

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA  
DO ÓLEO ESSENCIAL DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *ELIONURUS*  
*MUTICUS* HUMB. & BOMPL EX WILLD

Thanise Nogueira Füller  
Bióloga / PUCRS  
Mestre em Fitotecnia / UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do grau de Doutor em Fitotecnia  
Ênfase Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS) Brasil  
Junho de 2013

THANISE NOGUEIRA FÜLLER  
Bióloga - PUCRS  
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

## TESE

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### DOUTOR EM FITOTECNIA

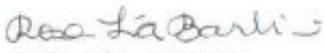
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

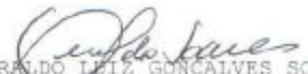
Aprovado em: 21.06.2013  
Pela Banca Examinadora

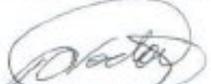
  
JOSÉ FERNANDES BARBOSA NETO  
Orientador - PPG Fitotecnia

  
INGRID BERGMAN INCHAUSTI DE BARROS  
Coorientadora - PPG Fitotecnia

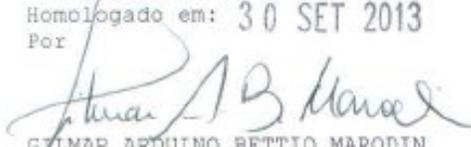
  
MARIA TEREZA SCHIFINO WITTMANN  
PPG Fitotecnia

  
ROSA LÍA BARBIERI  
EMBRAPA Clima Temperado-Pelotas/RS

  
GERALDO LUIZ GONÇALVES SOARES  
Instituto de Biociências/UFRGS

  
RUBENS ONOFRE NOBARI  
Centro de Ciências Agrárias  
UFSC

Homologado em: 30 SET 2013  
Por

  
GYLMAR ARDUINO BETTIO MARODIN  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

  
PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade  
de Agronomia

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRGS, pela oportunidade, ao CNPq, a CAPES e a PROPG pelas bolsas concedidas.

Ao meu orientador, Dr. José Barbosa, pelos ensinamentos, dedicação, e, acima de tudo, pela amizade. Foi um imenso prazer ter trabalhado contigo.

À minha co-orientadora, profa Ingrid Barros, por todo o suporte profissional, conselhos e pelas palavras amigas e encorajadoras, sempre ditas nos momentos mais importantes e que me deram força para continuar.

Ao meu querido Tiago Carvalho, que me levou a São Borja para a minha primeira coleta, que tem uma imensa reponsabilidade sobre essa conquista. Ao Gervásio por emprestar o carro, nem sei se ele sabe disso, mas muito obrigada.

Ao Odacir Decol da Emater São Borja, que me levou nos locais de coleta e ainda me ajudou a coletar, e ao seu Carlos e sua família, que nos receberam muito bem e nos cederam o material pelo qual todo trabalho foi baseado.

À Cristiane Wesp, por ter coletado muitas das populações, pela cia nas coletas e risadas que tornaram o trabalho muito mais fácil. À bolsista Bibiane Antonello e aos colegas Lucéia, Francisco, Juliano e Ana Paula, por toda a ajuda. Aos colegas da Horti que sempre me acolheram e sempre se mostraram prestativos e dispostos a ajudar.

À Divanilde Guerra e a profa Maria Teresa Schiffino- Whittmann, por toda a imensa ajuda, pelos ensinamentos, por terem aberto as portas do laboratório e disponibilizado seu tempo para colaborar com o trabalho.

Aos professores Geraldo Soares, Magnólia Silva e Fernanda Bered, que sempre me auxiliaram e fizeram uma diferença enorme no trabalho, com colaborações não só no âmbito acadêmico, como na vida pessoal também. Ao prof. Leandro

Astarita, meu orientador de iniciação científica que nunca vai se livrar de mim, por toda a ajuda desde sempre.

Ao Michael Bhebhe e aos profs Maud Muchuweti e Chagonda da Universidade do Zimbábue que me receberam muito bem e que transmitiram conhecimentos valiosos. Além de terem me proporcionado uma das melhores experiências. Sou muito grata por tudo que me ensinaram.

Ao pessoal da França, meu orientador Cedric Beltrand e Annabel Simont e, principalmente, aos meus amigos mais que especiais, que tornaram a distância e a saudade muito menor e por me proporcionarem momentos inesquecíveis.

As queridas e indispensáveis, Marisa Bello, Alice Weber e Karina Pieretti, pela ajuda, torcida, e toda a colaboração e para Alice, um agradecimento especial pelos almoços deliciosos. Também as querida Zenir e Denise pela imensa ajuda.

Ao técnico Fábio Berndt e à Carol Tessele que foram praticamente meus orientadores, além de amigos muito especiais. Eu nem sei como agradecer vocês, tenho uma dívida eterna. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

Aos queridos colegas do Plantas, em especial Thaís, Catarine e Everton e à mulherada, Adri, Dani, Kelly, Sil e Cecília, Sibila e ao Gili, que sempre me ajudaram, me apoiaram, me deram força e estímulo nos momentos mais críticos. O melhor do doutorado foi ter conhecido vocês, pessoas que eu vou levar eternamente no coração.

Aos meus amigos, que compreenderam minha ausência e aliviaram minha dor. À Francini Silveira, Paula Pinto, Pedro Ferreira, Siomara Lemos, Guilherme Loss, Cibele Costa, Anelise Hagemann, Re e Ju, Tiago Broetto, Sérgio Montazzoli, Elanne e Maria Jane. Especialmente meu querido Rodrigo Pinheiro, nem tem o que dizer, tu bem sabes a importância que tens na minha vida.

Às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, que sofrem por ter uma filha nômade e, mesmo assim, me apoiam sempre e pelo amor incondicional. Aos meus maiores amores Tyrone e Thaís, vocês são a razão do meu viver.

A todos aqueles que contribuíram para essa conquista, muito obrigada.

# CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *ELIONURUS MUTICUS* HUMB. & BOMPL EX WILLD<sup>1</sup>

Autora: Thanise Nogueira Füller

Orientador: Dr. José Fernandes Barbosa Neto

Coorientadora: Dra. Ingrid Bergman Inchausti de Barros

## RESUMO

O mercado mundial de óleos essenciais vem apresentando um crescimento aproximado de 11% ao ano, sendo que o Brasil está entre os 15 maiores exportadores, correspondendo a 1% das exportações mundiais. Um dos compostos de óleos essenciais mais comercializados é o citral, que apresenta um forte odor cítrico e é empregado nas indústrias de perfumarias, alimentos e cosméticos. *Elionurus muticus* é uma gramínea nativa do bioma Pampa e tem se destacado pela produção de um óleo essencial rico em citral; entretanto, poucos trabalhos têm sido realizados com esta espécie. Os objetivos desse trabalho foram caracterizar morfológica, química e geneticamente populações naturais de *E. muticus* coletadas no RS, bem como avaliar a atividade biológica do óleo essencial e do extrato etanólico destas populações. As populações coletadas foram cultivadas em vasos e mantidas ao ar livre. As amostras de folhas, colmos e inflorescências para todas as análises foram obtidas destas plantas. A caracterização genética usou marcadores do tipo AFLP e a citogenética avaliou mitose, meiose e grãos de pólen. As análises químicas foram realizadas com as técnicas de cromatografia gasosa e espectrometria de massas. A atividade biológica foi avaliada com os fungos *Botrytis cinerea*, *B. allii* e *Penicillium expansum*; com o microcrustáceo *Artemia salina* e com diásporos de cebola e alface. A atividade de captura de radicais livre foi baseada no método DPPH. Os resultados demonstraram que as populações estudadas têm variabilidade genética para diferentes caracteres, apontando para a possibilidade de seleção de plantas com caracteres relevantes, como alto rendimento de óleo essencial e de citral. A alta variabilidade também sugere a ocorrência preferencial de alogamia nas populações naturais. Através de análises citogenéticas foi possível concluir que a meiose na espécie é regular e que o número cromossômico é de  $2n=20$ . O óleo essencial de *E. muticus* pode ser utilizado no controle de fungos fitopatogênicos e no controle da germinação e desenvolvimento de outras plantas. Testes preliminares sugerem uma possível atividade citotóxica. Além disso, o extrato metanólico de *E. muticus* apresenta grande potencial como antioxidante.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (114 p.) Junho, 2013.

**GENETIC AND CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL  
ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF NATURAL POPULATIONS OF *ELIONURUS  
MUTICUS* HUMB. & BOMPL EX WILLD<sup>1</sup>**

Author: Thanise Nogueira Füller

Adviser: Dr. José Fernandes Barbosa Neto

Co-adviser: Dr. Ingrid Bergman Inchausti de Barros

**ABSTRACT**

The world market for essential oil is increasing about 11% per year, where Brazil is among the 15 largest exporters, accounting for 1% of world exports. One of the essential oil compounds most commercialized is the citral, which has a strong citrus odor and is used in perfumery, food and cosmetics industries. *Elionurus muticus* is a native grass of the Pampa biome and has been highlighted by the production of an essential oil rich in citral. However, few studies have been done on this species. The aims of this study were to characterize morphologically, chemically, and genetically natural populations of *E. muticus* collected in RS, as well as to evaluate the biological activity of the essential oil and the ethanol extract of these populations. Collected populations were cultivated in pots and maintained outdoors. Leaf, stem, and flower samples for all analyzes were obtained from these plants. Genetic characterization used AFLP markers and cytogenetics assessed mitosis, meiosis and pollen. Chemical analyzes were performed using the techniques of gas chromatography and mass spectrometry. The biological activity was evaluated with the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*, *B. allii*, and *Penicillium expansum*, with the shrimp *Artemia salina*, and with onion and lettuce seeds. The scavenging of free radicals was based on DPPH. The results showed that the studied populations have genetic variability for several traits, indicating the possibility of plant selection for high essential oil's yield and citral content. The high variability also suggests the occurrence of allogamy in natural populations. Through cytogenetic analysis it was concluded that the species meiosis is regular and that the chromosome number is  $2n = 20$ . The essential oil of *E. muticus* can be used for controlling pathogenic fungi and to suppress germination and growth of other plants. Preliminary tests suggest a possible cytotoxic activity. Moreover, the methanol extract of *E. muticus* can be used to scavenge free radicals.

---

<sup>1</sup> Doctoral Thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (114 p.) June, 2013.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 <i>Elionurus</i> sp .....	3
2.1.1 Caracterização fenotípica .....	6
2.1.2 Caracterização citogenética .....	7
2.1.3 Variabilidade genética e marcadores moleculares.....	10
2.2 Óleos essenciais .....	12
2.3 Atividade biológica do óleo essencial de <i>Elionurus</i> sp .....	21
2.3.1 Controle de doenças fúngicas em plantas .....	23
2.3.2 Citotoxicidade dos óleos essenciais.....	27
2.3.3 Fitotoxidez .....	28
2.4 Atividade de captura de radicais livres .....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
3.1 Coletas.....	34
3.2 Caracterização das populações.....	35
3.2.1 Fenotípica .....	35
3.2.2 Química .....	36
3.2.2.1 Extração do óleo essencial.....	36
3.2.2.2 Caracterização fitoquímica do óleo essencial.....	37
3.2.2.3 Quantificação de citral por reagente de Schiff.....	39
3.2.3 Genética .....	40
3.3 Caracterização citogenética.....	42
3.4 Testes biológicos.....	45
3.4.1 Atividade fungicida.....	45
3.4.2 Atividade citotóxica .....	47
3.4.3 Atividade fitotóxica .....	48
3.5 Atividade de captura de radicais livres .....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
5. CONCLUSÕES .....	95
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Informações sobre as coletas de populações de <i>Elionurus muticus</i> .....	34
2. Média e desvio padrão de caracteres agronômicos e morfológicos de populações naturais de <i>Elionurus muticus</i> .....	53
3. Amplitude de caracteres agronômicos e morfológicos de populações naturais de <i>Elionurus muticus</i> , coletadas em Águas Claras, Fontoura Xavier, Morro Santana, Morro São Pedro, São Borja, São Francisco de Paula e Uruguaiana .....	53
4. Rendimento médio de óleo essencial (%) populações naturais de <i>Elionurus muticus</i> .....	57
5. Índice de Retenção e porcentagem dos compostos do óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> e <i>Cymbopogon citratus</i> .....	60
6. Proporção de locos polimórficos, heterozigiosidade observada e esperada e coeficiente de endogamia para populações naturais de <i>Elionurus muticus</i> .....	66
7. Análise de variância molecular (AMOVA) em populações naturais de <i>Elionurus muticus</i> .....	66
8. Dados do cariótipo de <i>Elionurus muticus</i> .....	67
9. Análise do comportamento meiótico de <i>Elionurus muticus</i> .....	71
10. Média e desvio padrão da porcentagem de pólenes férteis em três populações naturais de <i>Elionurus muticus</i> .....	74
11. Concentração em µg/ml das diferentes concentrações (%) de óleo essencial aplicadas nos fungos fitopatogênicos .....	75
12. Concentração letal aguda do óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> , de <i>Cymbopogon citratus</i> e de citral, sobre <i>Botrytis cinerea</i> .....	76
13. Concentração letal aguda do óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> , de <i>Cymbopogon citratus</i> e de citral, sobre <i>Botrytis allii</i> .....	78

	Página
14. Concentração letal aguda do óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> , de <i>Cymbopogon citratus</i> e de citral, sobre <i>Penicillium expansum</i> ..	82
15. Coeficientes de regressão e concentração letal aguda do óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> , de <i>Cymbopogon citratus</i> e de citral, em <i>Artemia salina</i> .....	87
16. Média e desvio padrão da porcentagem de inibição e concentração efetiva mínima para inibir 50% do radical livre DPPH por diferentes populações naturais de <i>Elionurus muticus</i> ....	93

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Via de isoprenóides em plantas .....	14
2. Estabilização do DPPH .....	32
3. Locais de coleta de <i>Elionurus muticus</i> no Rio Grande do Sul ...	35
4. Populações naturais de <i>Elionurus muticus</i> em Uruguaiana e São Borja .....	55
5. Correlação entre as concentrações de citral mensuradas pelas técnicas de Espectrofotometria e Cromatografia gasosa .....	62
6. Agrupamento de populações naturais de <i>Elionurus muticus</i> através da técnica de AFLP, com base na distancia Euclidiana.	65
7. Cromossomos somáticos de <i>Elionurus muticus</i> em metáfase ...	68
8. Idiograma esquemático dos cromossomos de <i>Elionurus muticus</i> .....	70
9. Células de <i>Elionurus muticus</i> em meiose .....	72
10. Grãos de pólen de <i>Elionurus muticus</i> .....	73
11. Inibição do crescimento micelial do fungo <i>Botrytis cinerea</i> submetido a diferentes concentrações de óleo essencial aplicadas por dois métodos distintos .....	77
12. Inibição do crescimento micelial do fungo <i>Botrytis allii</i> submetido a diferentes concentrações de óleo essencial aplicadas por dois métodos distintos .....	79
13. Inibição do crescimento micelial do fungo <i>Penicillium expansum</i> submetido a diferentes concentrações de óleo essencial aplicadas por dois métodos distintos .....	81
14. Mortalidade de <i>Artemia salina</i> submetida a diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> , ou <i>Cymbopogon citratus</i> ou de citral .....	86

	Página
15. Índice de velocidade de germinação de diásporos de alface submetidos ao óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> ou citral e de diásporos de cebola submetidos ao óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> ou citral .....	89
16. Comprimento de raiz de diásporos de alface submetidos ao óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> ou citral e de diásporos de cebola submetidos ao óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> ou citral .....	90
18. Peso de planta de diásporos de alface submetidos ao óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> e citral e de diásporos de cebola submetidos ao óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> e citral .....	91

## 1 INTRODUÇÃO

O mercado mundial de óleos essenciais está avaliado em cerca de US\$ 20 bilhões/ano, apresentando crescimento aproximado de 11% ao ano. Considerando o cenário mundial, o Brasil está entre os 15 maiores exportadores de óleo essencial, correspondendo a cerca de 1% das exportações mundiais. Um dos compostos de óleos essenciais mais comercializados é o citral. Este apresenta um forte odor cítrico e, anualmente, cerca de 365 kg são empregados nas indústrias de perfumarias, alimentos e cosméticos. No mercado europeu, o citral está presente em 76% dos desodorantes comercializados, 41% dos produtos domésticos e em 33% das formulações cosméticas a base de ingredientes naturais.

A espécie *Elionurus muticus* tem se destacado pela presença de óleo essencial rico em citral. Entretanto, poucos trabalhos têm sido realizados e o conhecimento sobre aspectos biológicos e agronômicos nessa espécie são reduzidos. No entanto, análises recentes têm indicado a presença de variabilidade genética e química em populações coletadas no sul do Brasil, Argentina, Uruguai e África. Além disso, atividades biológicas têm sido atribuídas ao óleo essencial e aos extratos etanólicos extraídos das folhas de *E. muticus*. Popularmente, diversas propriedades medicinais têm sido relatadas, como redução de febre e tosses e alívio dos sintomas da gripe.

Essa gramínea é nativa do bioma Pampa, onde está presente em abundância, por isso, demanda pouco ou nenhum manejo, o que o torna um recurso potencial para a exploração de óleo essencial rico em citral. Entretanto, essa espécie, muitas vezes, é considerada um problema para pecuaristas, já que o gado não pasta essa gramínea devido ao gosto amargo atribuído à presença do óleo essencial. Sendo assim, a valoração desse recurso pode vir a mudar a relação dos pecuaristas com esta gramínea.

Os óleos essenciais produzidos em determinada região, geralmente, são vendidos a duas ou três empresas locais capazes de penetrar no mercado internacional de exportação. Baixos volumes de óleos essenciais são vendidos no mercado local. Para explorar comercialmente esses recursos em escala internacional é preciso selecionar plantas com alta capacidade de produção, a fim de garantir a sustentabilidade, em termos de quantidade e qualidade. Portanto, são necessários esforços concentrados para o aprofundamento dos conhecimentos sobre *E. muticus*, a fim de determinar a melhor forma de explorar o potencial da espécie.

Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram caracterizar a variabilidade genética e química presente em populações naturais de *E. muticus*, bem como avaliar algumas atividades biológicas atribuídas ao óleo e ao extrato metanólico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Elionurus*

O gênero *Elionurus* Humb. & Bompl ex Willd pertence à família Poaceae e compreende cerca de 15 espécies, sendo comum nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, África, Austrália (Hess *et al.*, 2007) e regiões temperadas na Ásia (Araújo, 1971; Renvoize, 1978; Longhi-Wagner, 2001; Watson & Dallwitz, 1994). No Rio Grande do Sul, as espécies conhecidas como capim-limão, *E. adustus*, *E. candidus*, *E. rostratus*, *E. tripsacoides* e *E. viridulos* estão entre as principais gramíneas presentes no bioma Pampa, sendo *E. candidus* a mais abundante (Araújo, 1971; Boldrini & Bossle, 1978).

