) e limoneno (3,5% a 7,7) enquanto *Hesperozygis rhododon* Epling apresenta a mentona (43,4%), a pulegona (29,6%) e o limoneno (4,2%) (CASTILHO et al., 2017; MARTINI et al., 2011; VON POSER et al., 1996).

PROPRIEDADES ANTIPARASITÁRIAS

A busca por acaricidas naturais tem sido relevante podendo substituir os sintéticos, em virtude destes se tornarem ineficazes contra carrapatos que adquirem resistência rapidamente, além de serem prejudiciais ao meio ambiente. As vantagens para a produção de produtos à base de óleos essenciais incluem: menor contaminação do ambiente e dos alimentos, desenvolvimento da resistência dos parasitas em um ritmo mais lento e menor toxicidade aos animais e seres humanos (BORGES; SOUSA; BARBOSA, 2011).

A partir das propriedades do óleo essencial de *H. ringens*, experimentos laboratoriais foram realizados para detectar os possíveis efeitos antiparasitários no carrapato-de-boi (*Rhipicephalus microplus*). Testes de imersão em fêmeas ingurgitadas e larvas mostrou a ocorrência de diminuição na postura de ovos pelas fêmeas, e dos ovos que foram postos verificou-se inibição da eclosão em 95% (concentração de 50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) e 30% (concentração de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$). O posterior isolamento da pulegona e a sua aplicação direta, mostraram efeitos semelhantes indicando o composto como responsável pela ação do óleo (RIBEIRO et al., 2010).

Apesar dos resultados de testes em laboratórios encontrados na literatura apresentarem o potencial antiparasitário para a espécie, ainda não há relatos de estudos na aplicação direta nos bovinos infestados no campo. Uma das dificuldades da obtenção dos mesmos resultados *in vivo* é a baixa persistência dos extratos no ambiente, necessitando de estratégias que protejam os compostos ativos e permitam a sua rápida penetração nos carrapatos (BORGES; SOUSA; BARBOSA, 2011). Outro obstáculo a ser analisado é a necessidade de verificar a penetração e absorção cutânea dos componentes do óleo e seus efeitos nos bovinos, uma vez que podem comprometer a saúde do animal, além da pecuária destinar a carne e laticínios para o consumo humano (RIBEIRO et al., 2010).

Embora os estudos com *H. ringens* sejam recentes, os efeitos da pulegona são conhecidos desde a sua identificação em outras espécies (*Mentha pulegium* L.) e os efeitos causados em outros seres vivos. Para as plantas, a produção e a utilização desses compostos servem como linhas de defesa contra o ataque de insetos herbívoros. Uma primeira linha age no impedimento da alimentação como repelente, e em segunda linha com a intoxicação causada e prejuízos no desenvolvimento dos insetos (FREEMAN; BEATTIE, 2008; HEFENDEHL, 1970; WINK, 1988).

PROPRIEDADES ALELOPÁTICAS

A procura por herbicidas naturais e menos prejudiciais ao meio ambiente e a saúde pública, vem sendo uma alternativa por meio da fabricação de produtos provenientes de óleos essenciais de plantas com propriedades alelopáticas. Visto que os herbicidas sintéticos apresentam grande persistência no ambiente que além da poluição gerada, pode causar intoxicação e atividades carcinogênicas e mutagênicas nas células (ABOUZIENA; HAGGAG, 2016).

Um dos primeiros trabalhos a serem realizados com a espécie foi a verificação do potencial alelopático na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). De acordo com as diluições testadas no experimento, foram relatados os seguintes efeitos do óleo essencial: presença de necrose nas pontas das radículas (diluição / 1:64); radículas mais curtas com inibição do crescimento do hipocótilo seguidas da morte da planta (diluições / 1:32 e 1:16); e radículas não emergidas ou morte imediatamente após a emergência (diluições / 1:8, 1:4 e 1:2). Nesse mesmo estudo, também foi verificado a ação do óleo essencial de *H. rhododon* que diferentemente apresentou menor inibição da germinação das sementes em comparação com *H. ringens* (VON POSER et al., 1996).

De maneira semelhante, foi realizado um novo estudo com concentrações mais baixas do óleo essencial (0,25 % a 5%) envolvendo a alface, além de outras culturas e plantas daninhas como: o picão-preto (*Bidens pilosa* L.), o azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), a aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb.), a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e o arroz (*Oryza sativa* L.). Nas dicotiledôneas, a germinação do picão-preto foi inibida completamente na maior concentração (5%), sem afetar a germinação da alface e da soja. Em relação às monocotiledôneas, a maior concentração (5%) reduziu pela metade o número de sementes germinadas de arroz e de azevém, e inibiu

completamente em aveia-preta. Com estes indicativos, o extrato de *H. ringens* apresenta maiores efeitos inibitórios em gramíneas e um potencial para controlar ervas daninhas que, neste caso, mostraram serem mais afetadas em relação às culturas (PINHEIRO et al., 2017). Testes de germinação de soja e picão-preto também foram avaliados em maiores concentrações (0, 25, 50, 75 e 100%), o que resultou em efeitos prejudiciais na germinação e no crescimento de plântulas, corroborando para a ação alelopática da espécie (LIMA et al., 2020).

PROPRIEDADES ANESTÉSICAS

Existe uma crescente demanda por anestésicos baratos e seguros capazes de reduzir o estresse em peixes produzido durante procedimentos como captura e manuseio. Com esses estudos, o uso do óleo essencial é uma possível alternativa em procedimentos na aquicultura que requerem a utilização de anestésicos.

O óleo essencial de *H. ringens* foi testado para utilização na piscicultura em *Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard (jundiá) como um possível anestésico natural capaz de diminuir o estresse nos peixes durante os procedimentos de captura e manuseio (SILVA et al., 2013). Segundo esse estudo, os efeitos observados foram favoráveis ao um bom anestésico: anestesia rápida; hiperatividade ou estresse mínimos e; rápida recuperação ao seu estado normal (GILDERHUS; MARKING, 1987). Não houve ocorrência de mortes e efeitos adversos nas condições testadas (faixa de concentração de 111-554 $\mu\text{L.L}^{-1}$) (SILVA et al., 2013).

Os efeitos sedativos e anestésicos foram evidenciados em estudos posteriores, porém testes na fisiologia dos peixes detectaram pequenas alterações em *R. quelen*. O peixe mostrou uma resposta adaptativa e a recuperação da maior parte dos parâmetros analisados (metabólicos, enzimáticos e imunorregulatórios) em quatro horas (TONI et al., 2014).

Em uma investigação com exposição mais prolongada (seis horas) ao óleo essencial, foi observado uma redução da taxa ventilatória ainda que insuficiente para diferenciar os tratamentos de forma significativa. Ocorreu um aumento da osmolaridade de proteínas, de glicose no plasma e dos níveis de lactato. Os níveis plasmáticos de cortisol não sofreram alteração. A expressão do RNAm de alguns hormônios adeno-hipofisários foi diminuída no hormônio do crescimento e somatolactina, sem alteração em prolactina além do aumento da atividade de enzimas

energéticas. Mesmo quando a exposição ao óleo ocorreu por um período longo não foi registrada nenhuma mortalidade no decorrer dos experimentos (TONI et al., 2015).

Os estágios de larvas, pós-larvas e alevinos de *R. quelen* podem ser atacados por larvas de insetos da ordem Odonata. Essas pragas são encontradas nos tanques de piscicultura e podem causar perdas na produção e no suprimento de juvenis. Um novo trabalho foi realizado envolvendo espécies de Coenagrionidae, a família mais diversificada de Odonata. Os gêneros identificados e que foram afetados com a exposição ao óleo foram: *Acanthagrion*, *Homeoura*, *Ischnura* e *Oxyagrion* (SILVA et al., 2014).

O óleo essencial também apresenta toxicidade para o zooplâncton de água doce *Daphnia pulex*, sendo letal na concentração 61,5 mg.L⁻¹. Como bactericida nos diferentes patógenos de jundiá, apresentou atividade moderada contra *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas veronii* e mais fraca contra *Citrobacter freundii* e *Raoultella ornithinolytica*. A atividade antiparasitária também é significativa no parasita *Gyrodactylus* sp. (BANDEIRA JR et al., 2017).

CONCLUSÃO

As diversas aplicações para qual *H. ringens* pode ser utilizada e as poucas informações sobre ela forneceram uma variedade de estudos nas áreas da botânica e química. Não foram encontrados na literatura trabalhos da morfologia e anatomia floral, assim como modos de reprodução e polinizadores. Da mesma forma, não há registo de trabalhos com a ação destes compostos em insetos da ordem Siphonaptera, grupo que representa as pulgas, embora o nome comum da espécie (“espanta-pulga”) possa sugerir. Ainda que muitos dos trabalhos citados sejam pioneiros ou testes, os resultados apresentados contribuem para um melhor entendimento da espécie. Cabe ressaltar a importância da preservação das populações existentes dessa espécie promissora.

REFERÊNCIAS

ABOUZIENA, H. F.; HAGGAG, W. M. Weed control in clean agriculture: a review. **Planta daninha**, v. 34, n. 2, p. 377-392, 2016.

ANTAR, G.M. et al. *Lamiaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB142>>. Acesso em: 09 fev. 2021

ANTAR, G.M.; OLIVEIRA, A.B. *Hesperozygis in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8156>>. Acesso em: 09 fev. 2021

BANDEIRA JR, G. et al. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 484-491, 2017.

BATTISTI, C. et al. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 3, 2013.

BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; BARBOSA, C. S.. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 89-96, 2011.

CASTILHO, C.V.V. et al. In vitro activity of the essential oil from *Hesperozygis myrtoides* on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 70-76, 2017.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

LUBBE, A.; VERPOORTE, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. **Industrial crops and products**, v. 34, n. 1, p. 785-801, 2011.

DE FREITAS, E. M. et al. Floristic diversity in areas of sandy soil grasslands in Southwestern Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, 2010.

DOLWITSCH, C. B. et al. *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: a study involving extraction, chemical profiling, antioxidant and biological activity. **Natural Product Research**, p. 1-6, 2020.

FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of Southern Brazil. **Biochemical genetics**, v. 44, n. 11-12, p. 471-482, 2006.

FREEMAN, B. C.; BEATTIE, G. A. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. **The Plant Health Instructor**, 2008.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. 2005.

GUNDERSON, C. A. et al. Effects of the mint monoterpene pulegone on *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 14, n. 6, p. 859-863, 1985.

HEFENDEHL, F. W. Beiträge zur biogenese ätherischer Öle Zusammensetzung zweier ätherischer Öle von *Mentha pulegium* L. **Phytochemistry**, v. 9, n. 9, p. 1985-1995, 1970.

LIMA, C. S. et al. Allelopathic Potential of *Hesperozygis ringens* Extracts on Seed Germination of Soybeans and Beggarticks, **Journal of Agricultural Science** v. 12, n. 11, 2020.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. **Revista Fitos**, v. 3, n. 03, p. 14-24, 2007.

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, 2012.

LIN, S. et al. Hepatoprotective activities of rosmarinic acid against extrahepatic cholestasis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 214-223, 2017.

LOU, K. et al. Rosmarinic acid stimulates liver regeneration through the mTOR pathway. **Phytomedicine**, v. 23, n. 13, p. 1574-1582, 2016.

LUBBE, A.; VERPOORTE, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. **Industrial crops and products**, v. 34, n. 1, p. 785-801, 2011.

MAMADALIEVA, N. Z. et al. Aromatic medicinal plants of the Lamiaceae family from Uzbekistan: ethnopharmacology, essential oils composition, and biological activities. **Medicines**, v. 4, n. 1, p. 8, 2017.

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. 1934578X1100600726, 2011.

PINHEIRO, C. G.; OLIVEIRA, J. M. S.; HEINZMANN, B. M. Structural characterization of vegetative organs of the endangered Brazilian native species *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2887-2901, 2018.

PINHEIRO, C. G. et al. Essential oil of the Brazilian native species *Hesperozygis ringens*: a potential alternative to control weeds. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 3, p. 701-711, 2017.

PINHEIRO, C. G. et al. Seasonal variability of the essential oil of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 176-184, 2016.

- PINHEIRO, C. G.; DE OLIVEIRA, J. M. S.; HEINZMANN, B. M. Histological and histochemical characterization of leaves and petals of the endangered native Brazilian species *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. **Flora**, v. 239, p. 1-10, 2018.
- PRINS, C. L.; VIEIRA, I. JC.; FREITAS, S. P. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 91-102, 2010.
- 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, n. 7, p. 2506-2509, 2010.
- ROSA, I. A. et al. Extracts of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: in vitro and in vivo antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1353-1361, 2019.
- ROVEDDER, A. P. et al. Análise da composição florística do campo nativo afetado pelo fenômeno da arenização no sudoeste do Rio Grande do Sul. **Embrapa Pecuária Sul-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2005.
- SCHAEFER, J.; ESSI, L. A checklist of Asteraceae from Pedra do Lagarto, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Check List**, v. 13, p. 1075, 2017.
- SILVA, D. T. et al. Larvicidal activity of Brazilian plant essential oils against Coenagrionidae larvae. **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 4, p. 1713-1720, 2014.
- 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.
- SIQUEIRA, J. et al. Vegetative propagation of na endemic species of the Pampa biome. **Ciência e Natura**, v. 42, p. 68, 2020.
- SPADOTTO, C. A.. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA JURÍDICA DA FACULDADE MARECHAL RONDON, 4., 2006, São Manuel, SP. Artigos publicados... São Manuel, SP: FMR, 2006. p. 1-9. Revista do Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar, São Manuel, p. 1-9, maio 2006., 2006.
- TONI, C. et al. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 701-714, 2014.
- TONI, C. et al. Stress response in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to the essential oil of *Hesperozygis ringens*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 129-138, 2015.
- VIANA, A. et al. Morfologia e anatomia foliar de espécies de angiospermas com ocorrência nos campos de areas do bioma pampa. 2018.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado- Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

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 agricultural and food chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1829-1832, 1996.

WINK, M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **Theoretical and applied genetics**, v. 75, n. 2, p. 225-233, 1988.