Este gênero possui uma taxonomia complexa com grande diversidade, porém ainda pouco esclarecida (Kolb *et al.*, 2006). Alguns trabalhos citam o nome genérico com “y” (*Elyonurus*). Uma vez que a maioria das citações são na forma “*Elionurus*”, o Departamento de Botânica do Museu de História de Washington propôs que fosse conservado o nome “*Elionurus*” para o gênero (Czepak, 2000). Outra dificuldade taxonômica diz respeito a sinonímias. Figueiras (1995) citou *Andropogon adustus* Trin., *E. adustus* Trin. e *E. planifolius* Renvoize como sinonímia de *E. muticus* (Spreng.) Kuntze. Já o Instituto Nacional de Investigação Agropecuária do Uruguai (2004) referiu *E.*

*candidus* e *E. rostratus* Nees como sinónimas de *E. muticus*. Da mesma forma, Longui-Wagner (2001) englobou como sinónima de *E. muticus*, as espécies *E. rostratus*, *E. latiflorus* e *E. adustrus*. Renvoize (1978) em uma revisão sobre o gênero encontrou 16 sinónimas para *E. muticus*.

Rosengurtt *et al.* (1970) separaram *E. rostratus* Nees de *E. candidus* de acordo com a presença ou não de odor cítrico na parte aérea. *E. rostratus* apresentaria um odor cítrico muito forte nas folhas, estando ausente em *E. candidus*. No entanto, Renvoize (1978) considerou estas duas espécies como sinónimas de *E. muticus* (Spreng.) Kuntze. Mohr (1995) citou *E. rostratus* como ocorrente no Morro Santana, mas, de acordo com Rosengurtt *et al.* (1970), o germoplasma de plantas ocorrentes no Morro Santana, Porto Alegre, RS, deveria ser identificado como *E. candidus*, pois não apresentam odor cítrico intenso nas lâminas foliares. Estes fatos evidenciam a necessidade de estudos mais detalhados sobre o gênero (Welker & Longhi-Wagner, 2007).

Esse gênero apresenta espécies perenes, cespitosas e herbáceas. Os colmos, com 10-150 cm de altura, apresentam nós glabrosos e internós sólidos. Os brotos podem ser aromáticos (com leve sabor amargo) ou não aromáticos. As folhas não são basalmente agregadas e articuladas. As lâminas foliares são setáceas, por vezes planas, não apresentando venação cruzada, e são persistentes. A lígula é uma membrana franjada curta (Watson & Dallwitz, 1994).

As plantas do gênero *Elionurus* são monóicas, apresentam espiguetas com flores monoclinas. As flores são reunidas num racemo-espigiforme terminal de 10-12 cm, solitário, com uma ráquis única. A ráquis de *Elionurus* é frágil e o nó pode muitas vezes cair juntamente com a espiguetas séssil.

Paralelamente à articulação dos nós da ráquis, a base do disseminulo se especializa constituindo o chamado calo. O calo é uma estrutura nodal, geralmente pilosa, agudo ou pontiagudo, muito modificado e relacionado com a dispersão do fruto (Vegetti & Antón, 1998; Castro & Ramos, 2003). O florescimento ocorre entre outubro e dezembro. Os frutos são cariopses oblongas, escuras, contendo sementes com hilo punctiforme. (Vegetti & Antón, 1998; Castro & Ramos, 2002).

*Elionurus* é empregado como planta medicinal e aromática na Argentina, onde é conhecido por espartilho ou aibe, e também na Bolívia, onde é chamado de paja carona ou Karunásh, e no Uruguai, pasto limón ou colia peluda (Castro & Ramos, 2002; Hess *et al.*, 2007). No Brasil, *Elionurus* é popularmente conhecido por capim-limão, devido ao forte odor cítrico, ou capim-carona, devido a sua forma de dispersão, sendo uma gramínea que atinge um metro de altura e cresce em solos arenosos pobres, com pH levemente ácido, o que o torna apropriado para a recuperação de terras fracas, com reduzido teor de matéria orgânica e de água (Castro & Ramos, 2002; Hess *et al.*, 2007). *E. muticus* é uma das espécies de gramíneas mais abundantes na porção centro-meridional do Pantanal matogrossense, que tem como principal característica o solo pobre e constantes alagamentos (Silva *et al.*, 2009). O habitat natural corresponde ao clima subtropical, com curta estação fria e pouca geada.

*E. muticus* pode ser propagado por sementes, mas a propagação mais comum é pela divisão das touceiras. O plantio preferencial pode ser realizado no período de março a novembro. No entanto, em locais mais frios é feito em março-maio e setembro-novembro. As plantas mantêm uma atividade de

crescimento ao longo de todo o ano, porém, com uma redução nos períodos mais frios. As mudas podem ser plantadas em linhas com espaçamento de 0,5 - 0,6 m e conservadas com espaçamento entre as plantas de 0,3 - 0,5 m (Castro & Ramos, 2002; Davies, 2004).

*E. muticus* não é apropriado para a alimentação do gado, pois o gosto amargo é transmitido para o leite, embora as plantas jovens possam ser consumidas. Ele é periodicamente queimado por fazendeiros que consideram a planta um problema para a manutenção do leite e da carne do gado (Castro & Ramos, 2002; Hess *et al.*; 2007). Essa planta não tem sido extensivamente estudada, sendo assim, pouco é conhecido sobre suas propriedades medicinais, embora se saiba que ela produz óleos essenciais (Muchuweti *et al.*, 2006).

### **2.1.1 Caracterização fenotípica**

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, apresentando mais de 56.000 espécies de plantas e compreendendo cerca de 20% da flora mundial (MMA, 1998). Diante da grande biodiversidade existente, e dentro de uma ótica de sustentabilidade, são necessários esforços concentrados para o aprofundamento dos conhecimentos sobre a biodiversidade disponível, para determinar o potencial dos recursos genéticos existentes. Para tanto, a caracterização tanto qualitativa, quanto quantitativa, é imprescindível (Vilela-Morales & Valois, 2000; Giulietti *et al.*, 2005). Sendo assim, as atividades de caracterização e avaliação do germoplasma devem ser prioridade entre as estratégias de abordagem e manejo dos recursos genéticos. Superadas as deficiências de informação, o germoplasma poderá

ser melhor explorado em programas de melhoramento genético (Vilela-Morales & Valois, 2000; Neitzke *et al.*, 2010).

A caracterização revela os recursos genéticos e possibilita a estimação da variabilidade, descobrindo caracteres e funções biológicas de interesse (Neitzke *et al.*, 2010). A grande vantagem dos caracteres morfológicos é o baixo custo e simplicidade, pois geralmente não necessitam de programas sofisticados para a análise. Diversos pesquisadores têm utilizado este tipo de análise como ferramenta para avaliações de germoplasma de espécies bioativas com potencial de uso (Masi *et al.*, 2006; Lewu *et al.*, 2007; Liébana *et al.*, 2010; Füller *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011).

Variabilidade morfológica, genética e química foram descritos para o gênero *Elionurus* (Kolb *et al.*, 2007; Hess *et al.*, 2007; Füller *et al.*, 2010). Czepak (2000) investigou a variabilidade de tricomas em acessos de *E. latiflorus* e observou que alguns acessos apresentaram tricomas glandulares, outros tectores e alguns acessos não apresentavam tricomas. O mesmo autor relatou a variabilidade para alguns caracteres tais como largura, comprimento, aroma exalado e coloração das folhas. A variabilidade morfológica também foi observada em populações naturais de *E. muticus* para os caracteres largura foliar, rebrote, peso da parte aérea, enrolamento foliar e porte da planta, sendo, de modo geral, relacionados com a origem geográfica (Füller *et al.*, 2010).

### **2.1.2 Caracterização citogenética**

A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, no que diz respeito à morfologia, organização, função e replicação, bem como na sua

variação e evolução (Guerra, 1988). Mesmo com o avanço da genética molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de observar o genoma de um eucarioto na forma de blocos individualizados, fáceis de serem mensurados, diferenciados em sub-unidades e manipulados de diferentes formas, pois de nenhuma outra forma o DNA é tão claramente observado (Stace, 2000; Brammer *et al.*, 2007).

A análise cromossômica tem sido de grande importância para o entendimento da evolução, genética e estabilidade cariotípica do germoplasma estudado. Essa análise permite obter informações sobre a caracterização e o comportamento dos cromossomos na mitose, meiose e fertilização, fornecendo um quadro geral quanto à transmissão, de geração a geração, das estruturas fundamentais responsáveis pela herança (Guerra & Souza, 2002). Os dados cromossômicos mais comumente utilizados são a contagem do número cromossômico, a determinação do nível de ploidia, a avaliação do comportamento meiótico e da viabilidade de pólen (Pagliarini & Pozzobon, 2004).

O número cromossômico é o dado citogenético que tem sido usado mais freqüentemente em trabalhos de taxonomia devido à facilidade de observação (Stuessy, 1990). No entanto, apesar de sua relevância taxonômica, ele é determinado em cerca de 25% de todas as angiospermas. Além disso, muitos números cromossômicos relatados são incertos, pois são baseados em dados de má qualidade (a partir de uma única população ou até mesmo apenas uma única planta, ou por não ser bem documentada, por exemplo, faltam dados sobre espécimes voucher ou suas origens) (Bennett, 1998). Isto reduz a utilidade dos resultados, especialmente em grupos taxonomicamente

complexos no qual os números cromossômicos são variáveis (Baltisberger & Widmer, 2009).

Além da variação no número de cromossomos (incluindo o nível de ploidia e aneuploidia), os dados citológicos podem mostrar variação no tamanho dos cromossomos, na morfologia e propriedades de coloração dos cromossomos (Sharma & Sen, 2002). A descrição da morfologia do cromossomo provou ser um método poderoso para caracterizar os genomas de plantas e animais, incluindo seres humanos (Baltisberger & Widmer, 2009).

A análise da viabilidade de pólen é um estudo relativamente simples para determinar se o comportamento meiótico dos cromossomos é normal. Quando observados em fase mais tardia ou de desenvolvimento mais avançado, a análise de grãos de pólen permite avaliar algumas características anatômicas e fisiológicas importantes, fundamentais para a sua completa maturação e desenvolvimento, tais como: número de núcleos e poros, tamanho do pólen e quantidade de amido. Da mesma forma, os estudos dos quartetos servem de critério adicional ao programa de melhoramento, identificando e selecionando plantas citologicamente anormais (Love, 1949).

Estudos citogenéticos sobre o gênero *Elionurus* são escassos. A revisão de literatura indicou apenas quatro trabalhos e, em todos eles, apenas o número cromossômico foi avaliado. Em três deles foram relatados dez pares de cromossomos (Brown, 1951; Gould & Soderstrom, 1967; Watson & Dallwitz, 1994) e em um trabalho há registro de uma espécie africana, *E. argenteus*, que apresenta número básico  $x=5$  (Celarier, 1957).

Sendo assim, um amplo levantamento dos dados cromossômicos, não só para *Elionurus*, mas para as demais espécies de plantas, é prioritário,

devido aos problemas atuais com relação à conservação de recursos genéticos.

### **2.1.3 Variabilidade genética e marcadores moleculares**

A estrutura genética de uma espécie pode ser definida como a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações. Esta estrutura resulta da combinação entre mutação, recombinação genética, migração, seleção e deriva genética, as quais definem a distribuição da variabilidade genética nas populações. Em populações naturais, a distribuição da variabilidade genética é influenciada pelo modo de reprodução, sistema de acasalamento, tamanho da população, distribuição geográfica e fluxo gênico, além de ser estruturada no tempo e no espaço (Cavalli & Winge, 2003). O desenvolvimento de um programa de melhoramento de espécies naturais depende da descrição da estrutura genética e do conhecimento da base genética dos caracteres de interesse (Nodari & Guerra, 2000; Giulietti *et al.*, 2005).

A variabilidade genética se constitui na fonte primária dos estudos genéticos e sem ela não seria possível ocorrer evolução nas espécies. Da mesma forma, o sucesso de qualquer programa de melhoramento depende, fundamentalmente, da variabilidade genética dos genitores envolvidos (Allard, 1960). Estudos sobre a identificação, caracterização da variabilidade genética e variabilidade populacional em plantas concentram-se em aspectos fenotípicos, tais como os caracteres morfológicos e análise do polimorfismo existente em diferentes tipos de moléculas como proteínas, isoenzimas e fragmentos de DNA. Os polimorfismos de DNA podem ser estudados através de diferentes

técnicas e, conforme o tipo de fragmento de DNA analisado, diferentes níveis de polimorfismos podem ser detectados (Cavali, 2003). Nesse sentido, os marcadores moleculares, baseados nos polimorfismos de DNA, permitem caracterizar geneticamente populações através da estimativa de vários índices genéticos, além disso, podem gerar o conhecimento sobre a organização da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações (Nodari & Guerra, 2000).

Nesse âmbito, diversos trabalhos sobre variação genética em populações vêm utilizando marcadores moleculares (Lima-Brito *et al.*, 2011; Torre *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012; Molin *et al.*, 2013). Dentre as técnicas atualmente disponíveis, a técnica conhecida como Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) vem sendo utilizada com sucesso em estudos de divergência (Baskauf & Burke, 2009; Santos *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011; Jump *et al.*, 2012; Kolb & Durka, 2013). Em espécies de plantas bioativas o AFLP tem sido amplamente empregado, já que a maioria dessas espécies possui um limitado número de estudos (Shasany *et al.*, 2005; Muchugi *et al.*, 2008; Domyati *et al.*, 2011; Azizi *et al.*, 2012).

Em plantas aromáticas, o estudo da correlação entre caracteres morfológicos e químicos com marcadores moleculares é muito recente. No entanto, os resultados indicam que ferramentas moleculares são essenciais na caracterização da diversidade genética, uma vez que, apesar de caracteres morfológicos e químicos consigam distinguir genótipos, a composição dos óleos essenciais tem influência de fatores ambientais (Masi *et al.*, 2006; Yamamoto, 2006).

Em estudo anterior realizado com cinco populações naturais de *E. muticus*, onde se estimou a variabilidade genética através de marcadores morfológicos e moleculares, verificou-se uma acentuada variabilidade genética, principalmente intrapopulacional. Estes dados sugerem a possibilidade de seleção de genótipos de interesse para o melhoramento (Füller *et al.*, 2010).

## **2.2 Óleos essenciais**

Os óleos essenciais foram utilizados na Roma Antiga, Grécia, Oriente Médio e Egito. Registros de seis mil anos atrás são encontrados entre os egípcios, relatando práticas religiosas associadas à cura de males da realeza e à busca de bem-estar físico através de aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais, como resinas, folhas, flores, sementes, etc. Os óleos essenciais eram utilizados como perfumes, flavorizantes de alimentos, desodorantes, farmacêuticos e antisépticos. As substâncias aromáticas também já eram populares nas antigas China e Índia, centenas de anos antes da era cristã, quando eram incorporadas em incensos, poções e vários tipos de acessórios, usados diretamente no corpo. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, através do processo de destilação, introduzido pelos cientistas muçulmanos, que a comercialização de produtos aromáticos teve início (Sinai *et al.*, 2000; Rangahau, 2001).

Óleos essenciais são a combinação de um número variável de substâncias orgânicas de baixo peso molecular e lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas à temperatura ambiente. São compostos de origem vegetal, próprios de vários grupos de espécies, definidos pelo aroma e sabor (Serafini *et al.*, 2002; Bakkali *et al.*, 2008). Eles são chamados óleos voláteis,

etéreos ou essenciais, devido aos seus componentes químicos volatilizarem-se quando expostos ao ar em temperatura ambiente (~25°C) (Guenther, 1972).

A produção dos óleos essenciais pode ocorrer em quase todos os órgãos da planta, como flores, caule, folhas, frutas, sementes e raízes. Eles podem ser acumulados em pêlos ou tricomas glandulares, canais oleíferos, bolsas lisígenas ou ainda em células parenquimáticas diferenciadas (Serafini *et al.*, 2002; Bakkali *et al.*, 2008). De maneira geral, sua função é permitir a adaptação e interação da planta ao ambiente, por isso, sua produção aumenta em situações de estresse. Os óleos essenciais protegem a planta de doenças e de parasitas e atraem insetos polinizadores. Também são responsáveis pela interação com outros vegetais, afetando a germinação e crescimento das plantas circundantes e alterando a relação de competição entre elas (Dayan *et al.*, 2000; Serafini *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2006).

Em geral, os terpenóides são os constituintes predominantes dos óleos essenciais, mas muitos desses óleos são compostos por outros constituintes químicos, tais como os fenilpropanóides. Terpenóides e fenilpropanóides se originam de diferentes precursores do metabolismo primário e são sintetizados por diferentes rotas biossintéticas (Aharoni, 2005; Sangwan *et al.*, 2001; Bakkali *et al.*, 2008; Schwab *et al.*, 2008). Os terpenos são sintetizados a partir de cinco unidades de carbono (isoprenos) de isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero, dimetilalilpirofosfato (DMAPP). As unidades de isoprenos (C<sub>5</sub>) são geradas a partir de duas vias independentes localizadas em compartimentos distintos. No citosol, o IPP é derivado do ácido mevalônico (MVA), na rota conhecida como rota do mevalonato, que começa com a condensação de

acetil-CoA. Nos plastídios, o IPP é formado a partir do piruvato e gliceraldeído 3-fosfato, na rota chamada rota do metileritritol fosfato (MEP) (Figura 1).

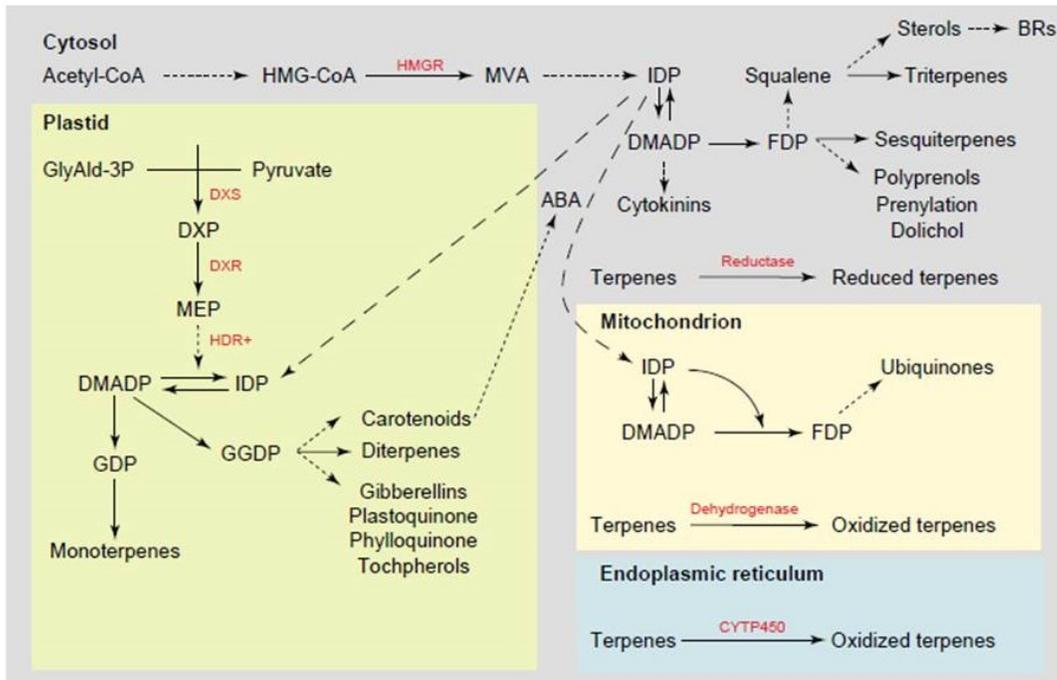


FIGURA 1. Via de isoprenóides em plantas. Setas sólidas, setas quebradas com traços curtos e setas quebradas com traços longos representam passos enzimáticos únicos, múltiplos e de transporte respectivamente. Enzimas relacionadas são mostradas em vermelho. Abreviaturas: ABA, ácido abscísico, BRs, brassinosteróides; CYTP450, citocromo P450 hidroxilases; DMADP dimetilalil difosfato; DXP, deoxixilulose-5-fosfato; DXR, DXP reducto isomerase; DXS, DXP sintase; FDP, farnesildifosfato; PIB, geranyl difosfato; GGDP, geranyl geranyl difosfato; GlyAld-3P, gliceraldeído 3-fosfato; HDR, difosfato redutase hidroximetil butenil além de várias outras enzimas que são necessárias para gerar DMADP e IDP da MEP; HMG-CoA, hidroximetilglutarilCoA; HMGR, a HMG-CoA redutase, IDP, difosfato isopentenil; MEP, metileritritol 4-fosfato; MVA, ácido mevalônico. "Terpenos" incluem terpenos de todas as classes e originários de organelas diferentes. (Aharoni, 2005).

As classes de terpenos são formadas através da justaposição das unidades de isoprenos; as classes monoterpénos ( $C_{10}$ ) e sesquiterpénos ( $C_{15}$ ) são as principais classes constituintes dos óleos voláteis, mas hemiterpénos

(C<sub>5</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), triperpenos (C<sub>30</sub>) e tetraterpenos (C<sub>40</sub>) também ocorrem (Heldt, 2005; Cheng *et al.*, 2007; Bakkali *et al.*, 2008; Taiz & Zeiger, 2009) (Figura 1).

Os óleos essenciais podem ser extraídos de plantas frescas ou secas. A extração vai depender principalmente da taxa de difusão do óleo através do tecido vegetal para uma superfície de onde o óleo vai ser removido por diferentes métodos. Esses métodos podem ser hidrodestilação, maceração, extração por solventes, enfleuragem, gases supercríticos e microondas. Dentre estes, o método de maior aplicação é o de hidrodestilação (Santos *et al.*, 2004; Bakkali *et al.*, 2008). A hidrodestilação é um dos processos mais antigos para obtenção de óleos essenciais, ocorre de forma rápida e simples e é realizada através de um aparelho hidrodestilador que recebe a denominação comercial de Clevenger (Serafini *et al.*, 2002; Gomes, 2003; Santos *et al.*, 2004).

Como componente de sabonetes, desinfetantes, descongestionantes, conservantes, entre outros, o óleo essencial está presente em muitos produtos comercializados atualmente. Usado em larga escala, esses óleos mostram uma crescente demanda no mercado nacional e internacional. Mais de 300 tipos de óleos essenciais são comercializados no mercado mundial, que atualmente está avaliado em cerca de US\$ 24 bilhões/ano, com um crescimento anual estimado em 15% (Verlet, 1993; Bizzo *et al.*, 2009; COMTRADE, 2011).

O Brasil é o 13º maior exportador de óleo essencial, correspondendo a cerca de 1% das exportações mundiais (COMTRADE, 2011). A posição do Brasil em relação ao mercado mundial de óleos essenciais é atribuída, principalmente, aos óleos essenciais de cítricos, obtidos como subprodutos da

indústria de sucos. Além disso, o Brasil apresenta algumas vantagens em relação aos principais exportadores de óleo essencial, em geral, europeus, tais como a localização geográfica, o clima diversificado, com uma gama de biomas diferentes, que apresenta um número variado de espécies aromáticas a serem cultivadas. No entanto, a falta de manutenção do padrão de qualidade dos óleos, a representatividade nacional e os baixos investimentos governamentais no setor dificultam a expansão deste setor no Brasil (Bizzo *et al.*, 2009).

O grupo das plantas aromáticas, não é restrito a um grupo taxonômico específico, ao contrário, abrange uma longa lista de espécies distribuídas em inúmeras famílias botânicas (Sangwan *et al.*, 2001; Castro & Ramos, 2003). Nesse sentido, na família Poaceae, cerca de 90% das gramíneas aromáticas são representantes da tribo Adropogoneae e estas, geralmente, apresentam citral e/ou geraniol entre os compostos majoritários. No entanto, há registro de óleos essenciais sendo encontrados nos gêneros de gramíneas aromáticas nas tribos Paniceae, Bromeae e Poeae. As gramíneas aromáticas geralmente apresentam distribuição tropical e temperada (Kaul & Vats, 1998; Scrivanti *et al.*, 2009).

Os óleos essenciais apresentam uma série de funções ecológicas especializadas associadas às interações das plantas com outros organismos no contexto de reprodução, defesa ou simbiose, além de permitir a interação com os estresses abióticos (Bohlmann *et al.*, 2008). Considerando em especial espécies de gramíneas, diversos trabalhos demonstram atividade antimicrobiana (Mevy *et al.*, 2002; Sabini *et al.*, 2006; Hess *et al.*, 2007; Saddiq *et al.*, 2010; Schubert *et al.*, 2012), inseticida (Labinas *et al.*, 2002; Ketoh *et al.*, 2005; Stefanazzi *et al.*, 2010; Kabera *et al.*, 2011), carrapaticida (Prates *et al.*,

1998) e fitotóxica (Mao *et al.*, 2004; Scrivanti, 2010) associada aos óleos essenciais. Sendo assim, possivelmente a presença de óleos essenciais em gramíneas pode estar relacionada com essa interação, atuando na proteção contra microorganismos, insetos e na relação com outras plantas. Óleos essenciais apresentam, em geral, gosto amargo, diminuindo a palatabilidade das plantas (Field, 1976).

Muitas dessas gramíneas são espécies forrageiras que apresentam uma alta capacidade competitiva no ambiente em que ocorrem (Castro & Ramos, 2002; Hess *et al.*, 2007; Kałużna-Czaplińska, 2007). O óleo essencial em forrageiras pode conferir essa capacidade competitiva e ainda, servir como deterrente para mamíferos. Um exemplo é o gênero *Elionurus* que ocorre em pastagens e é periodicamente queimado por fazendeiros que consideram a planta um problema para o gado, pois o gosto amargo do óleo é transmitido para o leite, à campo se observa que o gado evita pastejar essas plantas e quando ocorre, se alimentam de plantas jovem em que o teor de óleo é reduzido (Castro & Ramos, 2002; Hess *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais de muitas gramíneas apresentam diversas aplicações e grande valor comercial agregado. Nesse sentido, se destaca o vetiver (*Vetiveria zizanioides*), cujo óleo essencial das raízes, durante séculos, tem sido utilizado no comércio de perfume como aromatizador e fixador. O vetiver também é empregado para usos medicinais, a parte aérea é usada para a cobertura de construções rurais rústicas, para o artesanato e para a cobertura do solo e conservação da umidade através da formação de barreiras para contenção do solo em áreas inclinadas. Seu cultivo já é feito em numerosos países de clima tropical e subtropical, tanto para a produção de

óleo essencial, como para fins de conservação do solo e da água (Castro & Ramos, 2002; Carlier *et al.*, 2009).

Considerando ainda as gramíneas aromáticas, o gênero *Cymbopogon* se destaca por apresentar diferentes composições de óleos essenciais, com inúmeras aplicações. O óleo essencial de *C. validus* tem sido utilizado como um adstringente da pele e anti envelhecimento para os homens, além de apresentar propriedades anti-sépticas. O óleo essencial de *C. citratus* é empregado em perfumaria para a produção de  $\beta$ -ionona, na síntese da vitamina A e como anti-séptico. A planta também é usada como fixadora das margens de estradas e rodovias. Por estas inúmeras aplicações, o óleo essencial do *C. citratus* tem procura no mercado nacional e internacional e seus preços têm sido considerados compensadores. O óleo essencial de *C. martini*, conhecido por palma rosa, apresenta relevância para a indústria de perfume. Dentro deste gênero, ainda se destaca o *C. winterianus*, conhecido por citronela, que possui aplicações para fins de perfumaria, repelente de insetos do lar e de grãos armazenados, desinfetante do lar, bactericida laboratorial e matéria-prima para a síntese de outros aromas (Chagonda *et al.*, 2000; Castro & Ramos, 2002; Carlier *et al.*, 2009).

A espécie *E. muticus* tem sido considerada de grande potencial entre as principais gramíneas produtoras de óleos essenciais economicamente importantes, juntamente com espécies como o capim-cidró (*C. citratus*), palma-rosa (*C. martinii*), citronela (*C. nardus*) e vetiver (*V. zizanoides*) (Castro & Ramos, 2002).

Espécies do gênero *Elionurus* tem apresentado acentuada variabilidade na composição química de seu óleo essencial. Na Argentina, *E. muticus* é

classificado em cinco quimiotipos conforme o composto majoritário presente no óleo essencial, o neral, geranial, acorenona, iso-acorenona e 1,8-cineole, sendo as duas primeiras de maior importância para propósitos industriais (Kolb *et al.*, 2007; Hess *et al.*, 2007). Neral e geranial são também compostos majoritários do óleo essencial de *E. muticus* obtido de plantas coletadas no Uruguai e no Zimbábue (Chagonda *et al.*, 2000). Silou *et al.* (2006), analisando a composição do óleo essencial das folhas de *E. hensii* nativa do Congo, observaram a predominância dos compostos *cis* - e *trans*-p-menta-2,8(9)-dien-1-ol, *cis*- e *trans*-p-menta-1(7),8-dien-2-ol, 2-undecanona e 2-tridecanona. Ainda na África, Mevy *et al.* (2002) obtiveram, a partir da parte aérea de *E. elegans*, os seguintes compostos majoritários: canferenona (43,0%), óxido de cariofileno (4,9%) e bisabolona (4,9%).

No Brasil, a constituição do óleo parece variar de acordo com a região do país. Na região central, foi descrita a presença de canfeno (11,5%), (E)-cariofileno (17,9%) e espatulenol (18,6%) como componentes majoritários do óleo (Scramim & Saito, 2000). Já no sudeste e sul do Brasil, principalmente nas regiões de fronteira com Argentina e Uruguai, foi verificada a presença de geranial e neral como constituintes majoritários do óleo (Silva *et al.*, 2009; Füller *et al.*, 2010).

Geranial e o neral são isômeros geométricos que misturados tornam-se a fonte natural de citral. Este apresenta um forte odor cítrico (Heydorn *et al.*, 2003). Citral é o composto que desperta o maior interesse no que diz respeito ao gênero *Elionurus*, pois é amplamente empregado nas indústrias de perfumarias, alimentos e cosméticos, para aromatização de sorvetes, bebidas, refrigerantes, confeitos, composição de perfumes, entre outros produtos. Na

indústria farmacêutica, o citral é utilizado como matéria-prima para a síntese de uma série de iononas, sendo a  $\beta$ -ionona especificamente utilizada como substância de partida para a síntese de vitamina A (Bottoselle *et al.*, 2006; Koshgima *et al.*, 2006).

Uma pesquisa realizada em 2010 sobre a utilização de citral em produtos naturais comercializados no mercado europeu revelou que o citral estava presente em 76% dos desodorantes, 41% dos produtos domésticos e em 33% das formulações cosméticas a base de ingredientes naturais (Chen *et al.*, 2010). Além disso, o geranial e o neral podem ser transformados em geraniol e nerol, que apresentam um alto preço de mercado, possuindo odor de rosa e laranja e sendo empregados na fabricação de perfumes finos (Craveiro, 1981).

A exploração comercial de *E. muticus* em relação ao rendimento de óleo para os quimiotipos citral e geranial foi avaliada em Misiones, na Argentina, no ano de 2007. Para tanto, foram utilizadas plantas com fenótipo robusto, de grande massa foliar, cerca de 700 a 800 g de folhas por planta, com uma colheita anual. A propagação da planta foi realizada por simples divisão de touceiras a cada seis ou nove meses, sendo obtidas cerca de 50.000 plantas por ha. Realizando uma extrapolação desses resultados, para o quimiotipo geranial, se obteve 215 kg de óleo essencial por ha/ano, resultando em um lucro estimado em U\$ 500,00 ha/ano. Já para o quimiotipo citral, as 50.000 plantas resultaram em 216 kg de óleo essencial com lucro de U\$ 3.000,00 ha/ano (Kolb *et al.*, 2006).

A maioria das gramíneas se adapta a ambientes com solos nutricionalmente pobres, com problemas de pH e apresentam alta resistência a

doenças e pragas, além de apresentarem a vantagem de propagação por divisão de touceiras, mantendo a uniformidade genética. Todos esses fatores acarretam em um custo de produção baixo, o que caracteriza outra vantagem na produção e cultivo das mesmas (Castro & Ramos, 2002; Hess *et al.*, 2007).

Apesar de muitas gramíneas aromáticas já serem objetos de numerosas pesquisas no exterior e no país, e grande parte da tecnologia do seu cultivo e da sua industrialização conhecida e aplicada, ainda é reduzido o conhecimento sobre composição química, atividade biológica e cultivo. Por essas razões, o estudo das gramíneas aromáticas é extremamente importante para aquisição de maior conhecimento e para agregar valor através da exploração dos recursos existentes, desenvolvendo novas populações com capacidade de produção de óleo essencial e caracteres agronômicos favoráveis para o seu cultivo.

### **2.3 Atividade biológica do óleo essencial de *Elionurus***

Espécies do gênero *Elionurus* têm sido empregadas como plantas medicinais e aromáticas na Argentina, na Bolívia e no Uruguai. *E. muticus* é conhecido popularmente por possuir propriedades sudoríferas e febrífora (redução de febre) (Muchuweti *et al.*, 2006). Há relatos de que os índios Tarahumaras e alguns mexicanos mastigavam as raízes para alívio da dor de dentes, esse procedimento era considerado tão eficaz que as raízes eram comercializadas nos mercados locais em Chihuahua (Vasey, 1887). No Rio Grande do Sul, conversado com agricultores, houve relatos da utilização das raízes no alívio da tosse e sintomas da gripe.

Três quimiotipos (acorenona, citral e geranial) do óleo essencial de *E. muticus* apresentaram efeito fungicida sobre seis estirpes de *Candida* spp. (Sabini *et al.*, 2006). Neste trabalho, o geranial foi o quimiotipo mais ativo, requerendo apenas 0,87 mg/ml para inibir o desenvolvimento de 33% das estirpes. Este estudo sugeriu o potencial de *Elionurus* sp., já que a capacidade fungicida do seu óleo essencial o transforma em desinfetante potencial. Os mesmos três quimiotipos apresentaram atividade bactericida avaliada contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis* e contra as bactérias gram-negativas *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (Cacciabua *et al.*, 2005). Também tem sido observada a atividade bactericida do óleo essencial de *E. muticus* contra *E. coli* e *S. aureus*. Entretanto, o óleo avaliado apresentava o (E)-cariofileno e biciclogermacreno como compostos majoritários.

Cacciabua *et al.* (2005) também comprovaram o efeito bactericida do extrato etanólico obtido das folhas de *E. muticus* contra *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*, sendo que o extrato não foi eficiente contra *E. coli* (Hess *et al.*, 2007). Silva *et al.* (2009) também observaram o potencial antimicrobiano do óleo de *E. muticus*, cujo citral é o componente majoritário, com forte inibição para os microrganismos *Candida albicans*, *Micrococcus luteus* e *Rhodococcus equi*, uma inibição moderada contra *Bacillus subtilis* e uma baixa inibição contra *S. aureus*.

O óleo essencial de *Elionurus* sp. também se mostrou eficaz contra leveduras da mastite como *C. rugosa*, *C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *Cryptococcus laurentii* isoladas de leite bovino e responsáveis por inúmeros problemas sanitários de rebanhos (Schubert *et al.*, 2012). Ainda

que sejam trabalhos preliminares, e pesquisas clínicas tenham que ser realizadas, estes trabalhos demonstram a importância de *Elionurus* sp. na saúde, onde os patógenos existentes possuem uma alta resistência aos produtos de síntese e biossíntese dos medicamentos atuais.

Efeitos do óleo essencial de *E. muticus* sobre insetos também foram observados quando em contato com *Sitophilus oryzae*, revelando toxicidez. Também foi observado o efeito repelente sobre larvas e adultos de *Tribolium castaneum* e adultos de *S. oryzae*, efeito de toxicidade pós-ingestiva em larvas de *T. castaneum* e adultos de *S. oryzae* e alteração do índice nutricional em *T. castaneum* e adultos de *S. oryzae*. Os compostos majoritários do óleo analisado foram neral, geranial, cariofileno, óxido de cariofileno e acetato de neril (Stefanazzi *et al.*, 2010).

A atividade do óleo essencial de *E. muticus* também foi verificada contra *Grapholita molesta*, uma das principais pragas do pessegueiro. Para tanto, Colpo (2010) imergiu ovos dos insetos em soluções com óleo essencial, e observou que nas concentrações 0,25, 0,5 e 1%, os ovos apresentaram uma mortalidade moderada (52, 34 e 31%, respectivamente), sugerindo a possibilidade de exploração deste recurso, embora mais estudos devam ser realizados.

### **2.3.1 Controle de doenças fitofúngicas**

Consideráveis perdas pós-colheita de frutas e legumes são provocadas pelo apodrecimento causado por fungos. Devido ao seu pH baixo, maior teor de umidade e composição de nutrientes, as frutas são muito suscetíveis ao ataque por fungos patogênicos, que, além de causar o apodrecimento, também

podem torná-las impróprias para o consumo devido à produção de micotoxinas (Tripathi & Dubey, 2004). Entre os fungos fitopagônéticos, destacam-se os gêneros *Botrytis* e *Penicillium*, devido a sua ampla ocorrência e aos elevados prejuízos que acarretam.