CAPÍTULO 2: GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Hesperozygis ringens* (BENTH.) EPLING (LAMIACEAE) – UMA ESPÉCIE ENDÊMICA E AMEAÇADA

Leandro Gonçalves Leite, Raquel Stefanello, Liliana Essi

RESUMO

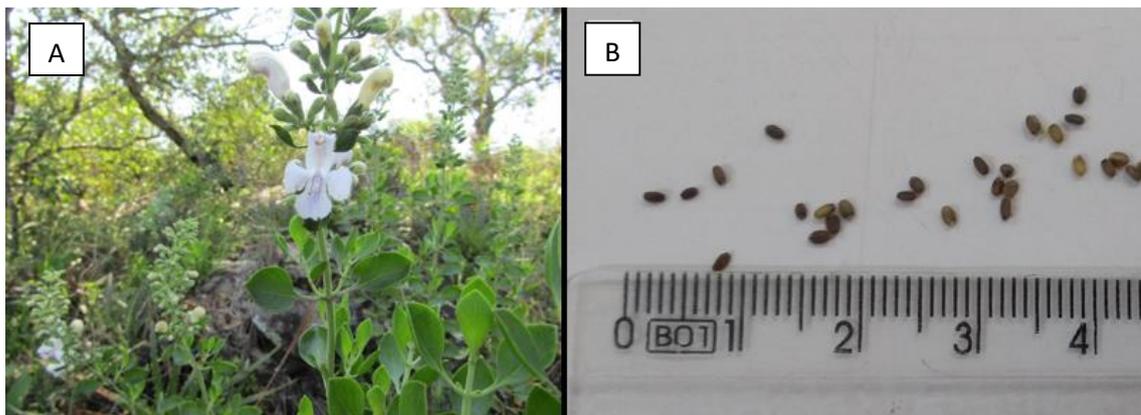
Hesperozygis ringens (Lamiaceae), popularmente conhecida como espanta-pulga, é uma espécie nativa ameaçada de extinção encontrada em locais rochosos e arenosos de regiões restritas ao bioma Pampa. Um dos fatores que pode influenciar no baixo número de indivíduos de uma determinada espécie é a ocorrência de problemas tais como baixas taxas de germinação de sementes influenciadas pela temperatura e/ou luminosidade. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de *H. ringens*. As sementes de dois lotes foram semeadas sobre substrato papel e mantidas em câmara BOD nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C, na presença e ausência de luz. As avaliações da taxa e da velocidade de germinação foram realizadas a cada 3 dias, durante 21 dias. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, onde os tratamentos constituíram um fatorial 4 x 2. Os primeiros sinais visíveis de germinação foram observados aos sete dias após a semeadura. A germinação ocorreu tanto na presença quanto na ausência de luz e as temperaturas mais baixas influenciaram significativamente o processo germinativo e a velocidade de germinação. A temperatura de 15 °C mostrou-se mais favorável à germinação da espécie do que as temperaturas de 20, 25 e 30 °C. Assim, pode-se concluir que o teste de germinação com temperatura de 15 °C, sob presença ou ausência de luz, favorece o processo germinativo das sementes de *H. ringens*.

Palavras-chave: Espanta-pulga. Processo Germinativo. Luz. Temperatura.

INTRODUÇÃO

Hesperozygis ringens (Benth.) Epling, popularmente conhecida como espanta-pulga é uma planta arbustiva nativa, pertencente à Lamiaceae (Figura 2.1A). Pode ser propagada por sementes (Figura 2.1B) ou por estaquia, sendo esta última viável, pois apresenta elevada taxa de enraizamento, mesmo com propágulos coletados de populações *in situ* (SIQUEIRA et al., 2020). É encontrada em campos rochosos do Rio Grande do Sul, com distribuição restrita à serra do Sudeste e ao sul das Missões, nos solos rochosos e arenosos de Alegrete, Caçapava do Sul, São Francisco de Assis e Santa Maria (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006; FREITAS et al., 2010; SCHAEFER; ESSI, 2017).

Figura 2.1 – Planta adulta (A) e sementes (B) de *Hesperozygis ringens*.



Fonte: (A) Essi L. e (B) Stefanello R.

Alguns estudos descreveram uma alta produção de óleo essencial por suas folhas, com pulegona (95,18%) como componente principal (SILVA et al., 2014). Seu óleo essencial apresenta ação antioxidante (DOLWITSCH et al., 2020), antiparasitária e antimicrobiana (BANDEIRA et al., 2017), alelopática (LIMA et al., 2020; PINHEIRO et al., 2016), anestésica e larvicida (SILVA et al., 2014). Além disso, em um trabalho pioneiro sobre citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro*, Dolwitsch et al. (2020) demonstraram que seus extratos UAE-EtOH e SFE-CO₂ são seguros para linfócitos humanos nas concentrações avaliadas.

Devido à sua ocorrência endêmica em morros pedregosos, às constantes renovações das pastagens através das queimadas para a alimentação do gado, e sua coleta indiscriminada para fins medicinais, associados à baixa eficiência de

propagação por sementes, *H. ringens* tem sido incluída na lista das espécies brasileiras ameaçadas de extinção (FLORA DO BRASIL, 2020). Apesar de serem encontrados estudos com relação à caracterização taxonômica, medicinal e alelopática ainda não foram encontrados relatos sobre o processo germinativo das sementes. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Hesperozygis ringens*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi desenvolvido no Laboratório de Genética Vegetal, pertencente ao Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria (RS). Foram utilizados dois lotes de sementes de *Hesperozygis ringens* coletadas nas cidades de São Pedro do Sul (Lote A) e São Francisco de Assis (Lote B), Rio Grande do Sul, Brasil. As coletas foram realizadas com a devida autorização (autorização SISBIO número 60921). As plantas e sementes foram identificadas, a partir de comparação com material depositado no herbário SMDB e uso de literatura taxonômica. *Vouchers* de cada população foram depositados no herbário SMDB. Depois de separadas manualmente, elas foram armazenadas em sacos plásticos em ambiente refrigerado mantendo o pré-esfriamento à temperatura de 5-10 °C por um período de sete dias, ou mais. Na literatura não foram encontrados relatos de dormência nas sementes desta espécie.

Antes da semeadura as sementes passaram por um processo de assepsia, com imersão em etanol 70% (10 segundos) e solução de hipoclorito de sódio com 1% de cloro (30 segundos) e, em seguida, enxaguadas três vezes com água destilada.

O teste de germinação foi realizado com quatro repetições de 50 sementes, distribuídas em caixas plásticas transparentes (gerbox), sobre três folhas de substrato papel umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. Após a semeadura, as caixas plásticas foram mantidas em câmara BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C, na presença e ausência de luz (LUZ et al., 2014; STEFANELLO et al., 2017), sendo as contagens realizadas a cada 3 dias, totalizando 21 dias.

A condição com iluminação, em regime de 24 horas de luz, foi obtida nas câmaras de germinação pela utilização de quatro lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia 20 W, com densidade de fluxo radiante na altura das caixas de $15 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

¹ (KOEENDER et al., 2009). Na ausência de luz, as sementes foram semeadas em sala iluminada com filtro de segurança formado por três folhas de papel-celofane verde e mantidas no escuro durante todo o teste, cobrindo-se as caixas plásticas de germinação com duas folhas de papel-alumínio (STEFANELLO et al., 2017). As avaliações na condição sem luz foram realizadas seguindo esta descrição.

O umedecimento do substrato foi realizado uma vez aos dez dias. Foram contabilizadas as sementes que atenderem ao critério botânico que considera germinadas as sementes em que uma das partes do embrião emergiu de dentro dos envoltórios, acompanhado de algum sinal de metabolismo ativo, como curvatura da radícula (LABOURIAU, 1983). Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes germinadas.

Para avaliação do índice de velocidade de germinação (IVG), as contagens das sementes germinadas foram efetuadas a cada três dias, no mesmo horário. O critério de germinação foi a protrusão da raiz primária (de acordo com a descrição acima). O índice de velocidade de germinação foi calculado adaptando-se a fórmula de Maguire

$$(1962): IVG = \sum_{i=1}^n \left(\frac{N_i}{D_i} \right)$$

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, onde os tratamentos constituíram um fatorial 4 x 2 (4 temperaturas x presença ou ausência de luz). Não foi realizada a comparação entre os diferentes lotes uma vez que não era objetivo do trabalho. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e, quando constatado efeito significativo, foi efetuada a análise pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise dos dados de germinação dos dois lotes de sementes de *Hesperozygys ringens* observou-se que não houve interação entre os fatores luz e temperatura. Além disso, não foi observada diferença significativa nas duas condições de luz utilizadas, sendo que as sementes apresentaram comportamento indiferente à luz (Tabela 2.1). Resultados similares foram obtidos por Stefanello et al. (2015) onde verificaram que a germinação de sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) ocorre tanto na presença quanto na ausência de luz.

Tabela 2.1 – Germinação (%) de sementes de *Hesperozygis ringens*, submetidas a diferentes temperaturas na presença e ausência de luz, 21 dias após a semeadura.

Temperatura	Lote A		Lote B	
	Presença de luz	Ausência de luz	Presença de luz	Ausência de luz
15 °C	44 a A*	40 a A	21 a A	21 a A
20 °C	24 b A	20 b A	15 a A	11 b A
25 °C	15 c A	4 c B	5 b A	1 c A
30 °C	1 d A	0 c A	1 b A	1 c A

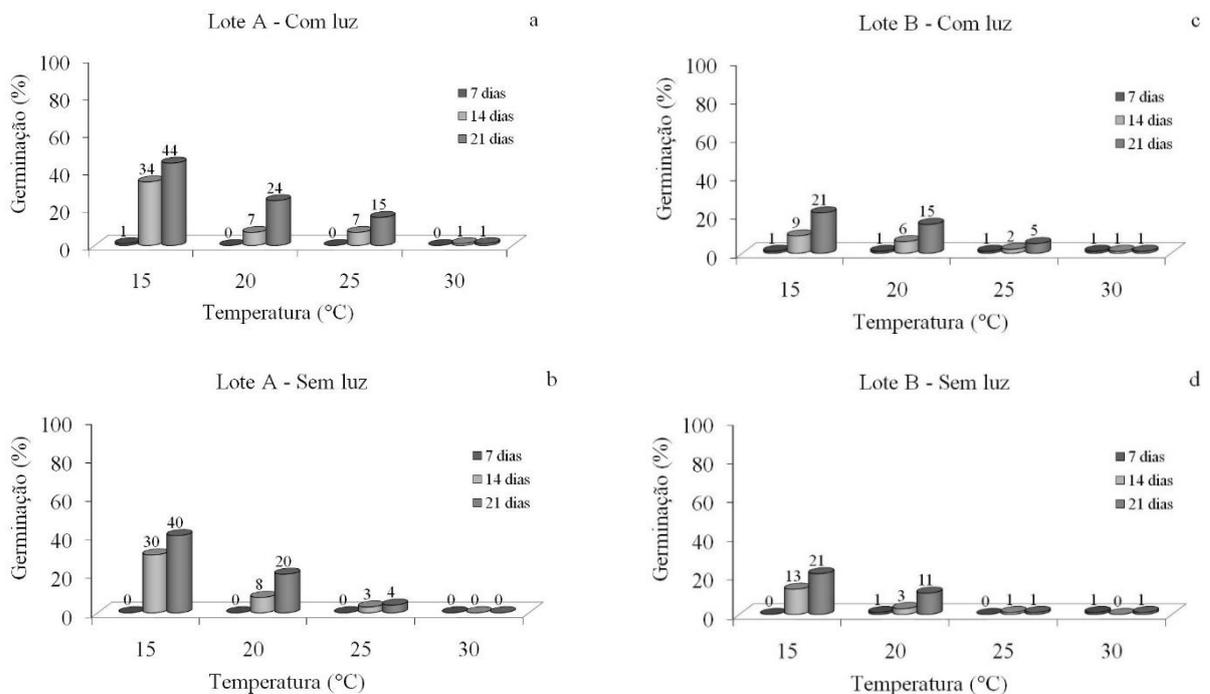
* Médias, seguidas de mesma letra minúscula, em cada coluna, e letra maiúscula, em cada linha, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Em relação à temperatura, pode-se verificar que independente do ambiente de luz, a temperatura influenciou significativamente a germinação (Tabela 2.1). Os maiores percentuais de germinação foram obtidos na temperatura de 15 °C, tanto na presença como na ausência de luz, embora seja observada germinação também nas temperaturas de 20 e 25 °C. De acordo com Paiva et al. (2016), a capacidade das sementes de germinar em amplas condições de temperatura reflete a adaptabilidade da espécie às variações térmicas ambientais. Resultados semelhantes foram obtidos na germinação de sementes de outras espécies de Lamiaceae como *Ocimum basilicum* L. (KHAN et al., 2014) e *Salvia hispanica* L. (STEFANELLO et al., 2015). Adicionalmente, Saffariha et al. (2020) avaliando o efeito de cinco temperaturas (10 a 30 °C) na germinação de sementes de *Salvia limbata* C.A. Mey. verificaram que o número máximo de sementes germinadas ocorreu na temperatura de 18,3 °C.

Na temperatura de 30 °C, tanto em presença quanto em ausência de luz, os resultados de germinação foram insignificantes (Tabela 2.1). As temperaturas mais altas podem reduzir a germinação, causando desorganização do processo germinativo, sendo que o número de sementes que podem completar esse processo diminui rapidamente, basicamente devido aos efeitos sobre a atividade de enzimas e às restrições sobre o acesso ao oxigênio (MARCOS FILHO, 2015). As temperaturas elevadas podem, portanto, ter efeitos deletérios sobre a germinação de sementes (OLIVEIRA et al., 2014), como observado neste estudo. Assim, a temperatura de 30 °C não é recomendada para a germinação das sementes de *H. ringens*.

De um modo geral, o tempo médio de germinação variou entre 14 e 21 dias e os primeiros sinais visíveis de germinação, mesmo em baixas percentagens, puderam ser observados aos sete dias após a semeadura (Figura 2.2). De acordo com Carvalho et al. (2020), quanto menos tempo as plântulas levam para emergir do solo e permanecer nos estágios iniciais de desenvolvimento, menos vulneráveis elas são às condições ambientais adversas. Assim, é imprescindível o estudo das condições ecofisiológicas que influenciam a germinação das sementes, uma vez que o sucesso no estabelecimento da espécie depende da tolerância das mudas às condições adversas do meio ambiente (SILVA et al., 2017).

Figura 2.2 – Tempo médio em dias de germinação das sementes de *Hesperozygis ringens*.



Fonte: Gráficos construídos no software Sisvar

Diversos aspectos influenciam o processo de germinação das sementes, podendo estar correlacionados com a viabilidade e a longevidade e às condições ambientais como água, luminosidade, temperatura e oxigênio (LUZ et al., 2014). O processo germinativo envolve uma sequência de atividades metabólicas, durante as quais ocorrem reações bioquímicas; cada uma dessas reações apresenta exigências próprias principalmente quanto à temperatura, porque dependem da atividade de

sistemas enzimáticos (MARCOS FILHO, 2015). O conhecimento sobre a resposta das sementes à temperatura é fundamental, pois torna possível entender a amplitude de tolerância das espécies em relação à temperatura, bem como as condições climáticas nas quais as sementes podem germinar e se estabelecer de maneira adequada (MOTSA et al., 2015).

Por outro lado, embora a luz não seja apontada como um fator essencial para que o processo se realize em sementes não-dormentes, a sua presença pode contribuir para atenuar problemas causados pelos efeitos de temperaturas superiores e pelo baixo potencial de água do solo (MARCOS FILHO, 2015). A sensibilidade das sementes à luminosidade é bastante variável conforme a espécie, havendo sementes cuja germinação é influenciada positiva ou negativamente pela luz e sementes indiferentes a esse fator (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012; TAIZ; ZEIGER, 2017). A luz pode induzir a germinação de sementes, como em algumas gramíneas forrageiras, mas em outras espécies, a sua presença pode inibir a germinação (BRASIL, 2009). No presente estudo, *H. ringens* germinou independente da condição de luminosidade podendo ser considerada como indiferente à luz.