As doenças causadas pelo gênero *Botrytis* são, provavelmente, as mais comuns e com alta incidência em hortaliças, plantas ornamentais, frutas, e, até mesmo, em algumas culturas de campo. Estas doenças causam prejuízos estéticos, qualitativos e quantitativos. Apesar dos sintomas variarem em função do hospedeiro e do órgão afetado, esses são quase sempre caracterizados pela descoloração dos tecidos, aspecto úmido e necrótico das lesões e presença de um crescimento cotonoso acinzentado (conídios e conidióforos) sobre as áreas afetadas (Töfoli *et al.*, 2011).

Dentre as 22 espécies do gênero *Botrytis*, a espécie *B. cinerea* (Pers.Fr) é de longe a mais importante. Apresentando uma ampla distribuição mundial, ela causa o chamado mofo cinzento e pode infectar quase todas as plantas e partes vegetais. Além disso, pode causar infecções latentes que danificam os frutos antes do amadurecimento (Rosslénbroich & Stuebler, 2000). *B. cinerea* produz uma gama de enzimas que degradam a parede celular, toxinas e outros compostos de baixo peso molecular. Evidências sugerem que o patógeno induz o hospedeiro a desencadear os processos de morte celular programada como uma estratégia de destaque (Williamsom *et al.*, 2007). Temperatura entre 15°C e 20°C e alta umidade (90%) são condições ótimas para o desenvolvimento desse fungo (Sanhueza *et al.*, 1996).

Ainda no gênero *Botrytis*, a espécie *B. alli* é importante no que diz respeito à cultura da cebola, sendo o fungo que causa a doença de podridão do

pescoço durante o armazenamento, ocasionando perdas de mais de 60% na produção em poucos anos. As cebolas infectadas são muitas vezes assintomáticas, podendo desenvolver a doença em trânsito ou no armazenamento, resultando em um produto de baixa qualidade, afetando principalmente cebolas para exportação (Agrios, 2005).

Assim como *Botrytis*, as espécies do gênero *Penicillium* estão entre as mais comuns e geralmente são as mais destrutivas de todas as doenças pós-colheita, afetando a maioria das frutas e legumes. Em algumas frutas, como citros, as infecções podem iniciar no campo, mas são essencialmente doenças de pós-colheita e, muitas vezes pode ocasionar até 90% de decomposição em trânsito, em armazenamento e no mercado. *Penicillium* entra nos tecidos através de feridas. No entanto, pode se espalhar a partir de frutos infectados em contato com os saudáveis através da pele sem ferimentos. Além das perdas causadas pela podridão de frutos e legumes, *Penicillium* também produz diversas micotoxinas que contaminam os produtos feitos a partir de frutos sadios e em parte podres (Agrios, 2005).

Embora o controle químico tenha sido utilizado como um padrão praticado durante muitos anos, os fungos têm grande capacidade de se adaptar rapidamente a novos produtos químicos e desenvolver tolerância ou resistência, sempre gerando a necessidade do desenvolvimento de novos fungicidas (Tripathi *et al.*, 2008). Recentemente, em diferentes partes do mundo, tem sido dada atenção para a exploração de produtos vegetais como novos quimioterapêuticos na proteção de plantas. Devido a não fitotoxicidade, sistemicidade e alta biodegradabilidade, os produtos vegetais são um recurso potencial no controle de pragas (Dubey *et al.*, 2008). Na natureza, os óleos

essenciais desempenham um importante papel na proteção de plantas como fungicidas, bactericidas, antivirais, inseticidas, entre outros. Baseado nessas propriedades, e devido ao crescente interesse por produtos naturais, numerosos estudos têm documentado o efeito fungicida dos óleos essenciais de plantas (Lee *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Marandi *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2011; Nguetack *et al.*, 2012).

Os testes empregados nos estudos de atividade fungicida são variados, mas dentre eles, os mais utilizados em pesquisa são o método difusão em disco, onde o fungo é inoculado em forma de disco em meio de cultura em placas de Petri e submetido ao óleo essencial, que é colocado em um disco de papel filtro junto à tampa da placa ou adicionado ao meio de cultura. O crescimento do fungo é então estimado através do diâmetro a partir do disco inicial (Burt *et al.*, 2004). O estudo de atividade fungicida permite a estimativa de uma série de parâmetros, como medida do desempenho dos óleos essenciais. Um desses parâmetros é a concentração inibitória mínima (CIM), que consiste na menor concentração necessária para a completa inibição do organismo testado. Outro parâmetro utilizado é a dose letal aguda (DL<sub>50</sub>), que consiste na concentração mínima para inibir 50% do crescimento do organismo (Burt *et al.*, 2004).

Apesar dos estudos sobre a atividade fungicida dos óleos essenciais serem mais frequentes atualmente, e tais atividades cada vez mais comprovadas, pouco se sabe sobre o modo de ação dos óleos essenciais. Considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, o mais provável é que a sua atividade não seja atribuída a um mecanismo específico (Carson *et al.*, 2002). Porém, de modo

geral, os óleos essenciais se caracterizam por serem lipofílicos, o que lhes permite passar através da parede celular e da membrana citoplasmática, afetando a estrutura das diferentes camadas de polissacáridos, ácidos graxos e fosfolípidos, determinando alterações de permeabilidade destas membranas e perturbando as estruturas celulares (Isman & Machial, 2006).

### **2.3.2 Citotoxicidez dos óleos essenciais**

Uma substância é considerada citotóxica se inibe processos metabólicos vitais ou provoca distúrbios em organismos vivos, tendo por resultado a alteração de comportamento ou morte (Fatope, 1995). Vários óleos essenciais são conhecidos por demonstrar atividade citotóxica (Sutil *et al.*, 2006; Ajaiyeoba *et al.*, 2006; Olivero-Verbel *et al.*, 2009; Stefanazzi *et al.*, 2010; Ameen *et al.*, 2011; Pour & Sasidharan, 2011; Kpoviessi *et al.*, 2012). Em relação ao óleo essencial de *E. muticus*, Sabini *et al.* (2006) observaram a sua elevada citotoxicidade em células Vero, causando alterações morfológicas no substrato celular, levando a uma desorganização dos tecidos e conseqüente morte dos mesmos.

Os testes de toxicidade são elaborados com o objetivo de avaliar ou prever os efeitos de substâncias tóxicas nos sistemas biológicos e observar a toxicidade relativa das substâncias no ambiente (Olivero-Verbel *et al.*, 2009). Nesse sentido, o camarão de água salgada, *Artemia salina*, é um dos organismos mais comumente empregados em bioensaios e estudos toxicológicos. *A. salina* é um microcrustáceo encontrado em água salina e de distribuição mundial. A disponibilidade de ovos, a facilidade de eclosão para obtenção das larvas, o rápido crescimento dos náuplios e a relativa facilidade

de manutenção de uma população em condições de laboratório, tornam o teste com artemias simples e eficaz. O ensaio com artemia basicamente detecta substâncias que são citotóxicas o suficiente para matar as larvas expostas à solução da amostra (Ameen *et al.*, 2011). *A. salina* apresenta o metabolismo da purina semelhante a células de mamíferos, tendo sido demonstrada uma alta correlação com a atividade anti-tumoral (Solis *et al.*, 1993; McLaughlin *et al.*, 1998). Além de anti-tumoral, os resultados podem indicar atividade inseticida (Montanher *et al.*, 2002; Carballo *et al.*, 2002). Para Carballo *et al.* (2002) o teste de letalidade de *A. salina* indica atividade antitumoral, quando a DL<sub>50</sub> é inferior a 40 ppm (40 µg/ml), e pode indicar atividade inseticida quando a DL<sub>50</sub> menor do que 1ppm (1 µg/ml).

### **2.3.3 Fitotoxidez**

Alelopatia refere-se aos efeitos benéficos ou prejudiciais de uma planta sobre outra planta pela liberação de substâncias químicas de origem vegetal por lixiviação, exsudação radicular, volatilização, decomposição de resíduo, entre outros processos (Molish (1937), citado por (Lovett & Ryuntyu, 1992). Alelopatia é uma interação bioquímica entre vegetais, considerada uma forma de adaptação química defensiva das plantas, além de ser um fator de estresse ambiental para muitas espécies (Lovett & Ryuntyu, 1992). A fitotoxidez compreende a parte da alelopatia em que a planta produz substâncias químicas que prejudicam as outras plantas circundantes

Os efeitos comumente citados sobre o efeito fitotóxico incluem a redução da germinação das sementes e do crescimento das plântulas. Como os herbicidas sintéticos, não existe um modo comum de ação ou local de destino

fisiológico para todos aleloquímicos. No entanto, algumas ações de alguns aleloquímicos incluem alterações na divisão celular (Singh *et al.*, 2006; Schmidt-Silva *et al.*, 2011), germinação do pólen, captação de nutrientes, fotossíntese (Einhellig *et al.*, 1993) e função enzimática específica.

O estudo da alelopatia abrange inúmeros aspectos como fisiologia, ecologia, biologia molecular, química de produtos naturais e agricultura. No entanto, na agricultura, a principal aplicação da alelopatia é como herbicida natural (Hirai, 2003).

Considerando estudos relacionados ao gênero *Elionurus*, o potencial fitotóxico foi demonstrado por Chagas *et al.* (2006), que, trabalhando com o extrato etanólico bruto, avaliaram quatro concentrações diferentes (250, 500, 1000 e 2000 mg/l) e observaram que as quatro concentrações inibiam o comprimento radicular e do hipocótilo de alface, tais resultados foram expressivos, indicando a importância do isolamento do princípio ativo responsável e possível elaboração de um biopesticida. No entanto, sendo o extrato diluído em etanol, é necessário comprovar se o efeito obtido não foi devido ao etanol. Singh *et al.* (2006) avaliaram o efeito do citronelal em diversas plantas daninhas e observaram inibição na germinação e crescimento dessas plantas. Associado a esse fenômeno, os autores descreveram uma série de efeitos tais como redução na atividade mitótica, desintegração aparente da cera cuticular, anormalidade nas células epidérmicas, fechamento e entupimento estomático, diminuição da clorofila e da respiração celular. O citronelal está presente no óleo essencial de *E. muticus* em baixas concentrações. No entanto, apresenta estrutura química similar ao citral, uma vez que ambos são monoterpenos que apresentam o grupo aldeído.

Sendo inibidores naturais da germinação e crescimento de plantas, os óleos essenciais estão envolvidos em interações alelopáticas entre plantas e, portanto, desempenham um papel importante na estruturação e padronização das comunidades vegetais (Singh *et al.*, 2006). Inúmeros trabalhos vêm demonstrando esse potencial (Singh *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2011; Schmidt-Silva *et al.*, 2011). Além disso, os óleos essenciais são geralmente considerados compostos mais seguros devido à sua natureza biodegradável (Isman, 2000) e, portanto, podem servir como uma excelente ferramenta para manejo de plantas daninhas. Sendo assim, é importante explorar as diversas fontes de óleos voláteis e sua natureza alelopática com vista a utilizá-los como novos herbicidas.

#### **2. 4 Atividade de captura de radicais livres**

Radicais livres são moléculas com um ou mais elétrons não emparelhados em sua camada mais externa, sendo, portanto, altamente instáveis. Por este motivo esses radicais livres buscam estabilidade através do emparelhamento de elétrons com macromoléculas biológicas tais como proteínas, lípidios e DNA, causando danos a essas moléculas egerando peroxidação lipídica (Taiz & Zeiger, 2009). Eles podem ser hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2\cdot$ ), peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ) e peroxila ( $\text{LOO}\cdot$ ). Além disso, há o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o ozônio ( $\text{O}_3$ ), o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), o ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), o ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), o trióxido de dinitrogênio ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) e o peróxido de lípido ( $\text{LOOH}$ ), que não são radicais livres, mas são chamados de

oxidantes devido ao fato de eles facilmente levarem a formação de radicais livres nos organismos vivos (Lien *et al.*, 2008).

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ROS/RNS são essenciais para o fornecimento de energia, desintoxicação, sinalizações químicas e função imunológica nas células (Lien *et al.*, 2008). Elas são continuamente produzidas e controladas por enzimas endógenas (superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase). Quando há um excesso de produção dessas espécies, devido a exposição a substâncias oxidantes externas ou falha nos mecanismos de defesa, pode ocorrer danos em biomoléculas importantes, tais como DNA, lipídeos e proteínas (Aruoma, 1998).

Recentemente o uso de antioxidantes naturais tem se tornado popular devido à aplicação em alimentos e na medicina preventiva. Por isso, inúmeros métodos têm sido descritos para a determinação da atividade de captura de radicais livres. Eles podem ser baseados em diferentes princípios, dentre eles, a captura do radical peroxila (Oxygen Radical Absorbance capacity, ORAC e Total radical-trapping antioxidant power, TRAP), o poder de redução do metal (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP; Cupric Reducing Antioxidant Power, CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico (2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazol-6-ácido sulfônico, ABTS e 2,2-difenil-1-picril-hidrazil DPPH), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (Thiobarbituric Acid Reactive Substances TBARS), Oxidação de lipoprotéínas de baixa densidade (LDL), entre outros (Rufino *et al.*, 2007; Pérez-Jimenez *et al.*, 2008).

Nesse sentido, um dos métodos mais populares para estimar essa capacidade é o DPPH, por ser um método rápido, simples, acurado e barato.

Esse método é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) pelo extrato testado, que doa um átomo de hidrogênio gerando a forma reduzida do DPPH (Figura 2) (Molyneux, 2003; Rufino *et al.*, 2007; Marinova & Batchvarov, 2011). O DPPH tem sido amplamente empregado em trabalhos de avaliação de captura de radicais de produtos naturais (Sacchetti *et al.*, 2005; Ara & Nur, 2009; Hassan *et al.*, 2009; Peteros & Uy, 2010; Enujiugha *et al.*, 2012).

Em relação à *E. muticus*, tem sido verificado que o extrato metanólico poderia aumentar a captação de hidroperóxido (Dzigirai, 2007). O autor também detectou eficiência desse extrato na inibição da peroxidação lipídica quando testado em cérebro de ratos. Muchuweti *et al.* (2006), ao compararem a atividade antioxidante de sete plantas conhecidas popularmente por apresentarem propriedades medicinais da flora de Zimbábue, observaram que *E. muticus* apresentava a maior atividade antioxidante  $95,84 \pm 0,50\%$ , seguido de *Warburgia salutaris* Bertol.  $92,57 \pm 1,004\%$  e se aproximando a quase 100% do padrão  $\beta$ -caroteno  $98,84 \pm 0,656\%$ . Os resultados obtidos demonstraram o potencial do extrato de *E. muticus* na captura de radicais livres.

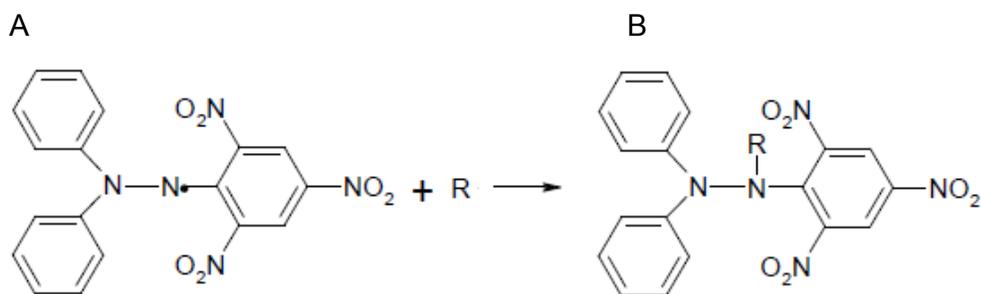


FIGURA 2. Estabilização do DPPH. (A) radical; (B) forma reduzida.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho descreve uma série de avaliações de populações de *Elionurus muticus* coletadas em ambiente natural. As populações coletadas foram caracterizadas fenotípica e molecularmente no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS, onde também foi avaliada a atividade fitotóxica e de captura de radicais livres. A caracterização citogenética de indivíduos da população São Borja foi realizada no Laboratório de Citogenética e Eletroforese do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da UFRGS. O óleo essencial de *E. muticus* foi extraído no Laboratório de Horticultura do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS e a caracterização química desse óleo essencial, bem como a avaliação das atividades fungicida e citotóxica foram realizadas no Laboratoire de Chimie des Biomolécules et de l'Environnement, na Universidade de Perpignan, França. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico R (R Development Core Team, 2008).

### 3.1 Coletas

Populações naturais de *E. muticus* foram coletadas em diversas regiões do Rio Grande do Sul durante os anos 2010 e 2011 (Tabela 1 e Figura 3). O conjunto de indivíduos coletados em determinada localidade foi considerado uma população, sendo que os indivíduos eram constituídos por uma touceira. Exsicatas do material coletado foram montadas e catalogadas no Herbário ICN do Departamento de Botânica da UFRGS. As plantas coletadas foram transplantadas para vasos de 5 litros contendo substrato e mantidas ao ar livre no Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia/UFRGS. As populações constituíram-se de diferentes números de indivíduos (Tabela 1). A população São Borja apresentou maior número de indivíduos devido ao interesse de selecionar indivíduos superiores para rendimento de óleo, conforme potencial determinado em trabalho anterior (Füller *et al.*, 2010).

TABELA 1. Informações sobre as coletas de populações de *Elionurus muticus*. Porto Alegre, 2011.

População	N*	Coordenadas	Coletor**	Voucher
Águas Claras	19	S 26° 29'10,0" O 49°04'00"	1	-
Fontoura Xavier	40	S 28° 53'51,9" O 52°24'23,4"	1	-
Morro Santana	32	S 30° 03'26,0" O 51°07'30,0"	2	152279
Morro São Pedro	19	S 29° 20'57,2" O 50°31'21,0"	1	152282
São Borja	119	S 28° 47'25,9" O 56°05'52,2"	1,2, 3, 4 e 5	152281
São Francisco de Paula	23	S 28° 47'25,9" O 56°05'52,2"	1	152280
Uruguaiana	59	S 29° 29'35,0" O 56°45'02,3"	1, 2, 4 e 5	152283

\*N= Tamanho da população; \*\*1 = Cristiane Wesp, 2=Thanise Füller, 3= Tiago Carvalho, 4= José Fernandes Barbosa Neto, 5= Ingrid B. I. de Barros.

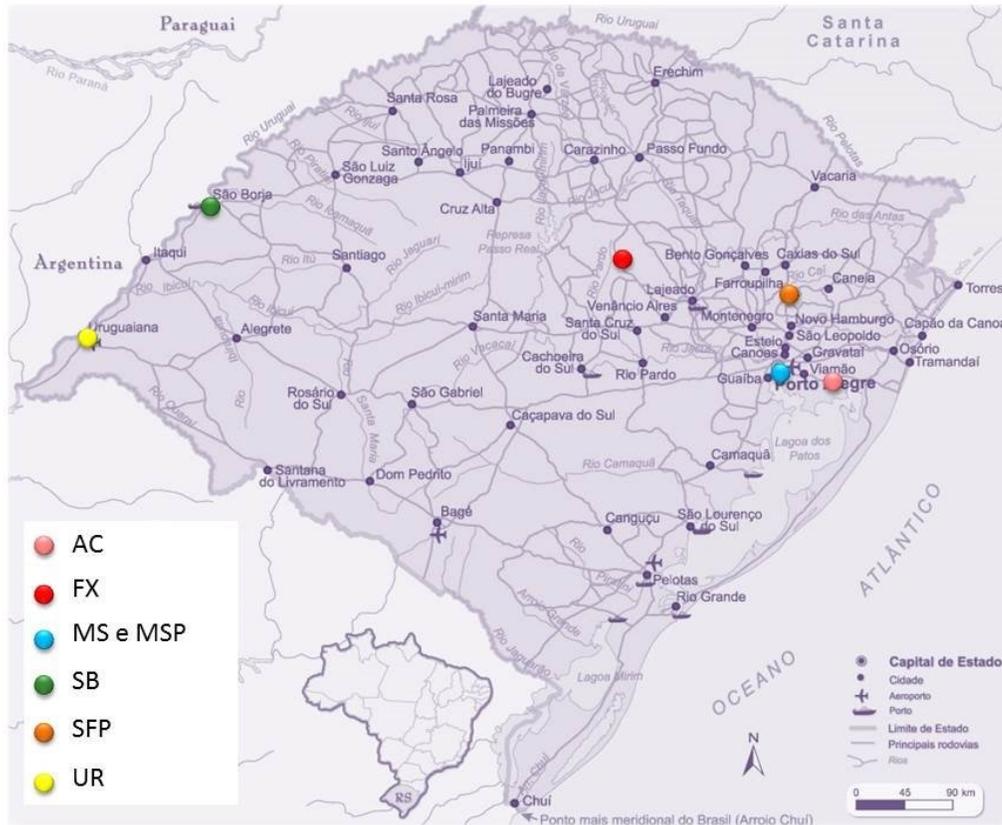


FIGURA 3. Locais de coleta de *Elionurus muticus* no Rio Grande do Sul. Águas Claras (AC), Fontoura Xavier (FX), Morro Santana (MS), Morro São Pedro (MSP), São Borja (SB), São Francisco de Paula (SFP) e Uruguai (UR). Porto Alegre, 2011.

### 3.2 Caracterização das populações

#### 3.2.1 Fenotípica

As plantas empregadas na avaliação fenotípica foram uniformizadas para o mesmo estágio de desenvolvimento com um corte da parte aérea, sendo as leituras realizadas 30 dias após esse corte. As avaliações foram realizadas nos meses de abril e maio de 2013, correspondendo ao período vegetativo da planta. As comparações foram realizadas entre as populações, sendo que cada indivíduo representou uma repetição dentro da população.

Os caracteres avaliados em plantas individuais foram:

1. Rebrote (cm): estatura de planta após o corte, medida com o auxílio de uma régua, considerando a base da planta no solo até a altura máxima de 50% das folhas.
2. Largura da folha (mm): obtida através de medição com paquímetro digital, considerando a porção mais larga da folha e com dez repetições por indivíduo.
3. Massa da parte aérea (g): obtido através da pesagem em balança das folhas cortadas. As folhas foram cortadas de toda a touceira, durante o estágio vegetativo das plantas.
4. Enrolamento da folha: para este caráter foram atribuídos os valores 0=aberta e 1= enrolada.
5. Porte da planta: foi avaliado o porte da touceira.
6. Presença de odor cítrico: para este caráter foram atribuídos os valores 0=sem odor perceptível e 1= com odor perceptível.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias separadas pelo Teste de Tukey ( $\alpha= 0,05$ ). O modelo de ANOVA empregado foi  $X_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$ , onde  $X_{ij}$ = observação da variável para a planta  $i$  na população  $j$ ,  $\mu$ =média geral do experimento,  $\tau_j$  = efeito fixo da população  $j$  e  $\varepsilon_{ij}$  = erro  $\sim N(0, \sigma^2)$ .

### **3. 2. 2. Química**

#### **3. 2. 2. 1 Extração do óleo essencial**

O óleo essencial foi extraído de dez indivíduos de cada população coletadas, exceto na população São Borja, onde se extraiu o óleo de 96 indivíduos. Para a extração do óleo, as folhas frescas foram coletadas da parte

aérea da planta durante o período da tarde a fim de padronizar o momento de coleta. Após a coleta, o material foi pesado e mantido no freezer para posterior extração.

O óleo foi extraído por hidrodestilação em aparelho Clevenger por cerca de 3h. A fase aquosa foi separada com sulfato de magnésio. O óleo extraído foi armazenado em recipientes de vidro protegidos da luz à -20°C. O rendimento foi calculado com a fórmula do rendimento de óleo em base úmida (BU) (Santos *et al.*, 2004):

$$T_o = \frac{V_o}{BM} \times 100, \text{ onde}$$

$T_o$  = Teor de óleo em % (ml de óleo em 100 g de biomassa úmida)

$V_o$  = Volume de óleo lido na escala do hidrodestilador

BM = Biomassa vegetal

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias separadas pelo Teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). O modelo de ANOVA empregado foi  $X_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$ , onde  $X_{ij}$  = observação da variável para a planta  $i$  na população  $j$ ,  $\mu$  = média geral do experimento,  $\tau_j$  = efeito fixo da população  $j$  e  $\varepsilon_{ij}$  = erro  $\sim N(0, \sigma^2)$ .

### 3. 2. 2. 2 Caracterização fitoquímica do óleo essencial

A caracterização fitoquímica do óleo essencial foi realizada para a população São Borja, onde 19 indivíduos foram caracterizados. Essa população foi escolhida por ser uma das populações que apresentou maior rendimento de óleo em relação às demais, pelo odor cítrico mais acentuado. O

óleo essencial, extraído no Brasil, foi transportado em embalagens de vidro âmbar, em caixa de isopor com gelo para manter em baixa temperatura. Os constituintes do óleo foram analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas.

A cromatografia gasosa foi realizada em cromatógrafo do tipo Termo Scientific Focus GC, com detector de ionização por chama (FID), utilizando coluna capilar DB-5 ou OPTIMAWAX (30 m x 0,25 mm X 0,25 µm), tendo o hélio como gás de arraste (fluxo de 1,0 ml/min), com volume injetado de 1 ml (2% de solução em heptano) e pressão inicial na coluna de 1,91 Pa. As temperaturas foram programadas da seguinte forma: 80°C por 5 min, 80°C até 170°C (2°C/min) e de 170°C até 260°C (10°C/min) e por final 260°C por 2 min para a coluna DB-5 e 100°C por 5 min, 100°C até 120°C (5°C/min) e de 120°C até 250°C (3°C/min) e por final 250°C por 5 min para a coluna OPTIMAWAX. A temperatura do injetor foi de 240°C, com injeção no modo “splitless” para ambas as colunas. As análises duraram 61 min cada. Os óleos também foram analisados e identificados por espectrometria de massas (EM) em cromatógrafo acoplado a detector seletivo de massas DSQ II, usando as mesmas condições descritas anteriormente. A energia de impacto foi de 70 eV para a análise do EM. Os diversos constituintes químicos foram identificados através de estudos dos espectros de massa, complementados por comparação computadorizada da biblioteca do aparelho e literatura (Formáček & Kubeczka, 1982).

Uma série de alcanos (C9 à C30) foi injetada nas mesmas condições das amostras para as análises no cromatógrafo gasoso e no espectrometro de massa. Estes alcanos foram usados como referência na determinação dos

compostos obtidos nas amostras. O Índice de Kovats obtido foi comparado com dados da literatura (Adams, 1995; Babushok *et al.*, 2009) para confirmação dos compostos sugeridos pelo banco de dados do computador. O Índice de Kovats (IK) foi estimado com base no tempo de retenção de cada composto usando a seguinte fórmula:

$$IK = 100 \times \left[ n + (N - n) \times \frac{tr - tr_{(n)}}{tr_{(N)} - tr_{(n)}} \right], \text{ onde}$$

IK= índice de Kovats

n = número de átomos de carbono no menor alceno

N = número de átomos de carbono no maior alceno

tr = tempo de retenção da amostra

tr<sub>(n)</sub> = tempo de retenção do menor alceno

tr<sub>(N)</sub> = tempo de retenção do maior alceno

### 3. 2. 2. 3 Quantificação de citral por reagente de Schiff

O citral foi quantificado pelo método de Schiff na população São Borja, sendo que apenas 12 indivíduos avaliados previamente na cromatografia gasosa apresentaram biomassa suficiente para análise de quantificação por Schiff. O citral foi quantificado pelo método colorimétrico baseado no reagente de Schiff de Dudai *et al.* (2004) modificado. O óleo essencial extraído foi incubado com o reagente de Schiff (pararosanilina HCl a 1%, e metabissulfito de sódio a 4% em ácido clorídrico a 0,25 mol/L) por 30 min no escuro a temperatura ambiente. As leituras foram obtidas em absorbância de 580 nm. A curva de calibração foi obtida com diferentes concentrações do composto puro citral. As concentrações de citral foram determinadas através da equação da curva de calibração ( $y = 0,036x - 0,314$ ,  $R^2 = 0,967$ ).

Um diagrama de dispersão foi gerado a partir dos valores obtidos na quantificação de citral pelo reagente de Schiff e por de cromatografia gasosa e a correlação de Person foi estimada para as variáveis observadas.

### 3. 2. 3 Genética

Para a análise com marcadores moleculares o DNA foi extraído das folhas de dez indivíduos de cada população, exceto a população São Borja onde foram avaliados 19 indivíduos, os mesmos avaliados na caracterização por cromatografia gasosa. O DNA foi extraído pelo método descrito por Harberer (1998) e quantificado em gel de agarose 1,6%. As soluções de trabalho foram elaboradas na concentração de 2 ng/μL.

Os marcadores moleculares avaliados foram do tipo AFLP. As amplificações nas reações de AFLP seguiram o método adaptado de Vos *et al.* (1995). O DNA genômico (250 ng) foi digerido com as enzimas de restrição *MseI* (Promega) e *PstI* (Gibco BRL). Ao DNA digerido foram adicionados adaptadores específicos aos sítios de restrição. As pré-amplificações e amplificações foram realizadas em termociclador (modelo: PTC – 100, MJ Research, Inc.). A reação de PCR para a pré-amplificação consistia de 10 ng de DNA ligado, 37,5 ng de cada sequencia inicializadora adicionada de um nucleotídeo (*MseI* + C e *PstI* + A), 0,8 mM de dNTP, tampão 1X e uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase. A pré-amplificação foi realizada em 20 ciclos, nas condições de 94°C por 30 s, 56°C por 1 min e 72°C por 1 min. A reação de PCR para a amplificação continha 20 ng de DNA pré-amplificado, 30 ng de ambas as sequencias inicializadoras *MseI* e *PstI*, acrescidas de três nucleotídeos, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM de dNTP, tampão 1X e uma unidade

da enzima *Taq* DNA polimerase. A amplificação seletiva foi realizada com programa de PCR *touch down*, com ciclos de 94°C por 60 s, 65°C por 60 s e 72°C por 90 s. A temperatura de pareamento começou em 65°C e foi reduzida em 1°C sucessivamente até a temperatura de 56°C, a qual foi mantida por 23 ciclos. Duas reações de amplificação foram realizadas, com as sequencias iniciadoras P\_ACT + M\_CTA e P\_AAC + M\_CAC.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 5% (10 bis-acrilamida: 1 acrilamida), a 85 W por aproximadamente 3h. O marcador DNA Ladder-100 pb (Invitrogen) foi utilizado como padrão de peso molecular. Os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com o método de Creste *et al.* (2001). A análise visual dos fragmentos foi realizada em mesa de luz fluorescente por dois leitores. O tamanho dos fragmentos foi estimado através da comparação com a migração dos fragmentos do marcador de peso molecular (DNA Ladder), determinada a partir do ponto de aplicação de cada gel.

A genotipagem dos indivíduos estudados foi realizada com base na presença/ausência de bandas. O padrão de presença/ausência de bandas permitiu obter as frequências alélicas do alelo recessivo, já que AFLP é um marcador dominante, pressupondo equilíbrio de Hardy-Weinberg. A partir das frequências alélicas obtidas foi realizada uma análise de similaridade baseada na distância Euclidiana. O agrupamento foi realizado pelo método UPGMA através do programa R. A partição da variabilidade entre e dentro das populações foi realizada através da análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o programa R. O valor de  $F_{st}$  de Wright (1943) também foi calculado para verificar a estrutura das populações. As análises realizadas seguiram o

modelo de Lynch & Milligan (1994) para corrigir as frequências alélicas estimadas a partir de dados dominantes. A variabilidade genética para cada população foi estimada de acordo com a proporção de locos polimórficos ( $P:0,95$ ), a heterozigosidade média por loco observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), e o valor  $f$  (coeficiente de endogamia). Essas análises e o  $F_{st}$  de Wright foram realizadas utilizando o programa TFPGA (Miller, 1997).

### **3.3 Caracterização citogenética**

As caracterizações citogenéticas da mitose, meiose e o cariótipo foram todas avaliadas para a população São Borja. No entanto, a análise da fertilidade do pólen foi realizada para as populações Morro Santana, São Borja e Uruguaiana.

O número cromossômico somático foi determinado em células de ponta de raiz de dez indivíduos. As radículas coletadas foram pré-tratadas com solução saturada de paradiclorobenzeno (PDB) por 24 h a 4°C. Após, as radículas foram fixadas em solução etanol: clorofórmio: ácido acético na concentração 6: 3: 1 por 24 h em temperatura ambiente. As radículas foram então conservadas em álcool 70% em congelador até a preparação das lâminas.

As lâminas foram preparadas com hidrólise das radículas em HCL 1N em banho-maria a 60°C por 10 min. Após, as radículas foram coradas com Feulgen por cerca de 3 h. Em seguida, foi realizado um tratamento enzimático com pectinase a 2% por cerca de 20 min. As radículas então foram maceradas em carmim propiônico 2%. A lâmina foi coberta por lamínula e selada com luto 3:1 (breu: cera).

Para cada indivíduo foram analisadas dez células apresentando bom espalhamento de cromossomos e em estágio equivalente de contração. Todas as análises foram realizadas em microscópio óptico Nikon, com sistema de fotografia tradicional.

A análise de cariótipo foi realizada a partir de três células, avaliadas anteriormente para comportamento mitótico, com equivalente grau de contração cromossômica. Fotografias dos cromossomos foram reveladas e posteriormente ampliadas. Os cromossomos homólogos foram pareados com base na sua semelhança, tamanho e forma.

O tamanho do braço curto, do braço longo e o tamanho total do cromossomo, bem como o índice centromérico (IC) (comprimento do braço curto / comprimento total do cromossomo) foram determinados e o TCL (comprimento total do complemento haplóide) foi estimado. Os cromossomos foram classificados como metacêntricos (m) (quando o IC era maior que 0,40), submetacêntricos (sm) (entre 0,36 e 0,40) acrocêntricos, (a) (entre 0,25 e 0,35) e subacrocêntricos (sa) (IC menor que 0,25). Os resultados foram representados em um idiograma. O grau de simetria do cariótipo foi calculado segundo Stebbins (1971).

O comportamento meiótico foi observado em inflorescências jovens. A formação de grãos de pólen se dá de forma muito rápida, o que muitas vezes dificultou a coleta. As inflorescências foram coletadas e imediatamente fixadas em solução 3:1 (etanol absoluto: ácido acético) por 24 h em temperatura ambiente, posteriormente foram armazenadas em álcool 70% no freezer para análise.

Para preparação das lâminas, as anteras foram separadas através da utilização de pinça de relojoeiro e agulha histológica. Após as anteras foram

partidas, coradas com carmim propiônico a 2% e pressionadas levemente com um bastão de vidro para evitar o rompimento das estruturas. A lamínula foi colocada sob a lâmina que foi selada com luto 3:1 (breu: cera). As lâminas foram analisadas com ajuda de um microscópio óptico. Para cada indivíduo, foram avaliadas dez lâminas. As melhores células foram fotografadas.

Na análise do pólen foram avaliados dez indivíduos para cada população. As inflorescências foram coletadas e fixadas em solução 3:1 (etanol absoluto: ácido acético) por 24 h em temperatura ambiente. Após, foram armazenadas em etanol 70% no freezer para posterior análise. As lâminas foram preparadas a partir das inflorescências armazenadas. As mesmas foram lavadas em água destilada para tirar o excesso de etanol. As anteras foram separadas, colocadas na lâmina e cortadas. Após, se adicionou uma gota de carmim propiônico a 2% e as metades das anteras foram pressionadas, com o auxílio de uma pinça, para a liberação dos grãos de pólen e então a lâmina foi coberta com lamínula e selada com luto 3:1 (breu:cera).

As lâminas foram analisadas com ajuda de um microscópio óptico. Para cada lâmina, foram contados 200 grãos de pólen e foram feitas três lâminas por inflorescência, uma em cada parte da inflorescência (base, meio, ápice). Sendo avaliadas três inflorescências por indivíduo. As melhores células foram fotografadas.

Através da técnica de coloração de carmim, o grão de pólen completamente corado foi considerado viável. Em contrapartida, considerou-se inviável o grão de pólen parcialmente corado ou vazio, bem como com formas irregulares e ausência de poro. As plantas foram classificadas segundo Souza *et al.* (2002), que consideram a viabilidade como alta para plantas com valores

acima de 70%, média para plantas no intervalo de 31 a 69% e baixa quando menores de 30%.

### **3. 4 Testes biológicos**

#### **3. 4. 1 Atividade fungicida**

A atividade fungicida do óleo essencial de *E. muticus* foi avaliada em três fungos fitopatogênicos: *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* e *B. allii*. Os tratamentos consistiram do óleo essencial de *E. muticus*, do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e do composto puro citral. O óleo de *C. citratus* foi empregado por ser um padrão comercial e o citral por ser o composto majoritário de ambos os óleos essenciais. O óleo essencial de *C. citratus* foi obtido pela empresa Madagascar BIO CEE (Lote 564N001-Ech. 839) e o citral foi obtido através da empresa Alfa Aesar (Lote 10168526). Os fungos testados foram provenientes do Institut Pasteur (Paris, França). As cepas utilizadas foram: *P. expansum* (03/02/10 – 230992), *B. cinerea* (22/02/20- 230992) e *B. allii* (03/02/10 – 050291). As cepas dos fungos foram cultivadas e multiplicadas em placas de Petri em meio Bacteriológico Ágar-Malte (BM), que consistiu em 2% de malte ágar e 2% de ágar bacteriológico. Estas placas de Petri foram mantidas a 23°C no escuro e a cada sete dias foi feito uma repicagem em triplicata.