Embora o objetivo do trabalho não fosse comparar os lotes das sementes, percebe-se que o lote B possui qualidade inferior ao lote A, o que não inviabiliza a importância dos resultados visto que este é um estudo pioneiro para esta espécie. Essas diferenças de respostas entre os lotes podem ser atribuídas à umidade das sementes, aos diferentes locais de coleta, à ausência de informações sobre a ocorrência de dormência e a presença de fungos. Os resultados deste estudo corroboram com Fracaro (2006) que afirma que a propagação convencional de *H. ringens* apresenta problemas pela viabilidade das sementes e baixa germinação. De acordo com Marcos Filho (2015), as taxas de germinação estão amplamente ligadas à espécie e suas características genéticas, das condições do ambiente durante o cultivo, do manejo durante e após a colheita e da sanidade. Ao mesmo tempo, o procedimento de desinfecção não foi bem-sucedido, visto que ocorreu contaminação perceptível por fungos nas sementes o que pode ter contribuído, também, para a baixa taxa de germinação nos tratamentos. Destaca-se, também que nesta pesquisa não foram realizados testes para identificação das espécies de fungos presentes nas sementes.

Em relação à velocidade de germinação (IVG) verificou-se comportamento semelhante à germinação (Tabela 2.2). A velocidade de germinação foi maior nas

sementes submetidas à temperatura mais baixa (15 °C), independente da condição de luz. De acordo com Carvalho e Nakagawa (2012), a temperatura influencia tanto na velocidade quanto na percentagem de germinação, pois tende a influenciar a velocidade de absorção de água e as reações bioquímicas.

Tabela 2.2 – Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Hesperozygis ringens*, submetidas a diferentes temperaturas na presença e ausência de luz, 21 dias após a semeadura.

Temperatura	Lote A		Lote B	
	Presença de luz	Ausência de luz	Presença de luz	Ausência de luz
15 °C	3,32 a A*	2,74 a B	1,37 a A	1,33 a A
20 °C	1,37 b A	1,27 b A	0,99 b A	0,69 b A
25 °C	0,91 b A	0,25 c B	0,33 c A	0,04 c A
30 °C	0,08 c A	0,00 c A	0,01 c A	0,00 c A

* Médias, seguidas de mesma letra minúscula, em cada coluna, e letra maiúscula, em cada linha, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

O entendimento da germinação de sementes é uma característica primordial para determinar a capacidade das plantas de se estabelecerem com sucesso em um determinado habitat ou região geográfica. As sementes precisam ser capazes de germinar no momento e local certos, de modo que as chances de sobrevivência e estabelecimento das mudas sejam maximizadas (CRISTAUDO et al., 2019). Assim, a busca de conhecimentos sobre as condições ideais para a germinação das sementes e para o desenvolvimento inicial das plantas consiste em um papel fundamental dentro da pesquisa científica e fornece informações consistentes sobre a propagação das espécies (STEFANELLO et al., 2015). Apesar da baixa taxa de germinação observada, os resultados deste trabalho são pioneiros e fundamentais para o entendimento da distribuição da espécie e sua reduzida ocorrência. Desta forma, estudos futuros poderão ser conduzidos com novas coletas de sementes para verificar outros tempos e/ou produtos para assepsia bem como a influência de outras temperaturas (mais altas e mais baixas) na germinação das sementes desta espécie.

CONCLUSÃO

A germinação de sementes de *H. ringens* ocorreu tanto na presença quanto na ausência de luz e as temperaturas mais baixas influenciaram positivamente o processo germinativo e a velocidade de germinação. A temperatura de 15 °C mostrou-se mais favorável à germinação da espécie do que as temperaturas de 20, 25 e 30 °C. A temperatura de 30 °C não é recomendada para a germinação de sementes desta espécie. O teste de germinação com temperatura de 15 °C, sob presença ou ausência de luz, favorece o processo germinativo das sementes de *H. ringens*.

REFERÊNCIAS

- BANDEIRA JR, G. et al. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 484-491, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.
- CARVALHO, C. A. et al. Effect of temperature and light on seed germination and seedling growth of *Swietenia macrophylla* King. **Revista Caatinga**, 33(3), 728-734, 2020.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5 ed. Jaboticabal: Funep, 2012. 590p.
- CRISTAUDO, A. et al. Temperature and storage time strongly affect the germination success of perennial *Euphorbia* species in Mediterranean regions. **Ecology and Evolution**, 9:10984–10999, 2019.
- DOLWITSCH, C. B. et al. *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: a study involving extraction, chemical profiling, antioxidant and biological activity. **Natural Product Research**, Jan, v. 10, p. 1-6. doi: 10.1080/14786419.2019.1710703. [Epub ahead of print]
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FLORA DO BRASIL 2020 - Algas, Fungos e Plantas. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do#CondicaoTaxonCP> > Acesso em: 28 set 2020.

- FRACARO, F. Ecologia molecular, variabilidade genética, química e cultivo *in vitro* de *Hesperozygis ringens* Benth. 2006. 89p. Tese (Doutorado em Ciências) - São Carlos: 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, n. 11-12, p. 471-482, 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**, v. 8, n. 1, 2010.
- KHAN, A. R. et al. Ecophysiology of seed germination in native and exotic labiates of Balochistan. **Biologia**, v. 60, n. 1, p. 23-29, 2014.
- KOEFENDER, J. et al. Influência da temperatura e da luz na germinação da semente de calêndula. **Hortic. bras.**, Brasília, v. 27, p. 207-210, 2009.
- LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 174p.
- LIMA, C. S. et al. Allelopathic potential of *Hesperozygis ringens* extracts on seed germination of soybeans and beggarticks. **Journal of Agricultural Science**, v. 12, n. 11, 2020.
- LUZ, F. N. et al. Interferência de luz, temperatura, profundidade de semeadura e palhada na germinação e emergência de *Murdannia nudiflora*. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 1, p. 26-33, 2014.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Sci.**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed., Londrina: ABRATES, 2015. 660p.
- MOTSA, M. M et al. Effect of light and temperature on seed germination of selected African leafy vegetables. **South African Journal of Botany**, v.99, p.29-35, 2015.
- OLIVEIRA, S. S. C. et al. Seleção de progênies de nabo-forrageiro para germinação sob altas temperaturas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 217-222, 2014.
- PAIVA, E. P. et al. Light regime and temperature on seed germination in *Salvia hispanica* L. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 38(4), 513-519, 2016.
- PINHEIRO, C. G. et al. Seasonal variability of the essential oil of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 176-184, 2016.
- SAFFARIHA, M.; JAHANI, A.; POTTER, D. Seed germination prediction of *Salvia limbata* under ecological stresses in protected areas: an artificial intelligence modeling approach. **BMC Ecology**, v. 20, n. 40, p. 1-14, 2020.

SCHAEFER, J.; ESSI, L. A checklist of Asteraceae from Pedra do Lagarto, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Check List**, v. 13, p. 1075, 2017.

SILVA, D. T. et al. Larvicidal activity of Brazilian plant essential oils against *Coenagrionidae* larvae. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 4, p. 1713-1720, 2014.

SILVA, R. B. et al. Germinação e vigor de plântulas de *Parkia platycephala* Benth., em diferentes substratos e temperaturas. **Revista Ciência Agronômica**, 48: 142-150, 2017.

SIQUEIRA, J. et al. Vegetative propagation of na endemic species of the Pampa biome. **Ciência e Natura**, v. 42, e68, 2020.

STEFANELLO, R. et al. Germinação e vigor de sementes de chia (*Salvia hispanica* L. - Lamiaceae) sob diferentes temperaturas e condições de luz. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 17, n. 4, suppl. 3, p. 1182-1186, 2015.

STEFANELLO, R.; VIANA, B. B.; NEVES, L. A. S. Germination and vigor of linseed seeds under different conditions of light, temperature and water stress. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 3, p. 1161-1168, maio/jun. 2017.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed., Porto Alegre, RS: Artmed, 2017. 888 p.

CAPÍTULO 3: EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Hesperozygis ringens* (BENTH.) EPLING (LAMIACEAE) PELO TESTE *Allium cepa*

Leandro Gonçalves Leite, Solange Bosio Tedesco, Ana Cristina Mazzocato, Liliana Essi

RESUMO

Hesperozygis ringens é uma planta pertencente à *Lamiaceae*, encontrada em locais rochosos e arenosos de regiões restritas do Rio Grande do Sul. É popularmente conhecida como “espanta-pulga”, devido às propriedades antiparasitárias dos óleos essenciais, sendo estes encontrados principalmente nas folhas. Outros estudos relatam outras propriedades com ação bactericida, alelopática e anestésica. Em virtude do potencial na aplicação de uso animal, é imprescindível a necessidade de verificar se os extratos aquosos de *H. ringens* podem ou não causar alterações cromossômicas nas células desses organismos. O objetivo do trabalho foi avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e citotóxicos de extratos aquosos de *H. ringens*. Para essa avaliação foi utilizado o teste *Allium cepa* L., com dez tratamentos: água destilada (controle negativo), glifosato à 2% (controle positivo) e duas concentrações de extratos aquosos de *H. ringens*: 4 g.L⁻¹ e 8 g.L⁻¹, com folhas secas de quatro populações de diferentes municípios. Foram analisadas 4.000 células em cada tratamento com quatro repetições. Os dados obtidos foram analisados pelo teste ANOVA utilizando o teste de comparação de médias Scott-Knott, gerados no software SISVAR, com 5% de probabilidade. De acordo com os resultados, houve decréscimo dos valores dos índices mitóticos em todos tratamentos em relação ao controle negativo em água, mostrando diferenças significativas geralmente com o aumento da concentração dos extratos. Esses resultados indicaram o efeito antiproliferativo dos extratos aquosos de *H. ringens*.

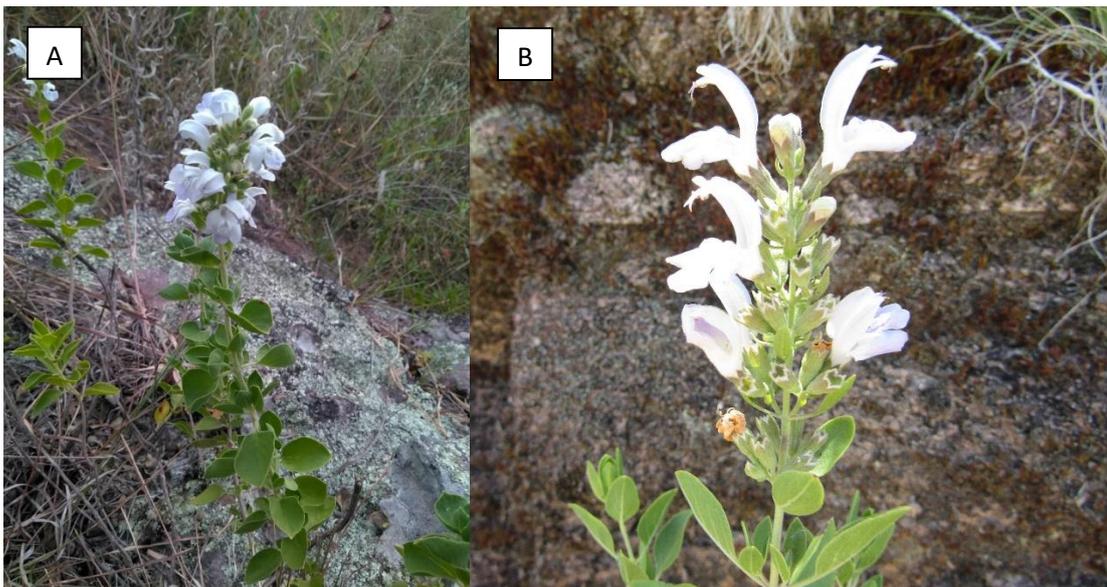
Palavras-chave: Pulegona. Genotoxicidade. Espécie Ameaçada. Produtos Naturais.

INTRODUÇÃO

A descoberta dos óleos essenciais presentes em determinados grupos de plantas e os diversos efeitos biológicos resultantes de sua aplicação, se tornaram recursos de grande utilidade para determinadas finalidades. A procura por novos produtos naturais a partir dos óleos essenciais é de interesse, pois eles podem ser os substitutos de produtos sintéticos e são menos agressivos ao meio ambiente. (NIKOLOVA; BERKOV, 2018; SOUTAR; COHEN; WALL, 2019; VIEIRA-BROCK; VAUGHAN; VOLLMER, 2017).

Lamiaceae é uma família de angiospermas representada por muitas espécies cujos óleos essenciais são utilizados na medicina, na culinária, cosméticos, aromatizantes, etc. Dentre estas espécies está *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling, uma planta aromática arbustiva (Figura 3.1) típica de regiões pedregosas e arenosas, encontrada em alguns municípios do Rio Grande do Sul, Brasil. (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006; SCHAEFER; ESSI, 2017). Ela é popularmente conhecida como “espanta-pulga” devido seus compostos químicos presentes no óleo essencial, o qual possui com propriedades antiparasitárias, alelopáticas e anestésicas, encontrado principalmente nas folhas e flores (PINHEIRO; OLIVEIRA; HEINZMANN, 2018; PINHEIRO et al., 2017; RIBEIRO et al., 2010; TONI et al., 2014).

Figura 3.1 – *Hesperozygis ringens* no seu habitat em solos pedregosos típicos da sua espécie (A,B).



Fonte: Leite L.G. e Essi L.

A verificação dos efeitos alelopáticos do óleo essencial desta espécie foi realizada por alguns autores na germinação de sementes em *Lactuca sativa* L. (alface), *Bidens pilosa* L. (picão-preto), *Lolium multiflorum* Lam. (azevém), *Avena strigosa* Schreb. (aveia-preta), *Glycine max* (L.) Merr. (soja) e *Oryza sativa* L. (arroz). Os resultados encontrados mostraram danos causados nas radículas e inibição do crescimento do hipocótilo e, em alguns casos, a morte da planta (LIMA et al., 2020; PINHEIRO et al., 2017; VON POSER et al., 1996). Isso propicia a possibilidade da sua utilização como herbicida natural, uma vez que, os sintéticos apresentam grande persistência no ambiente e poluem, o que pode causar intoxicação e efeitos mutagênicos e carcinogênicos nas células (ABOUZIENA; HAGGAG, 2016).

Os efeitos parasitários de seus compostos foram testados no carrapato-de-boi (*Rhipicephalus microplus*), no qual causou morte de ovos e larvas (RIBEIRO et al., 2010). A possibilidade de torná-lo um acaricida natural é relevante pelas vantagens de poder substituir os sintéticos, visto que esses últimos se tornam ineficazes contra carrapatos que adquirem resistência rapidamente e menor toxicidade aos animais (BENELLI; PAVELA, 2018; SALMAN, et al., 2020).

Uma das propriedades descobertas mais recentemente, surgiu na aquicultura pela crescente procura por anestésicos seguros e baratos capazes de reduzir o estresse dos peixes durante procedimentos de captura e manuseio. Para isso, foi testado o óleo essencial de *H. ringens* em *Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard (jundiá), na qual foram evidenciados efeitos sedativos e anestésicos (SILVA et al., 2013; TONI et al., 2014, 2015).

Ainda na aquicultura, porém em outra linha de ação, também foi testado o óleo essencial em larvas de insetos da ordem Odonata. Esses insetos são encontrados nos tanques de piscicultura e podem atacar larvas, pós-larvas e alevinos de *R. quelen*. Os gêneros *Acanthagrion*, *Homeoura*, *Ischnura* e *Oxyagrion* da família Coenagrionidae foram afetados com a exposição ao óleo essencial (SILVA et al., 2014). Há estudos da sua propriedade bactericida em *Daphnia pulex*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Citrobacter freundii*, *Raoltella ornithinolytica* e *Gyrodactylus* sp (BANDEIRA JR et al., 2017).

A composição química do óleo essencial foi verificada por métodos de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, extração assistida por ultrassom e tipos de cromatografia. *H. ringens* apresenta em torno de 20 substâncias identificadas principalmente terpenos: pulegona (79-96%), limoneno (0,7-2,7%) e linalol (0,5-

1,6%), e os demais compostos com valores geralmente abaixo de 1% (RIBEIRO et al., 2010; ROSA et al., 2019; TONI et al., 2014; VON POSER et al., 1996). Compostos fenólicos também foram detectados, sendo como principal, o ácido rosmarínico conhecido por suas propriedades medicinais (DOLWITSCH et al., 2020).

Embora a espécie em estudo apresente um potencial em diferentes linhas de ação e a possibilidade da elaboração de produtos naturais, ainda não há relatos sobre efeitos citotóxicos e mutagênicos. Conforme testes realizados com extratos aquosos de *H. ringens* por Dolwitsch et al. (2020), seus resultados os indicaram não serem danosos em linfócitos humanos nas concentrações avaliadas. Um dos métodos de avaliação de toxicidade de extratos é o uso de bioindicadores. Os bioensaios com *Allium* são capazes de verificar a possível genotoxicidade de diversos tipos de agentes químicos, físicos e biológicos (FISKESJÖ, 1985). Esse teste é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) como eficiente na avaliação de irregularidades cromossômicas em raízes de *Allium*, e no monitoramento *in situ* da genotoxicidade de poluentes ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; CABUGA, 2017). Além de avaliar os impactos no ambiente, o teste *Allium cepa* também avalia os efeitos de substâncias de extratos de plantas medicinais, aromáticas e produtos naturais (DA SILVA; BOSSO; CARDOSO, 2015; LIMAN; CIĞERCI; GÖKÇE, 2018; STURBELLE et al., 2010).

Em virtude do potencial na aplicação de uso animal se percebe a necessidade de verificar se há riscos dos extratos aquosos de *H. ringens* causarem alterações cromossômicas nesses indivíduos. O objetivo do trabalho foi avaliar a possível genotoxicidade e citotoxicidade de extratos aquosos de *H. ringens* pelo teste *Allium cepa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As plantas foram coletadas de populações de quatro municípios do Rio Grande do Sul, Brasil: Santa Maria, Caçapava do Sul, São Francisco de Assis e São Pedro do Sul. Para as análises de citotoxicidade e genotoxicidade, foram coletadas e pesadas amostras de folhas de cada uma das populações as quais foram colocadas para secar naturalmente em temperatura ambiente. Uma amostra de cada população foi

herborizada e depositada no Herbário SMDB, como voucher para o estudo (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Lista dos vouchers de *H. ringens* das populações utilizadas no estudo.

Município	Latitude (S)	Longitude (W)	Voucher
Santa Maria	29,634999	53,878889	L. Leite e L. Essi, Nro1
Caçapava do Sul	30,438611	53,447222	L. Leite e L. Essi, Nro2
São Francisco de Assis	29,594167	55,13111	L. Leite e L. Essi, Nro3
São Pedro do Sul	29,607386	54,302583	L. Leite e L. Essi, Nro4

Preparação dos extratos aquosos

Os extratos aquosos foram preparados a partir das folhas secas de *H. ringens* e foram utilizadas duas concentrações 4g.L⁻¹, 8g.L⁻¹ para cada uma das quatro populações conforme mostra a Tabela 3.2.

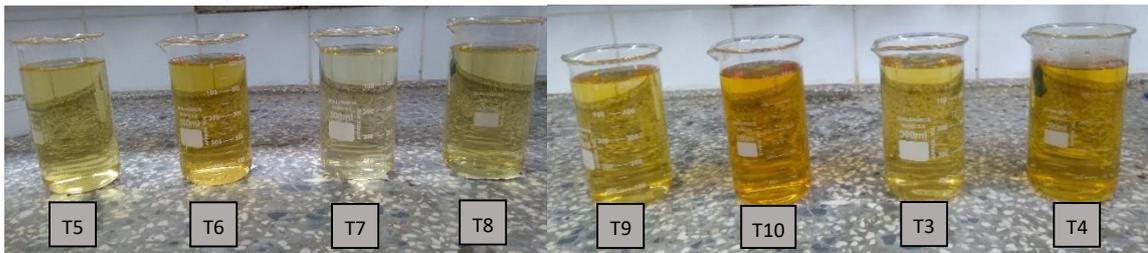
Tabela 3.2 – Lista dos tratamentos do teste *Allium cepa*.

Tratamentos	Concentrações e Populações
Tratamento 1 (T1)	Água (controle negativo)
Tratamento 2 (T2)	Glifosato 2% (controle positivo)
Tratamento 3 (T3)	4g.L ⁻¹ – Santa Maria (SM)
Tratamento 4 (T4)	8g.L ⁻¹ – Santa Maria (SM)
Tratamento 5 (T5)	4g.L ⁻¹ – Caçapava do Sul (CP)
Tratamento 6 (T6)	8g.L ⁻¹ – Caçapava do Sul (CP)
Tratamento 7 (T7)	4g.L ⁻¹ – São Francisco de Assis (SF)
Tratamento 8 (T8)	8g.L ⁻¹ – São Francisco de Assis (SF)
Tratamento 9 (T9)	4g.L ⁻¹ – São Pedro do Sul (SP)
Tratamento 10 (T10)	8g.L ⁻¹ – São Pedro do Sul (SP)

As folhas foram pesadas e postas em água destilada para aquecer. Após ebulição foram deixadas em infusão por 10 minutos. Em seguida, os extratos foram

coados e resfriados à temperatura ambiente para posteriormente serem utilizados como tratamentos nos bulbos de *Allium cepa* (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Infusões preparadas com as folhas secas de *H. ringens*. A numeração identifica os tratamentos do experimento conforme a Tabela 3.2: T5 – Tratamento 5; T6 – Tratamento 6; T7 – Tratamento 7; T8 – Tratamento 8; T9 – Tratamento 9; T10 – Tratamento 10; T3 – Tratamento 3; T4 – Tratamento 4.



Fonte: Leite L.G.

Para determinar o índice mitótico e avaliar as possíveis alterações celulares foi utilizado o tecido meristemático das radículas de *A. cepa*. Na etapa inicial, 40 bulbos de cebola adquiridos em fornecedor do município de Santa Maria, tiveram suas antigas raízes raspadas e essas colocadas para enraizar em água destilada durante 72 horas. Após o enraizamento, formaram-se 10 grupos (tratamentos) cada um com 4 bulbos (repetições) para serem submetidos aos tratamentos por um período de 24 horas. Para controle negativo foi utilizada água destilada e para controle positivo, glifosato a 2%, comprovadamente indutor de alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa*. Decorrido o tempo de tratamento, as raízes foram coletadas e fixadas em etanol: ácido acético (3:1) por 24 horas e posteriormente armazenadas sob refrigeração em etanol 70% até sua utilização para a confecção das lâminas.

Preparação das Lâminas

As lâminas foram preparadas utilizando-se de uma metodologia adaptada de Guerra e Souza (2002). Radículas com aproximadamente 5 mm foram hidrolisadas em HCl 1N por 5 minutos e, após lavadas em água destilada, sendo essas utilizadas para a análise da divisão celular das raízes dos bulbos de cebola. A região meristemática foi esmagada com auxílio de um pequeno bastão de vidro, aplicada a uma gota do corante orceína acética 2% sobre o material e colocada uma lamínula.

As lâminas foram observadas ao microscópio óptico com o aumento de 40X, e então analisadas. Foi realizada a contagem total de células do campo em divisão ou não, levando em consideração as análises das fases da divisão celular e alterações cromossômicas.

Na análise das lâminas foram contadas 500 células para cada uma das duas lâminas de cada bulbo. Ao todo foram 1.000 células por bulbo, quatro repetições para cada um dos dez tratamentos, totalizando 40.000 células analisadas. O índice mitótico foi obtido pela divisão do número de células em divisões pelo número total de células observadas multiplicado por 100, obtendo-se o valor de IM em porcentagem (%). $IM = (\text{células em divisão} / \text{número total de células observadas}) \times 100$. O potencial genotóxico é relacionado à quantidade de alterações celulares encontradas.

Análise Estatística

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os resultados obtidos pelo teste de *Allium cepa* foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) pelo teste de comparação de médias Scott-Knott, através do software SISVAR, com 5% de probabilidade (BONCIU et al., 2018; FERREIRA; SISVAR, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3.3 são apresentados os valores das células analisadas em cada uma das fases da divisão celular, bem como o índice mitótico (IM). Em comparação com o controle negativo (IM=7,1), os demais tratamentos se mostraram significativamente diferentes deste, o que foi observado pela ocorrência de um efeito inibitório nas divisões celulares nos tratamentos com *H. ringens*. O tratamento T10 mostrado em (Figura 3.3B), mostra a forte ação antiproliferativa com a ausência de divisões celulares.

Tabela 3.3 – Índice mitótico em cada um dos tratamentos e número de células encontradas em cada fase do ciclo celular.

Tratamento	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	IM %
T1 - Água	3716	134	65	27	58	7,1 c
T2 – Glifosato 2%	3883	80	19	5	13	2,9 b
T3 – 4g.L⁻¹ SM	3876	118	0	1	5	3.1 b
T4 – 8g.L⁻¹ SM	3984	16	0	0	0	0,4 a
T5 – 4g.L⁻¹ CP	3837	161	1	0	1	4 b
T6 – 8g.L⁻¹ CP	3968	28	0	0	4	0,8 a
T7 – 4g.L⁻¹ SF	3892	117	1	1	4	3 b
T8 – 8g.L⁻¹ SF	3877	84	8	0	16	2,7 b
T9 – 4g.L⁻¹ SP	3979	21	0	0	0	0,5 a
T10 – 8g.L⁻¹ SP	3996	4	0	0	0	0,1 a

*Letras diferentes na última coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). IM = Índice Mitótico; SM – Santa Maria; CP – Caçapava do Sul; SF – São Francisco de Assis; SP – São Pedro do Sul.

Esses resultados, por meio do teste *Allium cepa*, são semelhantes aos efeitos ocorridos em outras lamiáceas que possuem óleos essenciais com propriedades medicinais como *Plectranthus barbatus* Andrews, *Mentha spicata* L., *Lavandula angustifolia* Mill. (BARDAWEEL et al., 2018; BEZERRA, OLIVEIRA, 2016; NIKSIC et al., 2016). Os compostos químicos presentes no óleo essencial de *H. ringens* como os terpenos (pulegona, limoneno e linalol) e compostos fenólicos (ácido rosmarínico) podem também ser os responsáveis por promover este tipo de ação (DOLWITSCH et al., 2020; RIBEIRO et al., 2010; ROSA et al., 2019; TONI et al., 2014; VON POSER et al., 1996). *Mentha pulegium* L., também apresentou efeito antiproliferativo com a aplicação do mesmo teste deste experimento. *M. pulegium*, que assim como *H. ringens* tem como seu principal composto a pulegona, porém com a combinação de compostos diferentes formadores do óleo essencial que variam de espécie para espécie (TEDESCO et al., 2012).

Nos tratamentos a 4 g.L⁻¹, tratamentos T3, T5 e T7, não diferiram estatisticamente entre si, o que não ocorreu em T9. A população de São Pedro do Sul apresentou baixo índice mitótico decrescendo ainda mais ao dobrar a concentração. De maneira semelhante, os tratamentos T4, T6 e T10 a 8 g.L⁻¹, também não diferiram

entre si, com exceção de apenas um tratamento, T8. A população de São Francisco de Assis mesmo na concentração mais alta manteve alto índice mitótico.

As diferenças significativas no ciclo celular entre as populações podem ser em decorrência a diversos fatores. Embora tenham sido utilizados os mesmos procedimentos (extração, secagem e preparação das infusões), fatores ambientais como o clima, relevo, altitude, épocas do ano, e também fatores internos como a diversidade genética entre as populações podem influenciar na variabilidade e porcentagem do óleo essencial contidos nas folhas (GASMALLA et al., 2017; LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003; PRINS; VIEIRA; FREITAS, 2010).

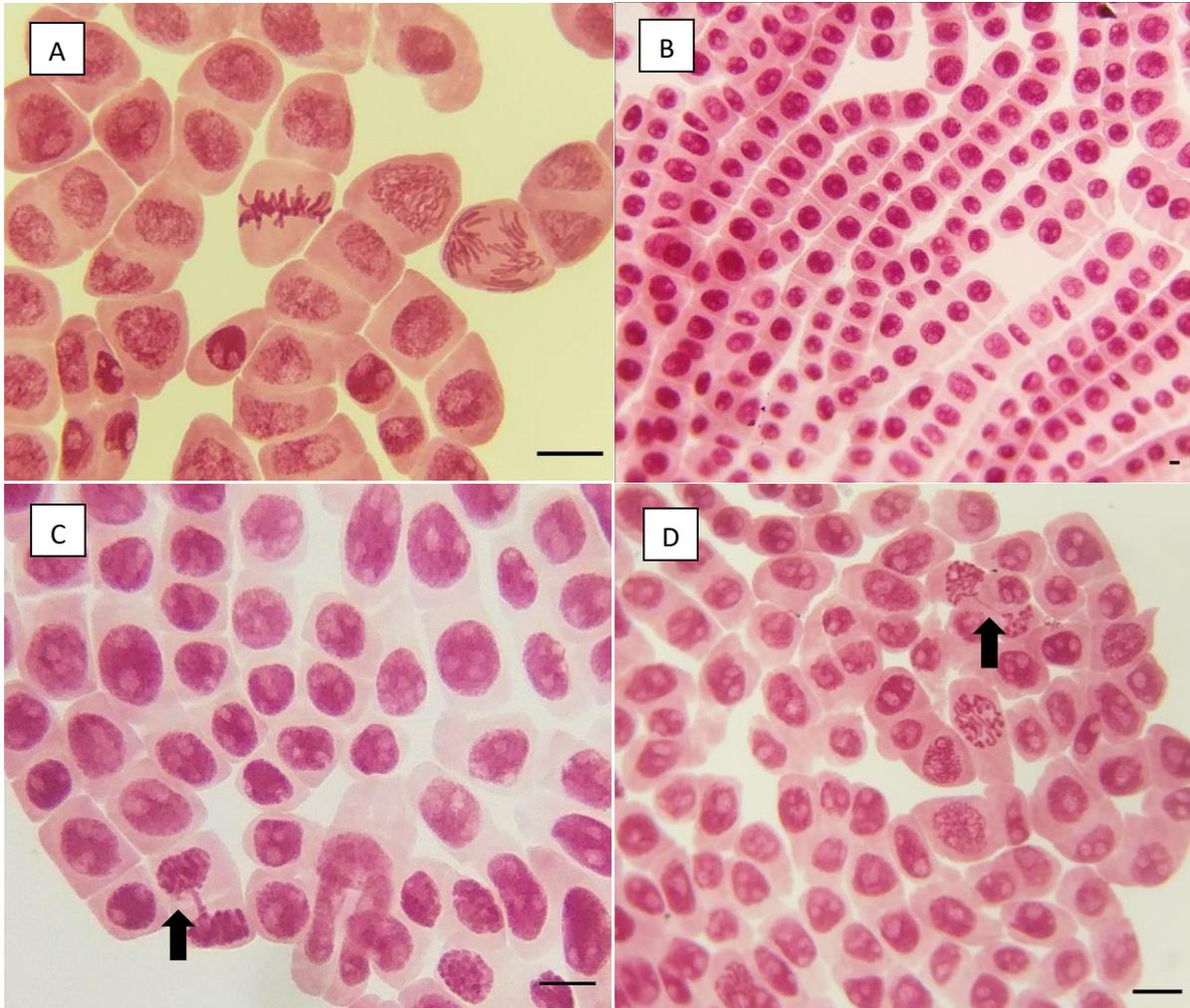
A sazonalidade é um fator importante, mas que neste caso não se mostra o principal responsável pela distinção nos resultados. Pinheiro et al. (2016) observaram em *H. ringens* que a maior quantidade de óleo essencial se dá nas épocas de primavera e verão. As coletas que foram realizadas nestas estações foram as populações em Caçapava do Sul, São Francisco de Assis e São Pedro do Sul. A única população coletada no início no inverno foi em Santa Maria. Porém, as variadas colorações das infusões, como mostra a Figura 3.2, sugerem que os resultados encontrados possuem outros fatores que se sobressaíram (FIGUEIREDO et al., 2008).