A atividade pelo método de contato foi determinada por difusão em Ágar (Ostrosky *et al.*, 2008). Os fungos cultivados foram coletados com o auxílio de uma pipeta estéril a fim de obter os discos com diâmetro de 0,5 cm, os quais foram colocados em placas contendo 12 poços. Esses poços haviam sido previamente preenchidos com 2 ml de meio BM e com o tratamento em cinco

concentrações: 0, 0,01, 0,015, 0,02 e 0,03%. Cada placa correspondeu a uma concentração e foram empregadas três repetições por tratamento. As placas foram incubadas a 23°C no escuro e a extensão do micélio dos fungos foi medida no quarto dia a partir do centro do disco.

A atividade pelo método de fumigação consistiu na exposição da cepa ao vapor do óleo essencial. A preparação das placas e dos fungos foi realizada da mesma maneira que o método por contato, com exceção de que o tratamento não foi aplicado no meio de cultura. Para essa análise o tratamento foi adicionado em papel de celulose de 8 mm de diâmetro fixado no centro da tampa da placa. Cada placa continha as três cepas avaliadas e foram realizadas três repetições para cada tratamento. Os tratamentos foram avaliados em sete concentrações: 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 µl, sendo que cada placa correspondia a uma concentração.

A partir dos dados avaliados, a dose letal aguda (DL<sub>50</sub>) foi obtida através de equações de regressão. A Inibição do Crescimento Micelial (ICM) foi estimada através da fórmula (Kim *et al.*, 2008):

$$\% ICM = \frac{(D_c - D_t)}{D_c} \times 100, \text{ onde:}$$

ICM = % da Inibição do crescimento micelial

D<sub>c</sub> = diâmetro do micélio do tratamento controle

D<sub>t</sub> = diâmetro do micélio do tratamento

### 3.4.2 Atividade citotóxica

Os experimentos de atividade tóxica do óleo essencial de *E. muticus* sobre *Artemia salina* também contaram com o óleo essencial de *C. citratus* e o composto puro citral como testemunhas. As artemias foram obtidas através da empresa Novotemia.

Os cistos de artemias foram eclodidos em água marinha filtrada, coletada em Canet, França. Para a eclosão dos cistos foi adicionada a água marinha em aproximadamente 80% de uma placa de Petri. A placa apresentava uma divisão central onde um lado permaneceu no escuro e o lado oposto com claridade mantida por um feixe de luz durante 48 h. Por serem fototrópicas, as artemias migram em direção à luz.

Após a eclosão dos cistos (48 h), as soluções foram preparadas em tubos de acrílico em sete concentrações diferentes de óleo essencial ou citral 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 20 e 30 µg/ml. Os óleos essenciais, bem como o citral, foram emulcificados em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% e foi acrescidos 5 ml de água marinha em cada tubo. Como controle se utilizou apenas água marinha e água marinha com DMSO a 1%. Para controle positivo foi utilizado dicromato de potássio nas mesmas concentrações das amostras testadas.

Com o auxílio de uma pipeta, foram contadas dez artemias para cada tubo. Cada concentração foi testada em triplicata. Os tubos foram deixados em contato com a luz e após 24 h foi realizada a leitura. Foram consideradas larvas mortas todas as que não apresentavam qualquer movimento normal em cerca de 10 s de observação. A partir dessas observações, a porcentagem de mortalidade e a dose letal aguda (DL<sub>50</sub>) foram determinadas. A DL<sub>50</sub> foi obtida

através de equações de regressão e o percentual de mortalidade das larvas foi obtido através da Fórmula de Abbott (1925).

$$Mortalidade = \left(1 - \frac{N_t}{N_{co}}\right) \times 100, \text{ onde:}$$

$N_t$  = população de Artemias no tratamento

$N_{co}$  = população de Artemias no controle

### 3.4.3 Atividade fitotóxica

Cinquenta diásporos de *Allium cepa* (cv. Baia Periforme) e *Lactuca sativa* (cv. Grand Rapids) foram distribuídos em placas de Petri, sobre papel-filtro embebido com 5 ml de água destilada. O óleo essencial de *E. muticus* e o composto puro citral foram adicionados em papel de celulose de 8 mm de diâmetro fixado no centro da tampa da placa com fita dupla-face, evitando dessa forma o contato direto do óleo com os diásporos, criando uma atmosfera saturada pelos voláteis. O óleo essencial e o composto puro citral foram avaliados em três doses diferentes (1, 2 e 4  $\mu$ l), sendo a água destilada utilizada como controle. Cada tratamento foi realizado em quatro repetições. Os testes de germinação foram conduzidos em câmara de crescimento com temperatura média de 20°C e fotoperíodo de 12 h. O suprimento de luz foi proporcionado por lâmpadas fluorescentes (20 W).

A avaliação do efeito dos tratamentos sobre a velocidade de germinação foi realizada através da contagem periódica (cada 24 h) do número de diásporos germinados. A avaliação da porcentagem final de germinação foi obtida após 96 h para alface e 168 h para cebola. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi estimado a partir da fórmula (Borghetti & Ferreira, 2004):

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n}, \text{ onde:}$$

G = número de diásporos germinados.

N = número de dias após a semeadura.

O efeito do óleo essencial de *E. muticus* e do composto puro citral sobre o crescimento inicial das plântulas foi avaliado em três doses diferentes (1, 2 e 4 µl). Da mesma forma que no efeito sob a germinação, cinquenta diásporos de *A. cepa* (cv. Baia Periforme) e *L. sativa* (cv. Grand Rapids) foram distribuídos em placas de Petri, sobre papel-filtro embebido com 5 ml de água destilada, constituindo quatro repetições por tratamento. Os diásporos foram previamente germinados em água destilada e posteriormente submetidos ao tratamento com óleo essencial. No experimento com alface, o óleo foi aplicado 24 h após o momento de semeadura. No experimento com cebola, espécie para a qual o período de germinação é mais prolongado, aplicou-se o óleo 72 h após a semeadura; sendo o óleo aplicado em papel de celulose de 8 mm de diâmetro fixado no centro da tampa da placa com fita dupla-face. As plântulas em crescimento ficaram expostas aos voláteis por um período de 72 h, sendo em seguida realizada a mensuração do comprimento da raiz primária e do peso das plântulas obtidas. Os testes foram conduzidos em câmara de crescimento com temperatura média de 20°C e fotoperíodo de 12 h. O suprimento de luz foi proporcionado por lâmpadas fluorescentes (20 W). Os dados obtidos em todos os experimentos foram submetidos à análise de regressão.

### 3.5 Atividade de captura de radicais livres

A atividade antioxidante foi determinada pela redução do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) pelos antioxidantes presentes na amostra, seguindo o método descrito por Rufino *et al* (2007). Todas as populações coletadas foram avaliadas sendo utilizados dez indivíduos de cada população e cada amostra foi analisada em triplicata. O extrato foi obtido macerando o tecido vegetal fresco com metanol 80% (20x). A solução metanólica de DPPH (60  $\mu\text{M}$ ) foi preparada de forma a apresentar aproximadamente 0,5 de absorvância em 515 nm. A partir dessa solução as leituras foram feitas, onde se adicionou 2.980  $\mu\text{l}$  da solução de DPPH na cubeta e 20  $\mu\text{l}$  da amostra a ser avaliada. A absorvância foi obtida em espectrofotômetro até estabilização da absorvância por cerca de 3 min por amostra. A curva de calibração foi obtida com diferentes concentrações do DPPH. As concentrações de DPPH foram determinadas através da equação da curva de calibração ( $y = 0,009x - 0,006$ ,  $R^2 = 0,999$ ).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias separadas pelo Teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). O modelo de ANOVA empregado foi  $X_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$ , onde  $X_{ij}$  = observação da variável para a planta  $i$  na população  $j$ ,  $\mu$  = média geral do experimento,  $\tau_j$  = efeito fixo da população  $j$  e  $\varepsilon_{ij}$  = erro  $\sim N(0, \sigma^2)$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização das populações

As populações de *Elionurus muticus* foram avaliadas conforme critérios morfológicos, químicos e genéticos. A análise conjunta dos resultados permitiu a caracterização das populações coletadas no estado do Rio Grande do Sul, contemplando aspectos da biologia da espécie.

#### 4.1.1 Fenotípica

Os trabalhos realizados com o gênero *Elionurus* têm focado, principalmente, em descrições taxonômicas (Araújo, 1971; Renvoize, 1978; Longhi-Wagner, 2001; Watson & Dallwitz, 2002). A caracterização morfológica de espécies e indivíduos é de fundamental importância, uma vez que a determinação fenotípica deve ser a primeira etapa do estudo, possibilitando o estabelecimento de fatores relevantes para as etapas posteriores (Chies & Longui-Wagner, 2003). Nesse sentido, avaliações com base no fenótipo de sete populações naturais de *E. muticus* coletadas em diferentes regiões do Rio Grande do Sul foram realizadas.

Os caracteres avaliados apresentaram diferença significativa entre as populações (Tabela 2). As observações do caráter rebrote refletiram a

variabilidade entre as populações, com valores médios que variaram de 16 a 31 cm, em que as populações Fontoura Xavier e São Francisco de Paula apresentaram rebrote mais elevado (Tabela 2). Em contrapartida, a população Águas Claras apresentou o menor desempenho para este caráter. A variabilidade para rebrote foi observada em estudo anterior com cinco populações de *E. muticus*, onde as populações São Borja, São Francisco e Morro Santana apresentaram maior crescimento do que as demais populações (Füller *et al.*, 2010). Em ambos os trabalhos foi detectada a presença de variabilidade dentro das populações, o que pode ser observado pelo elevado desvio padrão, que apresentou magnitude de, aproximadamente, 25% em relação às médias (Tabela 2 e 3). O rebrote representa uma alteração no crescimento da planta, onde todos os recursos são utilizados de forma a maximizar o crescimento. Ele depende de dois fatores principais, o índice de área foliar e as reservas orgânicas, sendo um caráter que interfere na competitividade da planta em uma comunidade (Lemaire, 2001). Desta forma, as populações Fontoura Xavier e São Francisco de Paula poderiam apresentar vantagem em um ambiente competitivo em relação às demais populações.

O caráter largura foliar também apresentou variabilidade entre e dentro das populações, variando de 1,12 a 3,27 mm (Tabela 2 e 3). As populações Fontoura Xavier e São Francisco de Paula, mais uma vez, se destacaram em relação às demais. Anteriormente foi observado que a população São Francisco de Paula apresentava maior largura foliar (Füller *et al.*, 2010). No entanto, São Borja e Morro Santana, haviam se destacado para esse caráter. No presente trabalho foi verificado um comportamento diferente, possivelmente, a reduzida amostragem pode ter afetado os resultados. Além

disso, as comparações foram realizadas com populações diferentes, alterando os critérios de comparação. A largura foliar apresentou uma acentuada variabilidade entre os indivíduos, observada pela magnitude do desvio padrão, de cerca de 40%. A largura foliar é um evento ontogênico que possui papel na adaptação morfológica da planta, além de regular a produção de afilhos. Alterações na temperatura, umidade ou qualidade da luz podem produzir alterações na largura foliar (Lemaire & Agnusdei, 2000).

TABELA 2. Média e desvio padrão (DP) de caracteres agronômicos e morfológicos de populações naturais de *Elionurus muticus*, coletadas em Águas Claras (AC), Fontoura Xavier (FX), Morro Santana (MS), Morro São Pedro (MSP), São Borja (SB), São Francisco de Paula (SFP) e Uruguaiana (UR). Porto Alegre, 2013.

Pop	Rebrote (cm)		Largura Foliar (mm)		Peso fresco (g)		Porte**			
	Média	DP	Média	DP	Média	DP				
AC	16,0	c	4,0	2,08	b	0,9	2,48	b	1,1	E
FX	31,7	a	6,4	3,27	a	0,7	5,70	ab	2,3	E
MS	26,7	ab	6,4	1,31	c	0,5	7,37	a	3,0	P
MSP	19,0	bc	7,2	2,62	ab	0,4	3,53	ab	2,1	E
SB	25,2	ab	6,3	1,40	c	0,5	5,76	ab	3,1	SP
SFP	28,9	a	5,8	3,25	a	0,8	5,71	ab	1,8	E
Ur	21,2	bc	6,6	1,12	c	0,3	4,00	ab	1,3	P

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*\*P = prostrado; SP= semi-prostrado; E=ereto

TABELA 3. Amplitude de caracteres agronômicos e morfológicos de populações naturais de *Elionurus muticus*, coletadas em Águas Claras (AC), Fontoura Xavier (FX), Morro Santana (MS), Morro São Pedro (MSP), São Borja (SB), São Francisco de Paula (SFP) e Uruguaiana (UR). Porto Alegre, 2013.

Pop	Rebrote (cm)		Largura Foliar (mm)		Peso fresco (g)	
	Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx
AC	9	22	1,5	5,0	1,35	3,78
FX	20	39	2,0	4,0	2,10	10,66
MS	15	36	1,0	2,7	3,10	12,17
MSP	12	29	2,0	3,0	1,81	6,32
SB	15	29	1,0	2,8	1,95	11,08
SFP	19	29	2,0	4,5	3,51	8,27
Ur	12	36	0,9	1,3	2,83	5,95

Em relação ao peso fresco, a população Morro Santana se destacou em comparação às demais, embora apenas a população Águas Claras tenha diferido significativamente (Tabela 2). A variabilidade entre as populações não foi tão acentuada, considerando os outros caracteres avaliados. No entanto, o elevado desvio padrão, de cerca de 50% em relação às médias, pode indicar que a variabilidade está distribuída entre os indivíduos, diminuindo assim a diferença entre as populações. Os resultados obtidos estão de acordo com estudo anterior (Füller *et al.*, 2010). O acúmulo de biomassa é o resultado da diferença entre o aumento bruto em massa, devido à formação de novos tecidos, e a diminuição causada pela senescência e decomposição de tecidos mais velhos (Nascimento-Júnior & Adese, 2004). A exploração comercial da espécie depende muito da capacidade de produção de biomassa, principalmente considerando uma planta aromática, onde o rendimento de óleo é obtido a partir da massa da planta.

O enrolamento foliar foi observado em todas as populações, com exceção da população coletada em Águas Claras. As adaptações ou modificações anatômicas foliares decorrentes dos fatores abióticos do ambiente têm sido relacionadas a processos vitais, como fotossíntese e transpiração, o que altera a eficiência na qual a planta utiliza os recursos disponíveis para o seu desenvolvimento (Martin & Juniper, 1970). O enrolamento foliar pode ser uma estratégia para reduzir a área de transpiração na superfície, mantendo os estômatos em um microclima com umidade mais alta, evitando a seca (Taiz & Zeiger, 2006).

As populações também apresentaram variabilidade em relação ao hábito, sendo encontradas populações que apresentaram plantas de hábito

prostrado, semi-prostrado e ereto (Tabela 2, Figura 4). Yamamoto (2006) observou que o hábito vegetativo variava de acordo com o quimiotipo de *Lippia alba*. O conhecimento do hábito vegetativo é um aspecto importante para o cultivo de plantas, uma vez que permite planejar adequadamente a área de produção em termos de densidade populacional e espaçamento.

Outro aspecto relevante que foi observado durante a coleta das populações foi a diferença na distribuição espacial das touceiras. As populações Morro Santana e São Borja apresentavam as touceiras em menor densidade quando comparadas com as de Uruguaiana. Além disso, as touceiras de Fontoura Xavier, Morro Santana, São Borja e São Francisco de Paula eram mais altas, porém menos robustas em relação às de Uruguaiana, que apresentavam o hábito mais prostrado (Figura 4). A cada desfolhação ocorre uma rápida modificação na quantidade e na qualidade da luz absorvida e na estrutura do dossel. Nessas condições, as plantas tendem a desenvolver folhas mais longas e reduzir a taxa de afilamento, o que resulta em pastos de menor densidade populacional e de afilhos grandes (Nelson, 2000).

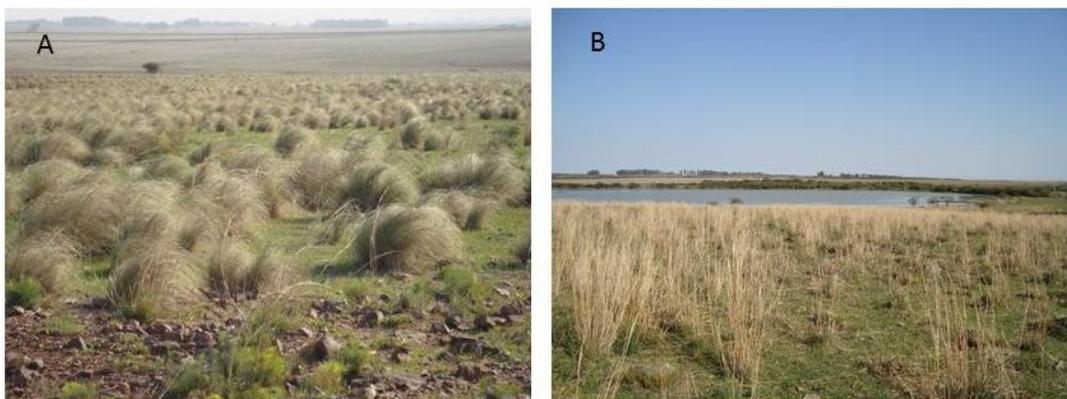


FIGURA 4. Populações naturais de *Elionurus muticus* em (A) Uruguaiana e (B) São Borja.

O odor cítrico, atribuído à presença de óleo essencial, é outro caráter que tem sido considerado importante na defesa e interação ecológica de plantas (Bakkali *et al.*, 2008). Esse caráter foi perceptível nas populações São Borja e Morro Santana, sendo que as demais não apresentaram odor cítrico característico. A população Fontoura Xavier apresentou forte odor, porém, não cítrico, possivelmente atribuído a outro composto majoritário.

#### 4.1.2 Química

O rendimento do óleo essencial de *E. muticus* apresentou diferença estatística entre as populações, sendo que São Borja, Morro Santana e Morro São Pedro demonstraram o maior rendimento médio, cerca de 0,7% (Tabela 4). De maneira geral, os resultados obtidos refletiram as diferenças notadas no campo, quando da coleta do germoplasma, onde as populações com maior rendimento de óleo apresentaram odor cítrico mais acentuado.

A composição e o rendimento dos óleos essenciais são determinados por inúmeros fatores, os quais são interdependentes e influenciam uns aos outros (Terblanche, 2000). Essas variáveis podem incluir variações sazonais, origem geográfica, variação genética, estágio ontológico, parte da planta utilizada, secagem pós-colheita e armazenamento (Hussain and others, 2008). No presente trabalho, a variável ambiental foi minimizada, uma vez que as plantas foram mantidas sob as mesmas condições. O que sugere que grande parte da variabilidade observada seja genética.