Labra et al. (2004) destacou variações do óleo essencial em decorrência de diferentes características morfológicas nas plantas: variações de altura, comprimento, largura e distintas formas de folhas. Neste caso, o crescimento e o desenvolvimento influenciados pelos ambientes de cada população e características genéticas são também fatores que têm sua importância e devem ser levados em consideração.

De forma geral, os resultados mostraram diferenças significativas na comparação entre controle negativo, 4 g.L⁻¹ e 8 g.L⁻¹. Isso indica a ação antiproliferativa em diferentes níveis de forma crescente e de acordo com a concentração aplicada.

Com relação às análises do comportamento dos cromossomos, o tratamento 4, foram observadas alterações cromossômicas, sendo a formação de pontes em telófases em apenas duas células das lâminas analisadas (Figura 3.3C,D). Não foram encontrados micronúcleos nos tratamentos. Esta população (Santa Maria) foi a primeira a ser coletada e permaneceu armazenada até ocorrerem todas as demais coletas.

Figura 3.3 – Análise mitótica em *Allium cepa* L.: (A) Células em divisão celular em T1: água. Destaque para metáfase e anáfase; (B) Células em interfase em T10: 8g.L⁻¹ SP; e (C,D) Formação de pontes em T4: 8g.L⁻¹ SM. Escala = 20 µm.



Fonte: Imagens registradas no microscópio eletrônico.

A forma, as condições e o período de armazenamento causam variações nos efeitos biológicos dos óleos essenciais. Laher et al. (2013), mostraram que maiores períodos de armazenamento indicam alterações nas propriedades antibacterianas e antioxidantes, na quantidade de compostos fenólicos e até formação de novos compostos, consequentemente, novas propriedades. Em *Hyptis pectinata* (L.) Poit., que também apresenta terpenos no óleo essencial, foram relatadas mudanças na composição química pela influência da temperatura e do tempo de armazenamento (JESUS et al., 2016).

De forma semelhante, em *Mentha pulegium* L. foram encontradas apenas duas células com alterações cromossômicas. (TEDESCO et al., 2012). Ainda assim, os

resultados apresentados neste experimento corroboram com os resultados encontrados por Bastaki et al. (2020), que apontam que a pulegona não possui efeitos mutagênicos ou genotóxicos. Por outro lado, em teste com o ácido rosmarínico, outro composto presente em *H. ringens*, foi detectado algumas irregularidades e efeitos citotóxicos para este composto (DOLWITSCH et al., 2020; LIMAN; CIĞERCI; GÖKÇE, 2018).

CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados conclui-se que os extratos aquosos de *H. ringens* possuem efeito antiproliferativo, que foi destacado nas populações testadas. A espécie não apresenta efeitos mutagênicos ou genotóxicos significativos.

REFERÊNCIAS

- ABOUZIENA, H. F.; HAGGAG, W. M. Weed control in clean agriculture: a review. **Planta daninha**, v. 34, n. 2, p. 377-392, 2016.
- BANDEIRA JR, G. et al. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 484-491, 2017.
- BARDAWEEL, S. K. et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata* L.(Lamiaceae) from Algerian Saharan atlas. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 2018.
- BASTAKI, M. et al. Absence of mutagenic activity in the bacterial reverse mutation assay with pulegone and peppermint oil. **Toxicology Research and Application**, v. 4, p. 2397847320938666, 2020.
- BENELLI, G.; PAVELA, R. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks—a systematic review. **Acta Tropica**, v. 179, p. 47-54, 2018.
- BEZERRA, C. M.; OLIVEIRA, M. A. S. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade do infuso de Malva-Santa (*Plectranthus barbatus*-Lamiaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 13, n. 4, p. 220-228, 2016.
- BONCIU, E. et al. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191-209, 2018.

- CABUGA JR, C. C. *Allium cepa* test: An evaluation of genotoxicity. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 7, n. 1, p. 12, 2017.
- CARDOSO, G. H. S. et al. Cytotoxicity of aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* L.(Labiatae) in plant test system. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 4, p. 886-889, 2014.
- DOLWITSCH, C. B. et al. *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: a study involving extraction, chemical profiling, antioxidant and biological activity. **Natural product research**, p. 1-6, 2020.
- FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.
- FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of Southern Brazil. **Biochemical genetics**, v. 44, n. 11-12, p. 471-482, 2006.
- FRANZIOS, G. et al. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2690-2694, 1997.
- GASMALLA, M. A. A. et al. Effect of different drying techniques on the volatile compounds, morphological characteristics and thermal stability of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 6, p. 1399-1406, 2017.
- JESUS, A. S. et al. Influence of storage time and temperature on the chemical composition of the essential oil of *Hyptis pectinata* L. Poit. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 336-340, 2016.
- LABRA, M. et al. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. **Plant science**, v. 167, n. 4, p. 725-731, 2004.
- LACERDA, L. P.; MALAQUIAS, G.; PERON, A. P. Antiproliferative action of aqueous extracts of *Hymenaea stigonocarpa* Mart.(Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1147-1150, 2014.
- LAHER, F. et al. Evaluating the effect of storage on the biological activity and chemical composition of three South African medicinal plants. **South African journal of botany**, v. 88, p. 414-418, 2013.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

- LIMA, C. S. et al. Allelopathic Potential of *Hesperozygis ringens* Extracts on Seed Germination of Soybeans and Beggarticks, **Journal of Agricultural Science** v. 12, n. 11, 2020.
- 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.
- LIMAN, R.; CIĞERCI, İ. H.; GÖKÇE, S. Cytogenetic and genotoxic effects of Rosmaniric Acid on *Allium cepa* L. root meristem cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 444-449, 2018.
- NIKOLOVA, M. T.; BERKOV, S. H. Use of Essential Oils as Natural Herbicides. **Ecologia Balkanica**, v. 10, n. 2, 2018.
- NIKSIC, H. et al. Phytochemical and pharmacological (antiproliferative) effects of essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. Lamiaceae. **Planta Medica**, v. 82, n. S 01, p. P323, 2016.
- PINHEIRO, C. G.; OLIVEIRA, J. M. S.; HEINZMANN, B. M. Structural characterization of vegetative organs of the endangered Brazilian native species *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2887-2901, 2018.
- PINHEIRO, C. G. et al. Essential oil of the Brazilian native species *Hesperozygis ringens*: a potential alternative to control weeds. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 3, p. 701-711, 2017.
- PINHEIRO, C. G. et al. Seasonal variability of the essential oil of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 176-184, 2016.
- PRINS, C. L.; VIEIRA, I. JC; FREITAS, S. P. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 91-102, 2010.
- 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, n. 7, p. 2506-2509, 2010.
- ROSA, I. A. et al. Extracts of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: in vitro and in vivo antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1353-1361, 2019.
- SALMAN, M. et al. Repellent and acaricidal activity of essential oils and their components against *Rhipicephalus* ticks in cattle. **Veterinary Parasitology**, p. 109178, 2020.
- SCHAEFER, J.; ESSI, L. A checklist of Asteraceae from Pedra do Lagarto, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Check List**, v. 13, p. 1075, 2017.

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.

SOUTAR, O.; COHEN, F.; WALL, R. Essential oils as tick repellents on clothing. **Experimental and Applied Acarology**, v. 79, n. 2, p. 209-219, 2019.

STAFFORD, G. I.; JÄGER, A. K.; VAN STADEN, J. Effect of storage on the chemical composition and biological activity of several popular South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 107-115, 2005.

TEDESCO, M. et al. POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Mentha pulegium* L. PELO TESTE DE *Allium cepa* L. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 8, n. 15, 2012.

TONI, C. et al. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 701-714, 2014.

TONI, C. et al. Stress response in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to the essential oil of *Hesperozygis ringens*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 129-138, 2015.

VIEIRA-BROCK, P. L.; VAUGHAN, B. M.; VOLLMER, D. L. Comparison of antimicrobial activities of natural essential oils and synthetic fragrances against selected environmental pathogens. **Biochimie open**, v. 5, p. 8-13, 2017.

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 agricultural and food chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1829-1832, 1996.

CAPÍTULO 4: DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Hesperozygis ringens* (BENTH.) EPLING (LAMIACEAE): SITUAÇÃO ATUAL EM POPULAÇÕES NATURAIS DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Leandro Gonçalves Leite, Jean Lucca Soares Hofstadler Leonardo, Ana Cristina Mazzocato, Liliana Essi

RESUMO

Hesperozygis ringens é uma espécie nativa e endêmica do Rio Grande do Sul. Essa planta arbustiva pertencente à Lamiaceae é encontrada em locais restritos nos solos arenosos e pedregosos de alguns municípios. As populações registradas estão situadas em áreas pouco preservadas e de frequentes atividades agrícolas e florestais. Esses e outros fatores, incluindo as poucas populações existentes, fazem com que a espécie seja classificada como ameaçada de extinção. *Hesperozygis ringens* é conhecida como “espanta-pulga” devido às propriedades antiparasitárias dos compostos químicos de seu óleo essencial. Porém, estudos concentrados na caracterização genética das populações e seu acompanhamento são insuficientes. O objetivo deste trabalho foi verificar a diversidade genética das populações de *H. ringens* utilizando populações de quatro municípios: Caçapava do Sul, São Francisco de Assis, Santa Maria e São Pedro do Sul. As folhas foram coletadas, armazenadas em sílica gel e transportadas ao laboratório. Na extração de DNA total foi utilizado o método CTAB e as amplificações foram realizadas com sete *primers* ISSR. Os dados foram tabulados em planilhas Excel e analisados nos softwares: *GenAlEx* e *Structure*. As amplificações resultaram em 384 *loci* e o percentual de *loci* polimórfico apresentou média de 59,44%. Foram registrados baixos índices de diversidade genética, com médias de: índice de Shannon (H') = 0,267 e diversidade (h) = 0,170. O Teste de Mantel indicou que não há correlação significativa entre distância genética e distância geográfica. A AMOVA apontou que há maior variância dentro das populações (89%) do que entre as populações (11%). Os gráficos da PCoA e da inferência bayesiana mostraram que a espécie apresenta boa estrutura populacional. As novas informações de populações que ainda não haviam sido estudadas contribuíram significativamente com a análise da variação das demais populações e na ampliação do entendimento geral dessa espécie. São necessárias estratégias de preservação dos habitats das populações estudadas e estratégias de reprodução que aumentem a diversidade genética da espécie.

Palavras-chave: Espécie Ameaçada. ISSR. Bioma Pampa. Óleos Essenciais.

INTRODUÇÃO

Lamiaceae é uma família botânica representada por diversas espécies aromáticas de grande importância, conhecidas principalmente pelo uso comercial: são medicinais, alimentícias e componentes de cosméticos. A família apresenta 236 gêneros e 7170 espécies distribuídas pelo mundo (GIULIETTI et al., 2005; KARPIŃSKI, 2020). Em território brasileiro, ela é representada por 70 gêneros e 589 espécies (ANTAR et al., 2021). Dentre essa diversidade está inserido o gênero *Hesperozygis* Epling, distribuído pelo sul e sudeste do Brasil com sete espécies descritas, incluindo *H. ringens* (ANTAR; OLIVEIRA, 2021).

Esta espécie nativa é popularmente conhecida como “espanta-pulga” devido aos efeitos biológicos dos compostos químicos presentes em seu óleo essencial que possui propriedades antiparasitárias (RIBEIRO et al. 2010; VON POSER et al., 1996). Estudos posteriores identificaram outras características e aplicações desses compostos como: ação anestésica e sedativa, ação alelopática e ação bactericida (LIMA et al., 2020; PINHEIRO et al., 2017; ROSA et al., 2019; TONI et al., 2014).

O forte odor característico dessa planta aromática é facilmente detectado nos poucos locais, geralmente arenosos e pedregosos, onde ela é encontrada no Rio Grande do Sul. É uma planta arbustiva (Figura 4.1) que apresenta flores típicas das lamiáceas: pentâmeras, bilabiadas, zigomorfas e diclamídeas. Apresenta folhas opostas de forma ovada, consistência membranácea, indumento piloso a tomentoso, as bases e ápices são agudos e a margem da folha é inteira ou crenulada (ANTAR; OLIVEIRA, 2021; DREW; SYTSMA, 2012; VIANA et al., 2018).

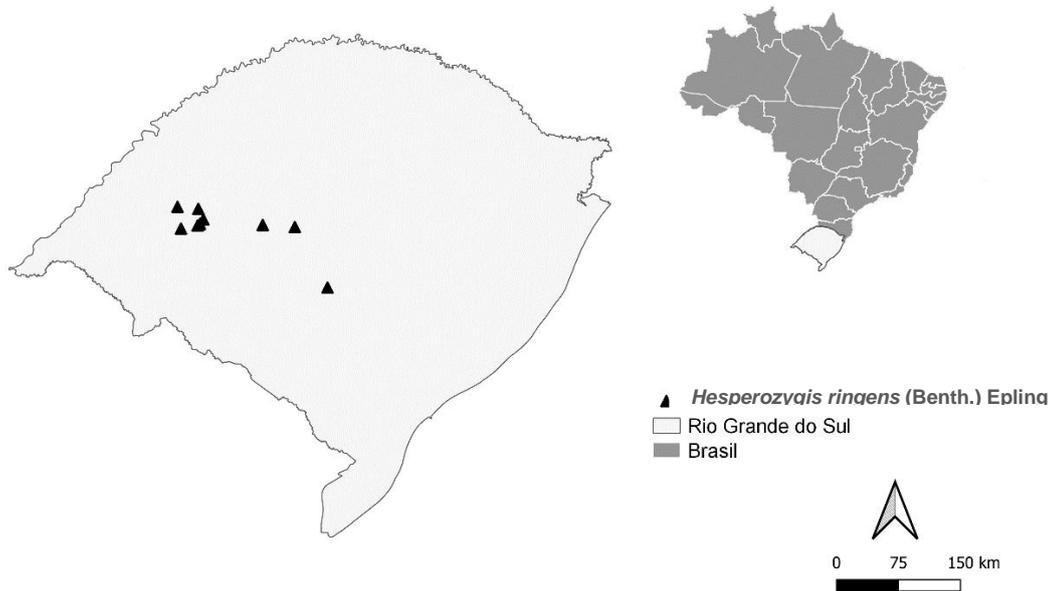
Figura 4.1 – *Hesperozygis ringens* em seu habitat: (A) morfologia de uma flor típica das lamiáceas; (B) espécie com hábito arbustivo.