A população São Borja foi investigada com maior detalhamento, uma vez haver interesse especial no seu desempenho. A amplitude de variação no rendimento de óleo essencial em 56 indivíduos analisados foi de 0,13 a 2,19%,

sendo que 63 indivíduos não produziram biomassa suficiente para a extração. Esta parece ser uma limitação do método de hidrodestilação, que requer certa quantidade de tecido vegetal para uma eficiente extração. De qualquer forma, 19 indivíduos produziram mais do que 1% de óleo essencial, o que poderia refletir diretamente em uma alta produção de citral com um custo mais reduzido. Assim sendo, há indivíduos que poderiam ser selecionados como progenitores para a próxima geração em um esquema de seleção massal.

TABELA 4. Média, desvio padrão e amplitude de variação do rendimento de óleo essencial (%) de populações naturais de *Elionurus muticus*. Porto Alegre, 2011.

População	Média*	Desvio Padrão	Min	Máx
Águas Claras	0,48 bc	0,15	0,28	0,74
Fontoura Xavier	0,26 c	0,15	0,16	0,57
Morro Santana	0,66 ab	0,24	0,44	1,26
Morro São Pedro	0,77 a	0,40	0,19	1,47
São Borja	0,68 ab	0,14	0,13	2,19
Uruguiana	0,32 c	0,10	0,16	0,49

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

O valor de rendimento de óleo acima de 0,6%, observado em três populações, pode ser considerado elevado para espécies do gênero *Elionurus*, onde diversos autores constataram valores da ordem de 0,1 a 0,5% (Chagonda *et al.*, 2000; Mevy *et al.*, 2002; Hess *et al.*, 2007). Valores variados de rendimento de óleo têm sido descritos para outras gramíneas como *Vetiveria zizanioides*, com uma amplitude de 0,06% a 1,38% (Pripdeevech *et al.*, 2006; Kirici *et al.*, 2011); espécies do gênero *Bothriochloa*, com rendimento de 0,2% a 3,1% (Kaul *et al.*, 1998; Scrivanti *et al.*, 2009); *Melinis minutiflora*, que apresenta um baixo rendimento de 0,01% (Prates *et al.*, 1998) e espécies do gênero *Cymbopogon*, que variam de 0,2 a 1,4% (Chagonda *et al.*, 2000; Castro & Ramos, 2003; Padalia *et al.*, 2011; Gbenou *et al.*, 2012).

No gênero *Cymbopogon*, diversas espécies têm sido amplamente empregadas nas indústrias de perfumaria e farmacêutica, entre outras. Destaca-se principalmente o *C. citratus*, cujo óleo essencial é usado para a produção de  $\beta$ -ionona, na síntese da vitamina A e como antisséptico, por sua ação fungistática (Rauber *et al.*, 1999). Por estas inúmeras aplicações, o óleo essencial do *C. citratus* tem procura no mercado nacional e internacional e seus preços têm sido considerados compensadores, embora sua produção por hectare seja baixa. Isto se deve a três fatores: menor resistência ao frio, que queima as extremidades das folhas; crescimento mais lento e suscetibilidade à ferrugem da folha (Castro & Ramos, 2003).

Embora tenha sido observado em *C. citratus* valores que atingem o dobro do rendimento médio de *E. muticus*, a maioria dos trabalhos mostra uma média de 0,7%, ou seja, não diferindo potencialmente dos valores obtidos para *E. muticus*. Portanto, a demanda de óleo essencial com alto conteúdo de citral, abre a possibilidade da utilização de *E. muticus* como alternativa para a extração do óleo essencial. Kolb *et al.* (2007) avaliaram a exploração comercial de *E. muticus* em relação ao rendimento de óleo essencial. Realizando uma extrapolação dos resultados, eles obtiveram 40.000 kg/ha/ano de folha, com isso, foi produzido 216 kg/ha/ano de óleo essencial, gerando um lucro anual de U\$ 3.000,00 por ha/ano. A produção média de *C. citratus* é de 10.000 kg/ha/ano (Castro & Ramos, 2013).

Além de ser uma alternativa para a produção de citral, o *E. muticus* é uma espécie nativa do sul do Brasil, sendo adaptada às condições de ambiente e, por isso, requerendo pouco ou nenhum manejo. *E. muticus* é caracterizado por se desenvolver em terras pobres em nutrientes, atuando até mesmo como

recuperadora de terras fracas. Por outro lado, *C. citratus* é uma espécie introduzida no Brasil, sendo originária da Índia e, por isso, demanda um manejo mais intenso, como por exemplo, a exigência de altos conteúdos de matéria orgânica e nutrientes. Além disso, é uma espécie esgotante de solo, sendo indicado manter o plantio no máximo por cinco anos (Carneiro & Bonato, 2003; Castro & Ramos, 2003). No entanto, embora a produção de massa verde e de óleo essencial de *E. muticus* seja elevada, seu preço não é elevado, diminuindo com isso a lucratividade da cultura. Isto se deve principalmente ao fato de não ser um óleo tradicional nos mercados europeus de perfumes (Castro & Ramos, 2003).

A caracterização química do óleo essencial de *E. muticus* e *C. citratus* mostrou que o conteúdo de citral (neral + geranial) não difere entre as duas espécies, apesar do perfil geral do óleo essencial ser distinto entre as duas espécies, uma vez que o óleo essencial de *E. muticus* apresenta uma maior variedade de compostos químicos (Tabela 5). O citral foi o principal composto para ambas as espécies correspondendo a, aproximadamente, 80% do óleo essencial. Citral também é o composto majoritário do óleo essencial de espécies do gênero *Elionurus* coletadas na Argentina, Brasil, Uruguai e Zimbábue (Chagonda *et al.*, 2000; Kolb *et al.*, 2007; Hess *et al.*, 2007; Füller *et al.*, 2010).

Além disso, a caracterização química do óleo essencial permitiu observar a predominância de monoterpenos, que representaram cerca de 90% da constituição do óleo essencial, e também revelou a presença de alguns sesquiterpenos, tanto para *E. muticus*, quanto para *C. Citratus* (Tabela 5).

TABELA 5. Índice de Retenção (IR) em coluna DB-5 e porcentagem dos compostos do óleo essencial de *Elionurus muticus* e de *Cymbopogon citratus*. Perpignan, 2012.

Composto	IR Calculado	IR Literatura	E. <i>muticus</i>	C. <i>citratus</i>
$\alpha$ -pineno	939	939	2,73	-
Mirceno	989	991	2,70	12,43
Limoneno	1027	1029	0,55	-
Eucaliptol	1032	1030	0,44	0,37
Ocimeno cis beta	1041	1037	0,44	0,42
Linanol	1101	1097	1,75	1,01
Cis cis fotocitral	1162	1162	0,53	0,66
Trans trans fotocitral	1181	1181	1,20	1,33
Citronellal	1228	1228	0,15	0,17
Citronellal +	1228	1228	0,08	0,42
<b>Neral</b>	<b>1239</b>	<b>1238</b>	<b>30,02</b>	<b>32,57</b>
Geraniol	1252	1253	1,08	4,07
<b>Geranial</b>	<b>1275</b>	<b>1267</b>	<b>44,35</b>	<b>41,61</b>
Bornil acetato	1284	1285	0,16	-
$\alpha$ -longipineno	1345	1351	0,02	-
$\alpha$ -ylangeno	1365	1365	0,01	-
Geranil acetato	1377	1381	0,80	1,26
$\beta$ -cariofileno	1413	1419	0,27	-
Aromadendreno	1478	1475	0,07	-
Ar-curcumeno	1477	1481	0,27	-
$\beta$ -selineno	1489	1485	1,33	-
Zingibereno	1491	1494	0,17	-
$\gamma$ -cadineno	1507	1512	0,01	-
Elemol	1532	1543	0,26	-
Trans nerolidol	1559	1563	0,02	-
Óxido de cariofileno	1571	1578	0,14	-
10-epi-gamma-				
Eudesmol	1602	1602	0,20	-
Isospatulenol	1621	1625	0,02	-
Himalachol	1651	1654	0,08	-

Os monoterpenos são as moléculas de maior ocorrência entre os terpenos e por serem pequenas, conferem mais volatilidade ao óleo essencial. Os óleos essenciais de ambas as espécies apresentam as características típicas de óleos ricos em monoterpenos, ou seja, coloração clara, baixa viscosidade e alta volatilidade. Devido a essas características, os óleos essenciais ricos em monoterpenos são amplamente empregados como

aromatizantes e repelentes. Além disso, por serem moléculas pequenas, penetram com maior facilidade em tecidos e células. Em contrapartida, óleos ricos em sesquiterpenos, apresentam-se mais viscosos e menos voláteis e, por isso, devido ao seu aroma duradouro e baixa volatilidade, geralmente são empregados como fixadores ou notas de fundo em aromatizantes (Schnaubelt, 1998).

Silou *et al.* (2006), analisando a composição do óleo essencial das folhas de *E. Hensii*, nativo do Congo, notaram a predominância dos compostos cis- e trans-p-menta-2,8(9)-dien-1-ol, cis- e trans-p-menta,1(7)8-dien-2-ol, 2-undecanona e 2-tridecanona. Ainda na África, Mevy *et al.* (2002) obtiveram, a partir de partes aéreas de *E. elegans*, os seguintes compostos principais: canferenona (43,0%), óxido de cariofileno (4,9%) e bisabolona (4,9%). No Brasil, a composição do óleo essencial varia de acordo com a região. Na região central verificou-se a presença de canfeno (11,5%), (E)-cariofileno (17,9%) e espatulenol (18,6%) como principais componentes (Scramim & Saito, 2000). No sul e sudeste do Brasil, especialmente nas regiões de fronteira com a Argentina e Uruguai, se identificou a presença de geranial e neral como principais constituintes do óleo essencial (Silva *et al.*, 2009; Füller *et al.*, 2010).

Trabalhos têm indicado que a presença de citral se dá, principalmente, em populações do sul do hemisfério sul. Possivelmente essa presença esteja associada a condições climáticas que favorecem a produção deste composto. Além disso, *Elionurus* e *Cymbopogon* são gêneros da família Poaceae, pertencentes à tribo Andropogoneae, que engloba 90% das gramíneas aromáticas e é caracterizada pela presença de citral como composto

majoritário. Assim, a presença de citral no óleo essencial destas espécies pode ser um traço adaptativo para esta tribo (Kaul & Vats, 1998).

A quantificação de óleo essencial se dá, principalmente, pelo método de cromatografia gasosa, que consiste em um método físico de separação dos componentes de uma mistura através de uma fase gasosa móvel sobre um solvente estacionário (Aquino Neto & Nunes, 2003). Apesar de ser o método mais empregado, sua análise exige equipamentos como cromatógrafo gasoso e espectrômetro de massas, que apresentam custo relativamente elevado, além disso, é um método laborioso que demanda tempo. Assim sendo, Dudai *et al.*, (2004) propuseram um método colorimétrico para quantificação de citral por espectrofotometria através do reagente de Schiff. Os autores obtiveram uma correlação positiva entre a quantificação de citral pelo reagente de Schiff e por cromatografia gasosa.

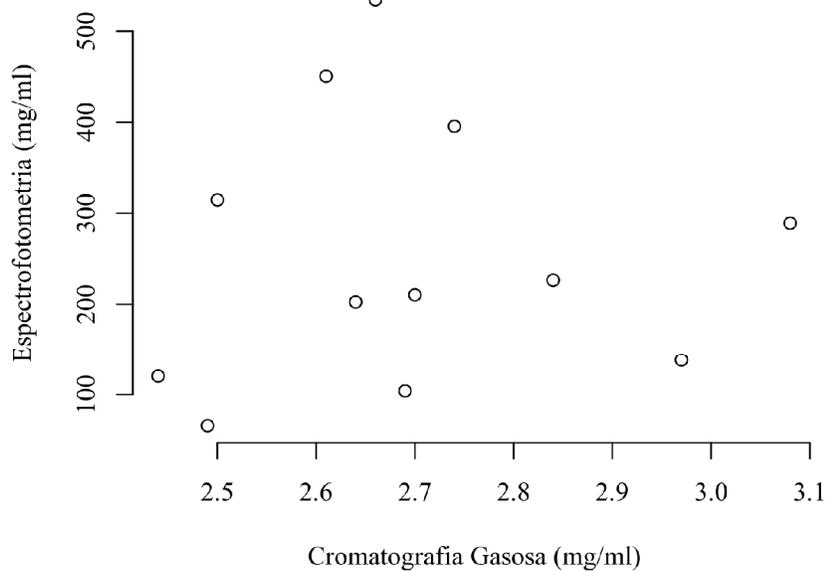


FIGURA 5. Correlação entre as concentrações de citral mensuradas

pelas técnicas de espectrofotometria e cromatografia gasosa. Porto Alegre, 2013.

Os resultados obtidos no presente trabalho, indicaram uma baixa correlação ( $r = 0,07$ ) (Figura 5). Uma das possíveis causas desta baixa correlação pode ter sido o reduzido número de indivíduos avaliados, apenas 12, tornando a validação do método ineficaz. Outro fator importante é o fato de que o reagente de Schiff interage com grupos aldeído, sendo o método baseado na característica do citral de apresentar o grupo aldeído.

Ao observar o perfil químico do óleo, é possível verificar que além do citral, havia mais quatro compostos com essa característica (cis-cisfotocitral, trans-transfotocitral, citronellal e citronellal+). Sendo assim, possivelmente o reagente interagiu com esses outros compostos acarretando em uma superestimação da quantificação de citral. A validação deste método é de extrema importância, a facilidade, rapidez e baixo custo o tornam uma excelente ferramenta na seleção de genótipos com alta concentração de citral.

#### **4.1.3 Genética**

A variabilidade genética se constitui na fonte primária dos estudos genéticos e sem ela não seria possível ocorrer evolução nas espécies. Da mesma forma, o sucesso de qualquer programa de melhoramento depende, fundamentalmente, da variabilidade genética entre os genitores envolvidos (Allard, 1960). Nesse sentido, as populações de *E. muticus* foram avaliadas através de marcadores moleculares AFLP. A variação nos perfis de banda de AFLP dos 85 genótipos estudados resultou em 29 marcadores consistentes

para análise, todos polimórficos. Esse número de bandas foi obtido através da amplificação de duas combinações de *primers*.

As relações genéticas entre as populações foram estimadas através da distância Euclidiana. O dendrograma demonstrou que, de modo geral, os marcadores agruparam as populações de acordo com a localização geográfica (Figura 6). O agrupamento entre as populações Morro Santana e Morro São Pedro, bem como o agrupamento entre São Borja e Uruguaiana, refletiu a origem geográfica. No entanto, ao considerar o agrupamento entre Fontoura Xavier, Águas Claras e São Francisco de Paula, não foi possível atribuir a similaridade à origem geográfica. O grupo formado pelas populações de Uruguaiana e São Borja foi mais distante em relação às demais populações. Em estudo anterior, trabalhando com cinco populações naturais de *E.muticus*, foi observada uma tendência ao agrupamento por origem geográfica, sendo que as populações São Borja e São Francisco de Paula se mantiveram distantes e São Borja apresentou maior similaridade com a população Morro Santana (Füller *et al.*, 2010).

A estimativa da porcentagem de locos polimórficos revelou que as populações São Borja, Uruguaiana e Fontoura Xavier apresentaram variabilidade genética mais acentuada em relação às demais, entre 72 e 82% (Tabela 6). Nas populações São Borja e Fontoura Xavier a amostragem foi maior, o que pode ter refletido nessa maior variabilidade. No trabalho anterior, Morro Santana apresentou uma variabilidade mais expressiva em relação a São Borja e a população São Francisco de Paula apresentou a menor variabilidade, cerca de 70% (Füller *et al.*, 2010).

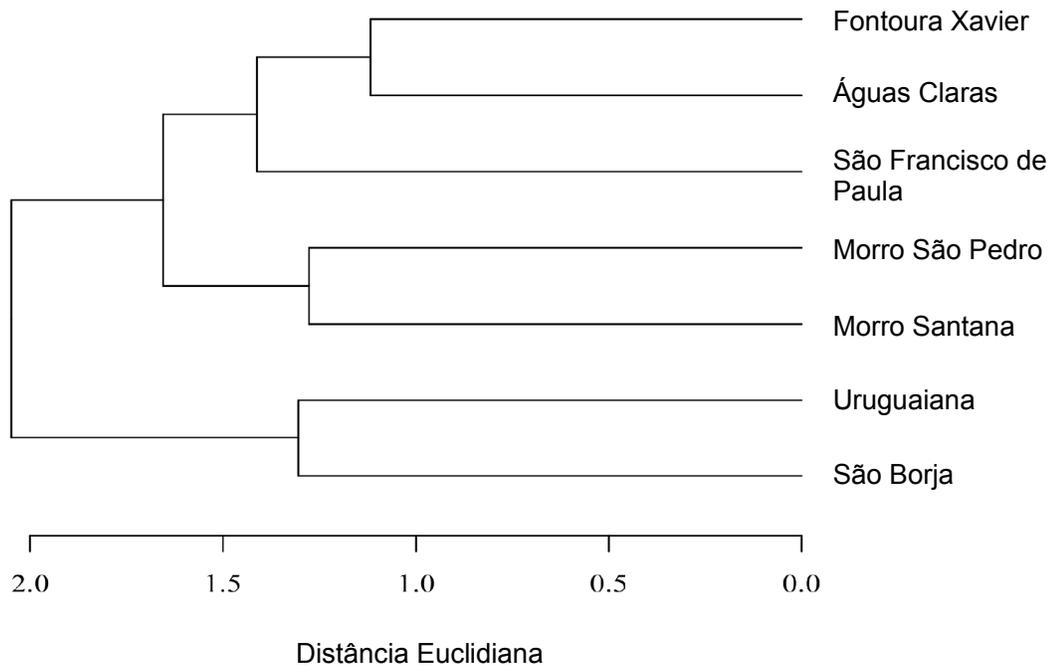


FIGURA 6. Agrupamento de populações naturais de *Elionurus muticus* através da técnica de AFLP, com base na distância Euclidiana. Porto Alegre, 2013.

A heterozigosidade observada variou de 0,10 a 0,29 entre as populações, apresentando uma heterozigosidade total de 0,36. Os valores descritos para a heterozigosidade observada foram similares aos valores da heterozigosidade esperada, indicando uma tendência à polinização cruzada (Tabela 6). A população Águas Claras apresentou uma baixa heterozigosidade em relação às demais. O coeficiente de endogamia mostrou que, de maneira geral, há reduzida homozigosidade, observada por valores inferiores a 0,1, sugerindo, mais uma vez polinização cruzada (Tabela 6). As populações Águas Claras e São Francisco de Paula apresentaram um maior coeficiente de endogamia (0,1), indicando que nessas populações há uma maior frequência

de homozigotos em comparação com as demais populações, sendo as populações São Borja e Morro São Pedro menos endogâmicas.