Fonte: Leite L.G. e Essi L.

Ainda que os estudos com a espécie em várias áreas de ação sejam promissores, *H. ringens* apresenta poucas populações registradas e está presente na Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção como vulnerável (VU) (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014). As primeiras populações encontradas situam-se na região sudoeste do estado em Alegrete e São Francisco de Assis e próximas à região da campanha em Caçapava do Sul (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006; VON POSER et al., 1996). Recentemente, foram feitos mais dois registros na região central do estado nos municípios de Santa Maria e São Pedro do Sul (Figura 4.2) (DE MENEZES; ESSI, 2016; PIRES et al., 2020; SCHAEFER; ESSI, 2017).

Figura 4.2 – Mapa de distribuição das populações de *H. ringens* no Rio Grande do Sul



Fonte: Mapa construído no software Qgis.

Além disso, as áreas em que essas populações estão passando por transformações ocorrentes desde longos períodos, que resultam na perda de habitats e na diminuição da diversidade biológica. Os campos sulinos do Brasil já perderam, nas suas últimas décadas, 50% de sua cobertura natural (ANDRADE et al., 2015; CORDEIRO; HASENACK, 2009; STAUDE et al., 2018). No Rio Grande do Sul, a redução é ainda maior, com somente 30% da área de todo o estado apresentando cobertura natural.

Processos físicos, químicos e biológicos ocorrem naturalmente nos ecossistemas e modificam a paisagem. Contudo, o uso da terra de maneira indiscriminada pelo ser humano, o torna o principal agente causador de mudanças de grande impacto em períodos curtos de tempo. As populações de *H. ringens* estão situadas em regiões do bioma Pampa e em regiões em transição deste com a Mata Atlântica. Dos 30% de área ainda preservada do Pampa, a maior parte são formações campestres. Atividades na agricultura e silvicultura têm expansão acelerada, em contrapartida a pecuária mantém certa integridade de áreas por usar campos nativos (CORDEIRO; HASENACK, 2009).

Processos naturais como o de arenização ocorrem principalmente em decorrência da ação dos ventos e da precipitação, causando movimentação do solo, soterramentos e retirada da cobertura vegetal e, conseqüentemente, promovendo modificações nas regiões do sudoeste do Rio Grande do Sul (DE FREITAS et al., 2010; FREITAS et al., 2009; ROVEDDER et al., 2005). O patrimônio genético do Pampa, único pela diversidade vegetal que conta com espécies nativas e ameaçadas, se torna mais vulnerável em relação a outros biomas por não ser prioridade de conservação e devido ao baixo nível de proteção ambiental (DE FREITAS et al., 2020; OVERBECK et al., 2015).

Devido a todos esses fatores que tornam *H. ringens* ameaçada e a escassez de informações sobre a espécie, é fundamental um estudo para a compreensão da variabilidade genética e estrutura populacional, visto que estes representam o princípio para adaptação e permanência das espécies. Populações com reduções drásticas de tamanho e fragmentação de hábitat podem levar a gargalos resultando em alta endogamia e diminuição da diversidade genética (GONZÁLEZ et al., 2020; HATZIKOTOULOS; GILLY; ZEGGINI, 2014).

No presente trabalho optou-se pela utilização de marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) pela vantagem de ser um marcador com alto polimorfismo de bandas, sem a necessidade do conhecimento prévio do genoma da espécie (GROVER; SHARMA, 2016; HOFFMANN, BARROSO, 2006; NADEEM et al., 2018). Fracaro & Echeverrigaray (2006) conduziram um primeiro estudo sobre a variabilidade genética da espécie utilizando marcadores ISSR e RAPD em populações de Alegrete, São Francisco de Assis e Caçapava do Sul. Dentre as populações utilizadas, elas se mostraram bem estruturadas, com pouca variabilidade intraespecífica, porém significativamente distintas entre as populações, presumindo a ocorrência de fenômenos de deriva genética e endogamia (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006).

Com a inclusão de populações da região central e informações sobre o cenário atual da espécie, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de populações de *H. ringens* utilizando marcadores ISSR e, dessa forma, contribuir com mais informações relevantes para o conhecimento e conservação da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As plantas foram coletadas em populações localizadas em quatro municípios do Rio Grande do Sul: Caçapava do Sul, Santa Maria, São Francisco de Assis e São Pedro do Sul, com as devidas licenças ambientais (SISBIO). Foram coletadas folhas de aproximadamente trinta indivíduos distintos de cada população e, após, transportadas em sacos plásticos com sílica gel onde permaneceram armazenadas em temperatura ambiente até a extração do DNA. Uma amostra de cada população foi herborizada e depositada como voucher no Herbário SMDB da Universidade Federal de Santa Maria, como mostra a Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Lista dos vouchers de *H. ringens* das populações utilizadas no estudo.

Município	Latitude (S)	Longitude (W)	Voucher
Santa Maria	29,634999	53,878889	L. Leite e L. Essi, Nro1
Caçapava do Sul	30,438611	53,447222	L. Leite e L. Essi, Nro2
São Francisco de Assis	29,594167	55,13111	L. Leite e L. Essi, Nro3
São Pedro do Sul	29,607386	54,302583	L. Leite e L. Essi, Nro4

Isolamento do DNA total

A extração do DNA total foi realizada através do método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle e Doyle (1987), adaptado a tubos de microcentrífuga. Foi utilizado 50 mg de material foliar macerados em nitrogênio líquido. A integridade e a quantificação do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed, em tampão TBE 0,5X (Tris, ácido bórico, EDTA). As amostras foram comparadas com DNA padrão (λ). Alíquotas padronizadas (20-25 ng de DNA) para as reações de PCR foram preparadas em água ultrapura estéril.

Amplificação ISSR-PCR

Ao todo foram testados 25 *primers*, e selecionados os *primers* com maior repetibilidade e informação. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 μL , contendo: H_2O ultrapura (16,3 μL), Buffer 10X “com 20 Mm MgCl_2 ” (2,5 μL), MgCl_2 25 mM (2 μL), primer (1 μL), 200 μM dNTP (1 μL), Taq DNA polimerase (0,2 μL) e DNA amostral (1 μL). As amplificações foram desenvolvidas utilizando um termociclador (MJ Research Minicycler). As condições de amplificação foram estabelecidas em: um ciclo inicial de 5 min a 94 °C; seguido por 40 ciclos a 94 °C por 1 min (desnaturação); 45 seg a temperatura específica de cada *primer* (anelamento); 2 min a 72 °C (extensão); e uma extensão final de 5 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel agarose 1,4% em tampão TBE 0,5X sob voltagem constante de 100 volts. Os produtos amplificados foram comparados para determinação de tamanho com dois *ladders* (50 pb e 1Kb). Os géis foram corados com GelRed e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta, em transiluminador (HOEFER-MacroVue/UV-20).

Análise de Diversidade Genética:

Matrizes no Excel foram elaboradas com os produtos amplificados obtidos na análise dos géis ISSR, codificando a presença ou ausência dos fragmentos, na construção de uma matriz binária (0,1). As matrizes foram utilizadas com as seguintes análises no software *GenAlEx* 6.5: Frequência e Padrões de Bandas, Teste de Mantel, PCoA (Análise de Coordenadas Principais) e AMOVA (Análise de Variância Molecular). O dendrograma UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) foi construído no software *PowerMarker* e a inferência de cluster bayesiana foi realizada utilizando os softwares *Structure* e *Structure Harvester*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos *primers* ISSR testados para *Hesperozygis ringens*, foram selecionados sete *primers* para a amplificação das amostras das quatro populações.

As sequências, as condições de anelamento e o número de bandas estão apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Número de fragmentos obtidos através de marcadores moleculares ISSR em cada primer.

Código	Sequência	T. ° C de Anelamento	Média de Bandas			
			SM	CP	SF	SP
P2	GAGAGAGAGAGAGAGAT	46 ° C	7	4	5	7
F4	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	46 ° C	6	8	10	7
P3	CTCCTCCTCCTCRC	50 ° C	7	7	9	8
P4	CTCTCTCTCTCTCTG	50 ° C	7	6	7	6
P7	CTCTCTCTCTCTCTT	50 ° C	3	5	6	6
O4	ACACACACACACACC	54 ° C	5	5	6	6
I3	ACACACACACACACCT	54 ° C	6	8	7	7

Y = C ou T; R = A ou G; populações: SM – Santa Maria; CP – Caçapava do Sul; SF – São Francisco de Assis e SP – São Pedro do Sul.

Os produtos amplificados com os diferentes *primers* variaram entre 225 pb e 3500 pb. Os padrões e número de bandas de cada primer variaram entre populações e entre os indivíduos, o que proporcionou identificarmos e analisarmos uma grande quantidade de *loci* (384). A Tabela 4.3 apresenta o percentual de *loci* polimórfico, que resultou na média de 59,44%.

Tabela 4.3 – Médias de índices de diversidade genética para os sete *primers*, obtidas pelo GenAlEx.

População	P (%)	Na	Ne	I	H
Santa Maria	55.47	1.109	1.249	0.250	0.159
Caçapava do Sul	60.94	1.219	1.255	0.262	0.165
São Francisco de Assis	64.84	1.297	1.297	0.293	0.187
São Pedro do Sul	56.51	1.130	1.268	0.265	0.170
Média	59.44	1.189	1.267	0.267	0.170

P – Percentual de *loci* polimórfico; Na – Número de alelos diferentes; Ne – Número de alelos efetivos; I – Índice de *Shannon* e h – Diversidade

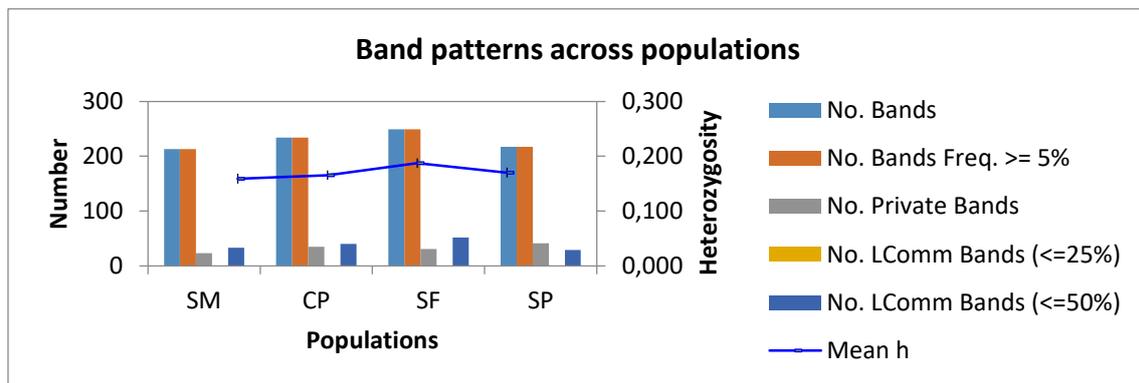
A população de São Francisco de Assis (SF) foi a que apresentou o maior percentual de *loci* polimórfico seguido de Caçapava do Sul (CP), São Pedro do Sul (SP) e Santa Maria (SM). Segundo os resultados de Fracaro e Echeverrigaray (2006), as análises com ISSR resultaram em média de 45% das bandas polimórficas para todas as quatro populações estudadas. As amostras coletadas eram dos municípios

de Alegrete, Caçapava do Sul e São Francisco de Assis. Estes autores também detectaram alta porcentagem de polimorfismo com a utilização de marcadores moleculares RAPD (70,63%), embora que este tipo de marcador amplifica regiões aleatórias do genoma diferentemente dos ISSR que amplificam regiões conservadas entre os minissatélites.

O índice de informação de *Shannon* (*I*) que relaciona a riqueza com a equidade se mostrou baixo para as populações de *H. ringens* com média de 0,267. O baixo valor de índice de diversidade (*h*) também foi observado nas populações com a média de 0,170. Ainda assim, destaca-se que a população de SF foi a única que apresentou valores acima das médias dos respectivos índices.

A Figura 4.3 mostra os padrões de bandas para as diferentes populações, incluindo o número total de bandas, bandas comuns, bandas únicas e a diversidade.

Figura 4.3 – Padrões de bandas das quatro populações de *H. ringens*. Santa Maria (SM), Caçapava do Sul (CP), São Francisco de Assis (SF) e São Pedro do Sul (SP). *h* – Diversidade



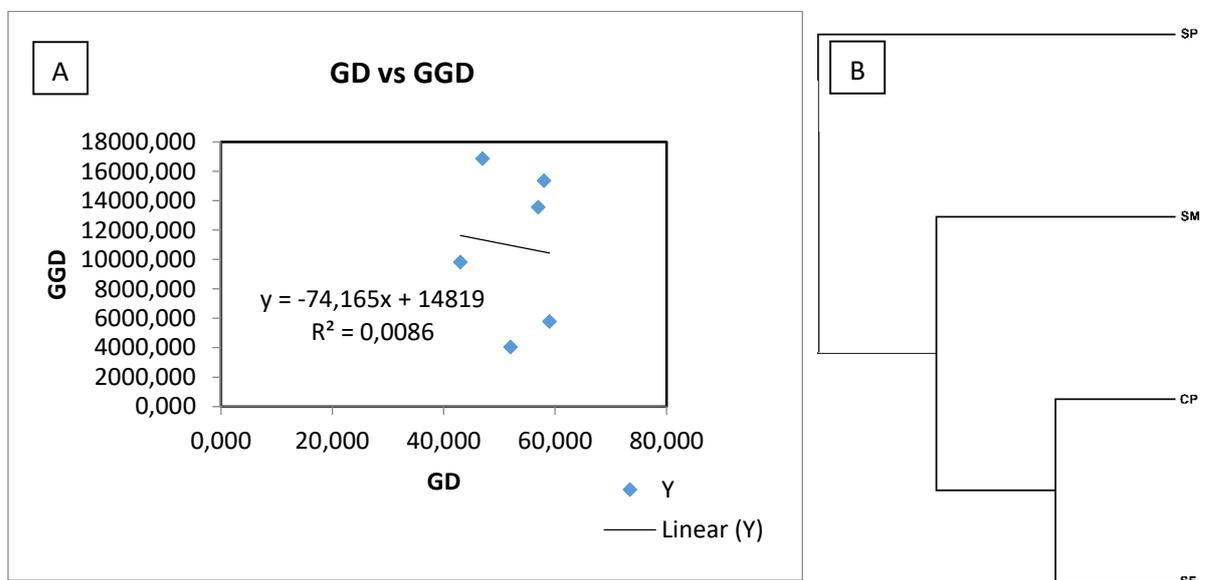
Fonte: Software *GenAlEx*

Populações com maior porcentagem de *loci* polimórfico também apresentaram maior número de bandas proporcionalmente: SF (249), CP (234), SP (217) e SM (213).

Os valores de número de bandas e percentual de *loci* polimórfico são mais aproximados nas populações de SP e SM. Essa relação de dados poderia ser explicada pela distância geográfica entre ambas que configuram as duas populações mais próximas uma da outra (40 km). Porém, o Teste de Mantel (Figura 4.4A) mostra o valor de $R^2 = 0,0086$, o que indica que não há correlação significativa entre distância genética e distância geográfica para as populações de *H. ringens*. A co-ancestralidade das populações é apresentada nos grupos formados no UPGMA gerado no

PowerMarker. De acordo com o dendrograma, foi evidenciado que as populações de Caçapava do Sul e São Francisco de Assis compartilham mais similaridades entre si, consecutivamente são similares à população de Santa Maria, enquanto que a população de São Pedro do Sul apresenta maior divergência com relação às demais (Figura 4.4B). Este agrupamento é corroborado pela análise de PCoA (Figura 4.5), onde a população de São Pedro do Sul aparece como a mais isolada.

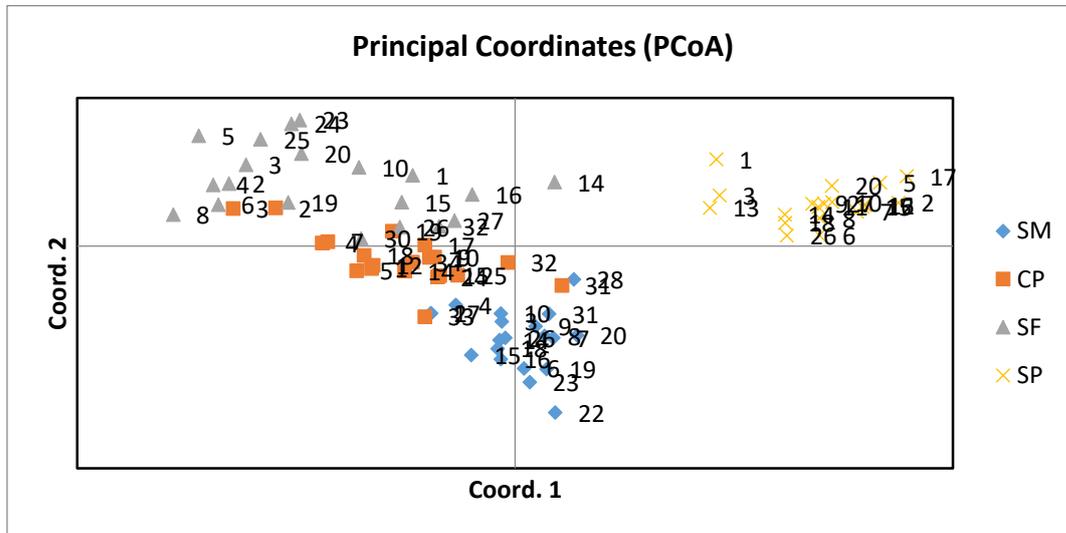
Figura 4.4 – (A) Teste de Mantel que mostra a correlação entre distância genética e distância geográfica e (B) UPGMA com informações sobre a co-ancestralidade das quatro populações de *H. ringens*. GD – Distancia genética; GDD – Distância geográfica; SM – Santa Maria; CP – Caçapava do Sul; SF – São Francisco de Assis e SP – São Pedro do Sul.



Fonte: Software *GenAlEx* e *PowerMarker*.

A Figura 4.5 mostra o gráfico da análise das coordenadas principais (PCoA). De forma nítida, é possível perceber que os indivíduos formam agrupamentos que delimitam as populações.

Figura 4.5 – Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das quatro populações de *H. ringens*. Populações: SM – Santa Maria; CP – Caçapava do Sul; SF – São Francisco de Assis e SP – São Pedro do Sul.



Fonte: Software *GenAlEx*

Essa configuração indica que as populações estão bem estruturadas, o que também confirma os resultados de Fracaro e Echeverrigaray (2006). Segundo os autores, há baixo fluxo gênico entre populações mais distantes, porém, quando analisaram duas populações do mesmo município (CP), este fator mostra-se menos limitado.

Entre outros pontos interessantes a serem observados no gráfico, destaca-se a população de SP como a população em que seus indivíduos não ultrapassam áreas em conjunto com outras populações, sendo as mais isoladas. É percebido também que esta população apresentou o maior número de bandas únicas (Figura 4.3).

A Tabela 4.4 mostra a Análise de Variância Molecular (AMOVA). Os resultados indicaram que 11% da variância molecular é devido às diferenças entre as populações e 89% da variância molecular é devido à divergência dentro das populações.

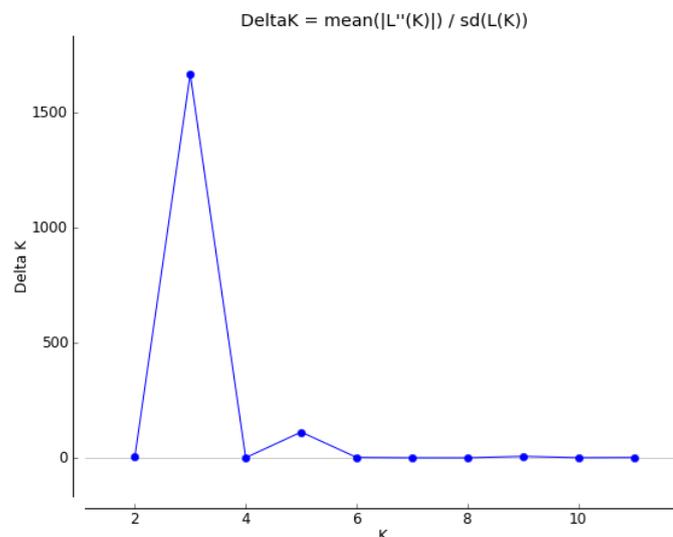
Tabela 4.4 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) das quatro populações inferidas de *H. ringens* produzido no *GenAlEx*.

	GL	SQ	MQ	Est. Var.	%	Stat	Valor	P
Entre Pops	3	360.988	120.329	4.294	11	PhiPT	0.111	0.001
Dentro Pops	76	2618.850	34.459	34.459	89			
Total	79	2979.838		38.752	100			

Dessa forma, embora as populações formem grupos bem estruturados, a maior variabilidade encontrada na espécie está entre os indivíduos das populações a qual pertencem. Os resultados das populações do primeiro estudo diferem destes pois apresentavam pouca variabilidade intrapopulacional. Esse fato pode ser compreendido por terem sido utilizadas populações de maior similaridade, como as populações de SF e CP que formaram um único agrupamento (Figura 4.7). Neste estudo, com a inserção de populações da região central, as populações se mostraram bem estruturadas e com menor similaridade entre si.

Além dos agrupamentos formados na PCoA, a estrutura populacional foi analisada pelo número de *clusters* das amostras estimados a partir do valor ideal de K. Os dados foram verificados no *Structure Harvester* que apresentou um pico em K = 3 (Figura 4.6).

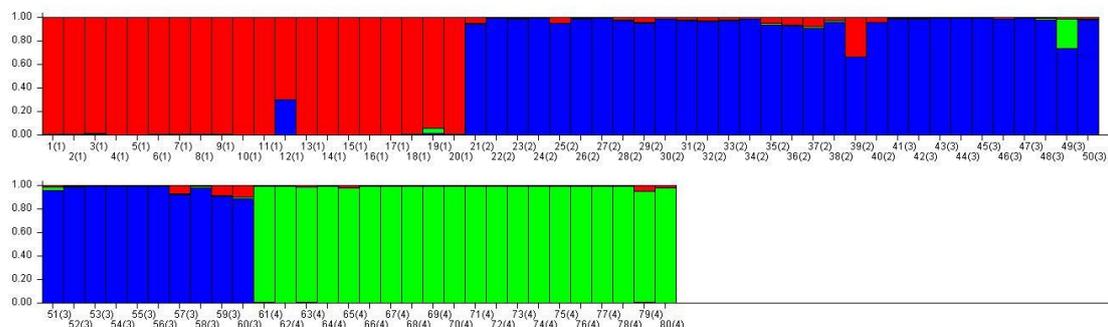
Figura 4.6 – Delta K (ΔK) para diferentes números estimados de populações (K).



Fonte: *Structure Harvester*.

A análise de inferência bayesiana separou os indivíduos das quatro populações em três *clusters* genéticos (Figura 4.7). Populações inteiras foram agrupadas em um único *cluster*. A maior parte dos indivíduos com cores muito bem definidas representaram seus respectivos *clusters*, sem a ocorrência de mistura entre indivíduos de municípios diferentes. O gráfico uniu as populações de CP e SF em um mesmo grupo. Essa similaridade mais uma vez reforça que as distâncias geográficas nem sempre são fatores determinantes, pois elas correspondem às duas populações mais distantes uma da outra (190 km).

Figura 4.7 – Gráfico de barras mostrando a estrutura genética das populações de *H. ringens* usando o método Bayesiano. SM (1), CP (2), SF (3) e SP (4).



Fonte: Software *Structure*.

Implicações para a Conservação

Hesperozygis é um gênero que pode ser agrupado como membro da tribo Mentheae que, assim como outros grupos da subfamília Nepetoideae, possuem mericarpos como unidade de dispersão funcional. Ao longo da evolução é destacada a transição de quatro estames para dois como uma característica notável dentro de Lamiaceae. Essa mudança é representada com maior importância dentro da tribo Mentheae, pois a redução no número de estames se configura como um início para a evolução do mecanismo de alavanca estaminal, importante na polinização e proliferação das espécies. Esse mecanismo surgiu mais de uma vez e, em alguns casos, já ocorreram reversões para quatro estames novamente. *Hesperozygis* é um dos gêneros atuais que manteve a redução (DREW; SYTSMA, 2012).

Além de conhecer os seus mecanismos de reprodução, a situação de risco em que a espécie se encontra indica a necessidade de buscar metodologias que deem ainda mais suporte na reprodução e propagação dos indivíduos. A propagação por

meio da estaquia foi verificada em *H. ringens*. Os resultados mostraram ser um método viável com alta taxa de enraizamento (SIQUEIRA et al., 2020).

As populações de *H. ringens* das regiões do oeste do estado são mais vulneráveis pelos processos de arenização de grandes áreas e por estarem às margens de rodovias que apresentam sinais de queimadas e degradação do ambiente por interferências antrópicas. Outro fator que gera vulnerabilidade é a negligência por parte dos governos na baixa adesão de áreas no sul do país como prioridade de proteção ambiental. Os registros das populações de *H. ringens* situam-se em áreas que atualmente ainda não fazem parte de Unidades de Conservação. De maneira mais ampla, os desgastes e ameaças apresentados para a espécie estudada englobam também outras espécies nativas e/ou ameaçadas que se estabelecem nos mesmos ecossistemas.

Elevadas taxas de extinção e a degradação dos ecossistemas, infelizmente, ocorreram de forma acelerada nessas últimas décadas. Esses eventos, sem a presença do ser humano, levariam centenas de anos para ocorrer naturalmente (CEBALLOS et al., 2015). Diante deste cenário, é fundamental priorizar essas áreas de grande diversidade biológica que vêm sendo perdidas e investir no conhecimento da biologia das espécies de plantas ameaçadas e, inclusive, em estudos genéticos que são escassos.

Em um levantamento de 3134 espécies de plantas brasileiras ameaçadas, 1931 delas não são encontradas em estudos de diversidade genética. E essas informações se referem a todas as categorias de ameaça. As espécies mais citadas são de interesse comercial, negligenciando muitas vezes o potencial e a importância de uma determinada espécie (ESSI et al., 2020).

Em 2002, a Estratégia Global para a Conservação das Plantas (GSPC) foi estabelecida com o intuito de diminuir a perda da diversidade vegetal e contribuir para o desenvolvimento sustentável. O Brasil se comprometeu na tarefa de preparar a Lista de Espécies da Flora do Brasil (2008-2015) e a Flora do Brasil 2020 (ainda em andamento). Um dos obstáculos enfrentados é a crise política e econômica do Brasil que interrompem as pesquisas científicas no país. A conclusão da Meta 1 do GSPC proporciona uma visão mais completa e precisa de informações de quão conhecidas ou pouco conhecidas são as espécies da flora brasileira. Estes dados servirão para identificar áreas prioritárias para conservação e exploração botânica (FILARDI et al., 2018).

CONCLUSÃO

As populações de *H. ringens* apresentam boa estrutura populacional, apesar dos índices de diversidade genética serem baixos. O estudo da espécie com a adição das populações da região central ampliou as informações da diversidade, pois elas apresentam diferenças genéticas bem significativas. As similaridades entre algumas populações não estão relacionadas com as distâncias geográficas. Os grupos genéticos são bem definidos indicando o baixo fluxo genético entre eles.

O monitoramento das populações ao longo dos anos é de grande importância para se ter informações do cenário mais recente e atualizado, tendo em vista os grandes impactos de degradação e redução de habitats que surgem em poucos anos. Estudos de biologia da polinização da espécie não são encontrados na literatura. É fundamental a busca por metodologias para aumentar a variabilidade genética da espécie. A transferência de genes entre as populações pode ser uma estratégia para compensar a baixa transferência gênica interpopulacional. É necessária a ampliação das áreas de proteção ambiental, ainda mais por se tratarem de regiões de interesse para atividades agropecuárias. A inserção da espécie em bancos de germoplasma reforçariam na preservação do material genético e na possibilidade de novas pesquisas desta planta promissora e endêmica do Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, B. O. et al. Grassland degradation and restoration: a conceptual framework of stages and thresholds illustrated by southern Brazilian grasslands. **Natureza & Conservação**, v. 13, n. 2, p. 95-104, 2015.

ANTAR, G.M. et al. *Lamiaceae* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB142>>. Acesso em: 09 fev. 2021

ANTAR, G.M.; OLIVEIRA, A.B. *Hesperozygis* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8156>>. Acesso em: 09 fev. 2021

CEBALLOS, G. et al. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. **Science advances**, v. 1, n. 5, p. e1400253, 2015.

CORDEIRO, J. L.; HASENACK, H. Cobertura vegetal atual do Rio Grande do Sul. **Campos sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, p. 285-299, 2009.

DE FREITAS, E. M. et al. Why preserve the southernmost fields of Brazil?. **Ciência e Natura**, v. 42, p. 27, 2020.

DE FREITAS, E. M. et al. Floristic diversity in areas of sandy soil grasslands in Southwestern Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, 2010.

DE MENEZES, H. F.; ESSI, L. Leguminosas campestres no morro Pedra do Lagarto, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Balduinia**, n. 55, p. 22-31, 2016.

DREW, B. T.; SYTSMA, K. J. Phylogenetics, biogeography, and staminal evolution in the tribe Mentheae (Lamiaceae). **American journal of botany**, v. 99, n. 5, p. 933-953, 2012.

ESSI, L. et al. Threatened and understudied: the lack of genetic data of endangered Brazilian plant species. **Ciência e Natura**, v. 42, p. 28, 2020.

FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of Southern Brazil. **Biochemical genetics**, v. 44, n. 11-12, p. 471-482, 2006.

FREITAS, E. M. de et al. Florística e fitossociologia da vegetação de um campo sujeito à arenização no sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 414-426, 2009.

FILARDI, F. L. R. et al. Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, v. 69, n. 4, p. 1513-1527, 2018.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. 2005.

GONZÁLEZ, A. V. et al. Meta-analysis of the differential effects of habitat fragmentation and degradation on plant genetic diversity. **Conservation Biology**, v. 34, n. 3, p. 711-720, 2020.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 290-302, 2016.

HATZIKOTOULAS, K.; GILLY, A.; ZEGGINI, E. Using population isolates in genetic association studies. **Briefings in functional genomics**, v. 13, n. 5, p. 371-377, 2014.

HOFFMANN, L. V.; BARROSO, P. A. V. Marcadores moleculares como ferramentas para estudos de genética de plantas. **EMBRAPA Algodão. Documentos**, 2006.

KARPIŃSKI, T. M. Essential oils of Lamiaceae family plants as antifungals. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 103, 2020.

LIMA, C. S. et al. Allelopathic Potential of *Hesperozygis ringens* Extracts on Seed Germination of Soybeans and Beggarticks, **Journal of Agricultural Science** v. 12, n. 11, 2020.

Ministério do Meio Ambiente – MMA. **Portaria n. 443, de 17 de dezembro de 2014**. Diário Oficial da União, 18/12/2014, Seção 1, p. 110-121, 2014.

NADEEM, M. A. et al. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 2, p. 261-285, 2018.

OVERBECK, G. E. et al. Conservation in Brazil needs to include non-forest ecosystems. **Diversity and distributions** v.21, n. 12. 1455-1460, 2015.

PINHEIRO, C. G. et al. Essential oil of the Brazilian native species *Hesperozygis ringens*: a potential alternative to control weeds. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 3, p. 701-711, 2017.

PIRES, F. B. et al. Majoritary triterpenic compounds in some angiosperms of the central region of Rio Grande do Sul state. **Ciência e Natura**, v. 42, p. 26, 2020.

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, n. 7, p. 2506-2509, 2010.

ROSA, I. A. et al. Extracts of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: in vitro and in vivo antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1353-1361, 2019.

SCHAEFER, J.; ESSI, L. A checklist of Asteraceae from Pedra do Lagarto, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Check List**, v. 13, p. 1075, 2017.

SIQUEIRA, J. et al. Vegetative propagation of na endemic species of the Pampa biome. **Ciência e Natura**, v. 42, p. 68, 2020.

STAUDE, I. R. et al. Local biodiversity erosion in south Brazilian grasslands under moderate levels of landscape habitat loss. **Journal of Applied Ecology**, v. 55, n. 3, p. 1241-1251, 2018.

TONI, C. et al. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 701-714, 2014.

VIANA, A. et al. Morfologia e anatomia foliar de espécies de angiospermas com ocorrência nos campos de areas do bioma pampa. 2018.

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 agricultural and food chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1829-1832, 1996.

DISCUSSÃO

A avaliação dos extratos aquosos de *Hesperozygis ringens* fez-se necessária em decorrência das atividades biológicas do óleo essencial para uso de produtos naturais. De forma geral, ao analisarmos os efeitos dos extratos aquosos sobre as raízes de *Allium cepa*, ficou evidente a ocorrência de efeito inibitório nas divisões celulares. Esse fenômeno ocorreu na maioria das populações e mais perceptível nas concentrações mais altas. O índice mitótico (IM) do controle positivo foi de IM = 7,1%. A média dos tratamentos das populações a 4 g.L⁻¹ foi de IM = 2,65%, comparado a 8 g.L⁻¹ foi de IM = 1%.

Outras lamiáceas também apresentaram resultados semelhantes por meio do teste *Allium cepa* como *Lavandula angustifolia* Mill., *Mentha spicata* L., *Mentha pulegium* L. e *Plectranthus barbatus* Andrews (BARDAWEEL et al., 2018; BEZERRA, OLIVEIRA, 2016; NIKSIC et al, 2016; TEDESCO et al., 2012). Os compostos químicos presentes no óleo essencial de *H. ringens* podem ser os responsáveis por promover efeitos antiproliferativos, entre eles, os terpenos e compostos fenólicos (DOLWITSCH et al, 2020; RIBEIRO et al., 2010; ROSA et al., 2020; TONI et al., 2014; VON POSER et al., 1996).

As diferenças nos resultados entre as populações podem ser em decorrência de fatores ambientais e genéticos que têm influência na variabilidade e porcentagem do óleo essencial contido nas folhas e conseqüentemente nos extratos aquosos (GASMALLA et al., 2017; LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003; PRINS; VIEIRA; FREITAS, 2010). Assim sendo, os extratos aquosos não apresentaram efeitos citotóxicos ou genotóxicos. Essas observações são positivas para prosseguimento de novos estudos *in vivo* das propriedades biológicas de *Hesperozygis ringens*. Sendo esta uma espécie ameaçada de extinção, propôs-se um novo estudo da caracterização genética de quatro populações em diferentes municípios.

Na análise genética, a média de percentual de *loci* polimórfico foi de 59,44%. Resultados encontrados estão acima do percentual verificado no estudo de Fracaro e Echeverrigaray (2006), que resultou em média de 45%. Porém neste trabalho também foram incluídas duas populações da região central do Rio Grande do Sul. Os índices de diversidade genética foram baixos: índice de informação de *Shannon* (*I*) com média de 0,267 e índice de diversidade (*h*) com média de 0,170.

A estrutura das populações foi avaliada pela análise das coordenadas principais (PCoA) e pela análise de Inferência Bayesiana. As análises mostraram que as populações correspondem a grupos bem definidos, o que pode ser resultado do baixo fluxo gênico como afirmam Fracaro e Echeverrigaray (2006). O valor ideal de K apontou para três *clusters* genéticos, unindo as populações de Caçapava do Sul e São Francisco de Assis.

Essa similaridade observada não está relacionada pela proximidade, pois são as populações que correspondem às mais distantes uma da outra. Essa possibilidade também indicou o Teste de Mantel com valor de $R^2 = 0,0086$, ou seja, sem correlação significativa entre distância genética e distância geográfica para as populações de *H. ringens*. Como medidas de conservação, além da diversidade genética, são necessários estudos que fornecem o conhecimento das melhores condições e estratégias de reprodução da espécie.

Nesse trabalho propôs-se a avaliação da luz e da temperatura na germinação das sementes de *H. ringens*. Durante o experimento, aos sete dias após a semeadura, já era possível ver os primeiros sinais de germinação. O tempo médio de germinação variou entre 14 e 21 dias. Quanto mais rápido as plântulas emergirem do solo e ultrapassem os estágios iniciais de desenvolvimento, menos vulneráveis serão às condições ambientais adversas (CARVALHO et al. 2020; SILVA et al., 2017).

As sementes germinaram tanto na presença quanto na ausência de luz. A germinação na temperatura de 15 °C mostrou-se mais favorável comparada às temperaturas de 20, 25 e 30 °C. Embora a porcentagem de germinação tenha sido variável, estes resultados mostram a adaptabilidade da espécie em germinar em amplas condições de temperatura. Algumas lamiáceas apresentaram resultados semelhantes como: *Ocimum basilicum* L. e *Salvia hispanica* L. (PAIVA et al. 2016; STEFANELLO et al., 2015; KHAN et al., 2014).

Na temperatura de 30 °C, a mais alta testada, os resultados de germinação foram reduzidos. As temperaturas elevadas podem reduzir a germinação, causando desorganização do processo germinativo (MARCOS FILHO, 2015; OLIVEIRA et al., 2014). O estudo da germinação de sementes é uma tarefa primordial para conhecer a capacidade das espécies vegetais de se estabelecerem com sucesso em determinados habitats (CRISTAUDO et al., 2019).

Os locais onde estão situadas as populações de *H. ringens* são regiões restritas do bioma Pampa, que não são consideradas prioridade na proteção ambiental. É

fundamental o monitoramento destas áreas e mais esforços dos governos para que elas sejam incluídas nas Unidades de Conservação do Brasil, para a preservação das espécies nativas e/ou ameaçadas.

CONCLUSÃO

Os extratos aquosos de *Hesperozygis ringens* possuem efeito antiproliferativo e não apresentaram efeitos mutagênicos ou genotóxicos significativos. As populações de *H. ringens* apresentam boa estrutura populacional, apesar dos baixos índices de diversidade genética. As similaridades genéticas encontradas entre algumas populações não estão relacionadas com as distâncias geográficas. Os grupos genéticos estão bem definidos o que indica o baixo fluxo genético entre eles. O teste de germinação mostrou a temperatura de 15 °C como a mais favorável, independentemente da presença ou ausência de luz, no processo germinativo das sementes de *H. ringens*.

Grande parte dos estudos realizados neste trabalho são pioneiros e visaram contribuir com mais informações para o melhor entendimento da espécie. Ainda há escassez de pesquisas realizadas na morfologia vegetal onde foi perceptível diferenças interessantes entre os indivíduos de populações distintas. Não são encontrados na literatura estudos sobre a reprodução e polinização da espécie. Junto ao andamento de novas pesquisas, é preciso seguir o acompanhamento das populações existentes e a inserção de exemplares em bancos de germoplasma com a finalidade de preservação do material genético da espécie. De forma mais ampla, segue-se reforçando a necessidade de ampliação das áreas de proteção ambiental.

REFERÊNCIAS

- ANTAR, G.M. et al. *Lamiaceae in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB142>> Acesso em: 29 jun. 2021
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- BAGATINI, M. D. et al. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 632-636, 2009.
- BARDAWEEL, S. K. et al. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata* L.(Lamiaceae) from Algerian Saharan atlas. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 2018.
- BARNOSKY, A. D. et al. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived?. **Nature**, v. 471, n. 7336, p. 51, 2011.
- BEZERRA, C. M.; OLIVEIRA, M. A. S. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade do infuso de Malva-Santa (*Plectranthus barbatus*-Lamiaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 13, n. 4, p. 220-228, 2016.
- CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 211-214, 1999.
- CARVALHO, C. A. et al. Effect of temperature and light on seed germination and seedling growth of *Swietenia macrophylla* King. **Revista Caatinga**, 33(3), 728-734, 2020.
- COSTA, D. P.; PERALTA, D. F. Bryophytes diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1063-1071, 2015.
- CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.
- CRISTAUDO, A. et al. Temperature and storage time strongly affect the germination success of perennial *Euphorbia* species in Mediterranean regions. **Ecology and Evolution**, 9:10984–10999, 2019.
- DA SILVA, L. P.; BOSSO, A. A.; CARDOSO, S. C. Avaliação da Citotoxicidade da Própolis em Células Meristemáticas de *Allium cepa*. **UNOPAR Científica Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 9, n. 1, 2015.

DOLWITSCH, C. B. et al. *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: a study involving extraction, chemical profiling, antioxidant and biological activity. **Natural product research**, p. 1-6, 2020.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of Southern Brazil. **Biochemical genetics**, v. 44, n. 11-12, p. 471-482, 2006.

GASMALLA, M. A. A. et al. Effect of different drying techniques on the volatile compounds, morphological characteristics and thermal stability of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 6, p. 1399-1406, 2017.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. 2005.

GODWIN, I. D.; AITKEN, E. A.B.; SMITH, L. W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, v. 18, n. 9, p. 1524-1528, 1997.

GONZÁLEZ-ZUARTH, C. A. et al. Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental. **ECOSUR, México**, 2014.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 290-302, 2016.

HOFFMANN, L. V.; BARROSO, P. A. V. Marcadores moleculares como ferramentas para estudos de genética de plantas. **EMBRAPA Algodão. Documentos**, 2006.

JOLY, C. A. et al. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, n. 89, p. 114-133, 2011.

KHAN, A. R. et al. Ecophysiology of seed germination in native and exotic labiates of Balochistan. **Biologia**, v. 60, n. 1, p. 23-29, 2014.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A.. Avaliação da qualidade de águas impactadas por petróleo por meio de sistema-teste biológico (*Allium cepa*) – Um estudo de caso. In: **IN: 4 Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás, Campinas-SP**. 2007.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Quantas espécies há no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 36-42, 2005.

LI, B.; OLMSTEAD, R. G. Two new subfamilies in Lamiaceae. **Phytotaxa**, v. 313, n. 2, p. 222-226, 2017.

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. **Revista Fitos**, v. 3, n. 03, p. 14-24, 2007.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed., Londrina: ABRATES, 2015. 660p.

NADEEM, M. A. et al. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 2, p. 261-285, 2018.

NIKSIC, H. et al. Phytochemical and pharmacological (antiproliferative) effects of essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. Lamiaceae. **Planta Medica**, v. 82, n. S 01, p. P323, 2016.

OLIVEIRA, S. S. C. et al. Seleção de progênies de nabo-forrageiro para germinação sob altas temperaturas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 217-222, 2014.

PARK, Y. K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

PAIVA, E. P. et al. Light regime and temperature on seed germination in *Salvia hispanica* L. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 38(4), 513-519, 2016.

PATWARDHAN, A.; RAY, S.; ROY, A.. Molecular markers in phylogenetic studies-a review. **Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology**, v. 2014, 2014.

PINHO, D. S. de et al. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 165-170, 2010.

PRADO, J. et al. Diversity of ferns and lycophytes in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1073-1083, 2015.

PRINS, C. L.; VIEIRA, I. JC; FREITAS, S. P. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 2, p. 91-102, 2010.

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

RIBEIRO, 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, n. 7, p. 2506-2509, 2010.

ROSA, A. J. M.; PAIVA, S. R. Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

ROSA, I. A. et al. Extracts of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: in vitro and in vivo antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1353-1361, 2019.

SILVA, R. B. et al. Germinação e vigor de plântulas de *Parkia platycephala* Benth., em diferentes substratos e temperaturas. **Revista Ciência Agronômica**, 48: 142-150, 2017.

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

SPADOTTO, C. A.. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA JURÍDICA DA FACULDADE MARECHAL RONDON, 4., 2006, São Manuel, SP. Artigos publicados... São Manuel, SP: FMR, 2006. p. 1-9. Revista do Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar, São Manuel, p. 1-9, maio 2006., 2006.

STEFANELLO, R. et al. Germinação e vigor de sementes de chia (*Salvia hispanica* L. - Lamiaceae) sob diferentes temperaturas e condições de luz. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 17, n. 4, suppl. 3, p. 1182-1186, 2015.

STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil. **Simões, CMO; Schenkel, EP; Mello, JCP**, p. 1-10, 2017.

STURBELLE, R. T. et al. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Rev. bras. farmacogn**, v. 20, n. 3, p. 409-415, 2010.

TEDESCO, M. et al. POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Mentha pulegium* L. PELO TESTE DE *Allium cepa* L. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 8, n. 15, 2012.

TONI, C. et al. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 701-714, 2014.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia. Série Botânica.**, v. 61, n. 1/2, p. 83-103, 2006.

VIEIRA, A. et al. Efeito genotóxico da infusão de capítulos florais de camomila. **Revista Trópica. Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 3, n. 1, 2009.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado- Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

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 agricultural and food chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1829-1832, 1996.

ZAPPI, D. C. et al. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.