TABELA 6. Proporção de locos polimórficos (P), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) e coeficiente de endogamia (f) para sete populações de *Elionurus muticus*. Porto Alegre, 2013.

População	N*	P (95%)	Ho	He	f
Águas Claras	10	24,13	0,10	0,11	0,10
Fontoura Xavier	17	72,41	0,27	0,28	0,06
Morro Santana	10	51,72	0,19	0,20	0,05
Morro São Pedro	10	55,17	0,25	0,26	0,04
São Borja	18	82,75	0,29	0,30	0,04
São Francisco de Paula	10	51,72	0,20	0,22	0,10
Uruguaiana	10	72,41	0,26	0,28	0,07
Total	85	89,65	0,36	0,36	0,0

\*N = número de indivíduos avaliados.

O valor  $F_{st}$  de Wright obtido foi de 0,28, o que indica uma diferenciação entre as populações (Wright, 1978). Essa diferenciação era esperada, pois é um reflexo da distância geográfica entre as populações, que inviabiliza o fluxo gênico entre elas. Valor similar foi observado para populações naturais de *E. muticus* (Füller *et al.*, 2010). A análise da variância molecular revelou maior variabilidade intrapopulacional (76%) do que interpopulacional (24%) (Tabela 7), o que fortalece a hipótese de ocorrência preferencial de alogamia na espécie.

TABELA 7. Análise de variância molecular (AMOVA) em populações naturais de *Elionurus muticus*. Porto Alegre, 2013.

Causas da variação	GL	QM	SQ	Variância total (%)
Entre Populações	6	12,56**	75,34	24
Dentro da População	69	3,38	233,15	76

## 4.2 Citogenética de *Elionurus muticus*

Estudos citogenéticos são fundamentais para a caracterização de coleções de germoplasma, bem como, para fornecerem informações importantes em programas de melhoramento, auxiliando na compreensão de processos evolutivos e no estudo taxonômico das espécies (Pozzobon, 2005). Dessa forma, indivíduos da população São Borja foram caracterizados citogeneticamente através da análise da meiose, mitose e viabilidade de pólen.

### 4.2.1 Determinação do número cromossômico e cariótipo

Os indivíduos avaliados apresentaram 10 pares de cromossomos ( $2n=20$ ), sendo todos cariológicamente homogêneos. Os cromossomos de *E. muticus* mediram entre 3 e 6  $\mu\text{m}$  e foram considerados relativamente grandes, quando comparado com outras plantas (Tabela 8, Figura 7). De maneira geral, eles apresentaram uma fácil visualização em aumento de 40x e, muitas vezes, não foi possível a visualização inteira da célula em aumento de 100x.

TABELA 8. Dados do cariótipo de *Elionurus muticus*: comprimento médio e índice centromérico de cada par de cromossomos e comprimento total do complemento haplóide (TCL). Porto Alegre, 2011.

Cromossomo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Comprimento total ( $\mu\text{m}$ )	6,25	5,64	5,50	5,12	5,00	4,55	4,54	4,09	3,86	3,71
IC	0,38	0,40	0,39	0,39	0,38	0,44	0,20	0,30	0,35	0,33
TCL ( $\mu\text{m}$ )										48,3

O tamanho dos cromossomos demonstra uma grande variação entre as espécies, compreendendo plantas com cromossomos muito pequenos como os gêneros *Leucaena* (cerca de 1  $\mu\text{m}$ ) (Schifino-Wittmann, 2004), *Jatropha* (1,71-1,24  $\mu\text{m}$ ) (Carvalho *et al.*, 2008) e a espécie *Maytenus ilicifolia* (cerca de 0,5  $\mu\text{m}$ ) (Lunardi *et al.*, 2004), cromossomos de tamanho médio, como a espécie

*Trifolium argentinense* (1,6 a 2,8  $\mu\text{m}$ ) (Conterato *et al.*, 2010) e o gênero *Elytrigia* (ca 2  $\mu\text{m}$ ) (Mao *et al.*, 2010) e de tamanho grande, como o gênero *Lathyrus* (4-7  $\mu\text{m}$ ) (Klamt & Schifino-Wittmann, 2000) e a espécie *Cipura paludosa* (ca 9,5  $\mu\text{m}$ ) (Alves *et al.*, 2011).



FIGURA 7. Cromossomos somáticos de *Elionurus muticus* em metáfase com  $2n=2x=20$ . A barra de escala corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . Porto Alegre, 2011.

De maneira geral, as gramíneas apresentam uma alta diversidade de número cromossômico, tendo número básico cromossômico com variação de  $x= 2-18$ . *E. muticus* pertence à subfamília Panicoideae, a qual apresenta uma predominância de número básico  $x = 9$  e  $10$  (Hilu, 2004). O número de cromossomos encontrados neste trabalho está de acordo com trabalhos

anteriores realizados com outras espécies do gênero *Elionurus*, que também relatam a presença de dez pares de cromossomos (Brown, 1951; Gould & Soderstrom, 1967; Watson & Dallwitz, 1994). No entanto, há registro de uma espécie africana, *E. argenteus*, que apresenta número básico  $x=5$  (Celarier, 1957).

O cariótipo apresentou um predomínio de cromossomos submetacêntricos, sendo eles quatro cromossomos (1, 3, 4 e 5), além disso, apresentou cinco cromossomos acrocêntricos (6, 8 e 9), um subacrocêntrico (7) e dois metacêntricos (2 e 6) (Figura 8). A análise cariotípica permitiu ainda observar a presença de um par cromossômico com satélite (7). A fórmula cariotípica determinada foi  $2m + 3sm + 4a + 1sa^{SAT}$  e o TCL = 48,3  $\mu\text{m}$ . A localização dos cromossomos satélites são sempre constantes nos indivíduos, a não ser em casos de alterações estruturais e, portanto, podem ser usados como marcadores morfológicos cromossômicos. Em geral ocorre um par de cromossomos com satélites nas espécies diplóides, como por exemplo, *Ranunculus alpestris* (Baltisberger & Widmer, 2009), *T. argentinense*, (Conterato *et al.*, 2010), *Lathyrus* (Klamt & Schifino-Wittmann, 2000) e *Neomarica* (Alves *et al.*, 2011) entre outros. Muitas vezes não é possível, por problemas técnicos, visualizar os cromossomos com satélite em todas as células. Eventualmente podem ocorrer mais de um par com satélites mesmo em espécies diplóides, como observado em uma população de *T. riograndense* (Schifino-Wittmann & Moraes-Fernandes, 1988).

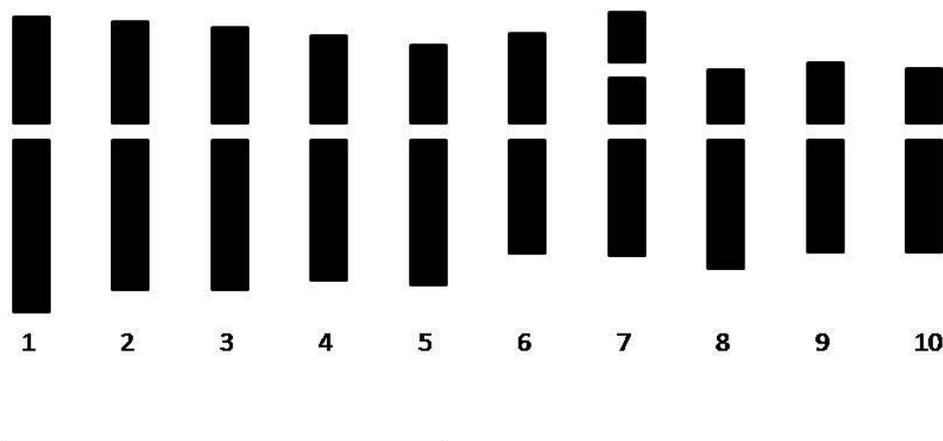


FIGURA 8. Idiograma esquemático dos cromossomos de *Elionurus muticus*. A barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m. Porto Alegre, 2011.

Pelos dados apresentados, o cariótipo de *E. muticus* pode ser classificado como do tipo 2A pelo índice de simetria do cariótipo de Stebbins (1971). De acordo com Stebbins (1971) haveria uma tendência evolutiva à assimetria cariotípica. Porém, como não há informações sobre cariótipo de outras espécies de *Elionurus*, não é possível fazer comparações.

#### 4.2.2 Determinação do número cromossômico gamético e análise do comportamento meiótico

O tamanho grande dos cromossomos permitiu uma visualização precisa das associações cromossômicas. Todos os indivíduos avaliados apresentaram  $n=10$  em diacinese (Tabela 9, Figura 9), não apresentando variação e concordando com o número somático avaliado ( $2n=20$ ). Todas as fases da meiose I foram observadas, no entanto, para a meiose II, não foi possível observar a metáfase e a anáfase. Como células normais foram consideradas

aquelas com 10 bivalentes e as que não apresentaram pontes ou cromossomos retardatários.

As análises mostraram que, de maneira geral, *E. muticus* apresenta uma divisão meiótica regular. Associações bivalentes foram predominantes, aparecendo em todos os indivíduos. Nos indivíduos SB45, SB46 e SB47 foram observadas, em algumas células, a presença de univalentes. O indivíduo SB43 apresentou cerca de 5% das células com pontes cromossômicas (Figura 9). Em populações naturais a ocorrência de irregularidades meióticas, em geral, não é comum, apesar de exceções como, por exemplo, algumas espécies do gênero *Scenecio* (Lopes *et al.*, 2002) e *Onobrychis chorassanica* (Ranjbar *et al.*, 2010). A baixa frequência de anormalidades meióticas observadas em *E. muticus* concorda com o observado em grande parte das populações naturais de espécies de plantas, como *Bidens pilosa* (Fachinetto *et al.*, 2008) e *Vriesea gigantea* (Palma-Silva *et al.*, 2008).

TABELA 9. Análise do comportamento meiótico de *Elionurus muticus*. Porto Alegre, 2011.

Indivíduo	Meiose I			
	Associação Diacinese e Metáfase I	Segregação Anáfase e telófase I	Outras Telófase II	Total células
SB01	10II (78) <sup>1</sup>	10-10 (07)	-	85
SB02	10II (87)	10-10 (13)	-	100
SB20	10II (06)	10-10 (20)	Normal (2)	32
SB25	10II (42)	10-10 (31)	Normal (1)	75
SB33	10II (17)	10-10 (24)	Normal (4)	45
SB43	10II (84)	10-10 (53)(3) P	-	140
SB44	10II (43)	-	-	43
SB45	10II (43)8II + 2I (1)	10-10 (1)	-	45
SB46	10II (33)8II + 2I (1)	10-10 (11)	-	45
SB47	10II (49)8II + 2I (1)	10-10 (14)	Normal (3)	66

<sup>1</sup>I = univalentes; II= bivalentes, P= células com pontes cromossômicas. Número de células entre parênteses.

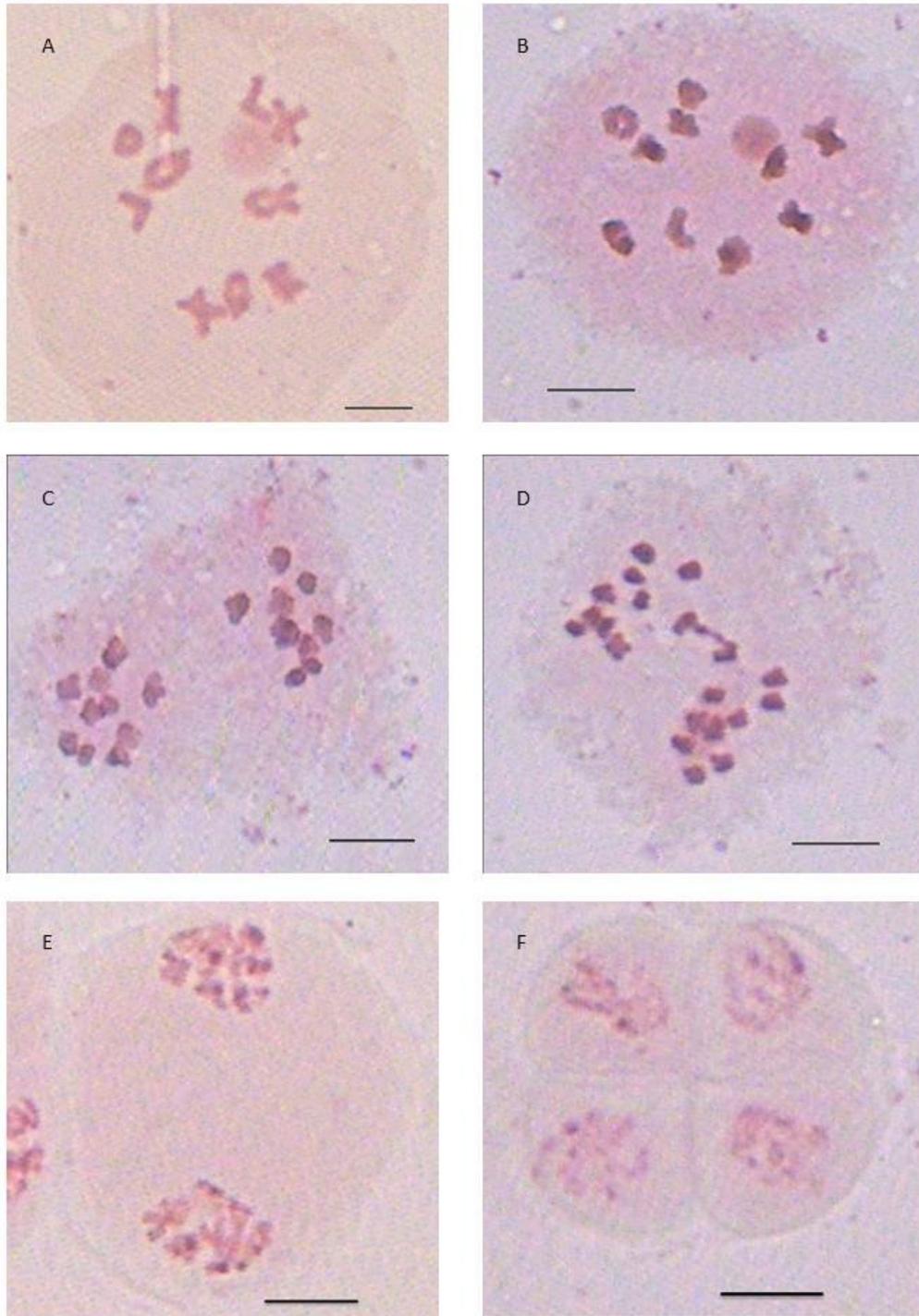


FIGURA 9. Células em meiose de *Elionurus muticus*. (A-B) células em diacinese, (C) célula em anáfase I, (D) célula em anáfase I com ponte, (E) célula em telófase I. (F) tétrades. A barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m. Porto Alegre, 2011.

#### 4.1.3 Estimativa da viabilidade de grãos de pólen

De maneira geral, a espécie *E. muticus* não demonstrou irregularidades dos grãos de pólen. As populações estudadas apresentaram uma alta viabilidade de grãos de pólen, embora a população Morro Santana tenha tido uma fertilidade reduzida em comparação com as outras populações avaliadas (Tabela 10). A alta viabilidade encontrada na população São Borja está de acordo com os dados obtidos para comportamento meiótico, onde se observou uma meiose regular, resultando em grãos de pólen viáveis. Pólens vazios foram encontrados em baixa frequência, sendo que nenhuma outra forma de anormalidade foi observada (Figura 10).

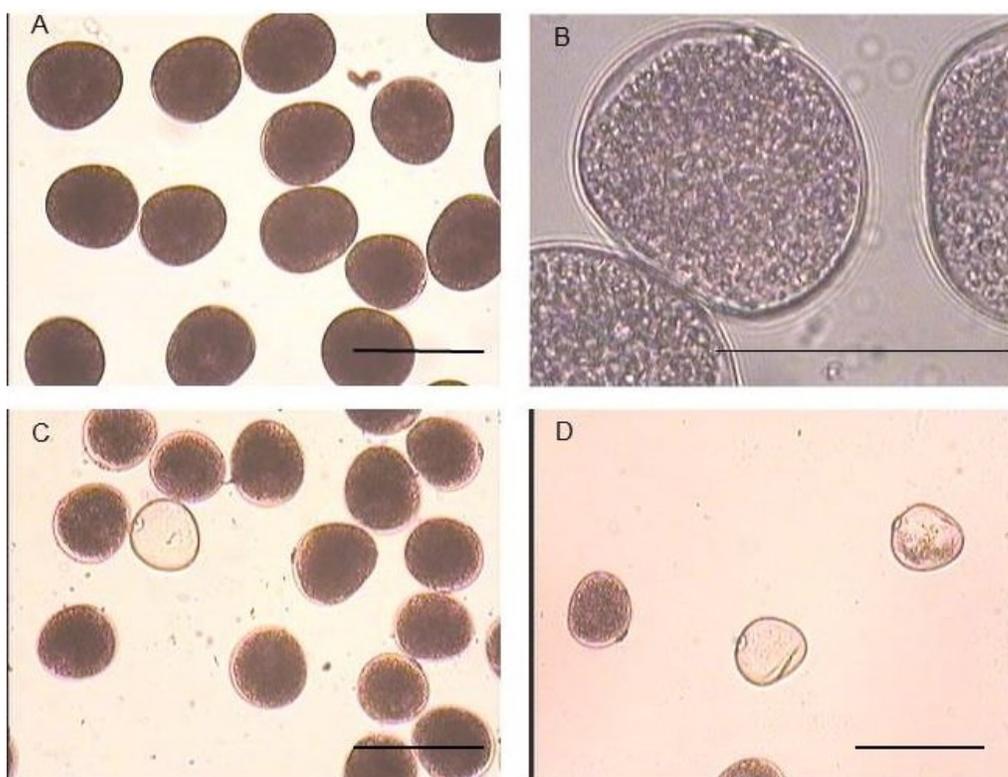


FIGURA 10. Grãos de pólen de *Elionurus muticus*. (A-B) grãos viáveis, (C-D) grãos viáveis (escuros) e grãos vazios (claros). A barra de escala corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . Porto Alegre, 2011.

Estudos têm demonstrado que a viabilidade dos grãos de pólen e a germinação são altamente correlacionadas (Borlat & Pirlak, 1999). Portanto, a viabilidade encontrada no presente trabalho sugere uma formação normal de gametas.

TABELA 10. Média e desvio padrão da porcentagem de pólen férteis em três populações naturais de *Elionurus muticus*. Porto Alegre, 2011.

População	Média*	Desvio Padrão
Morro Santana	85,0 b	4,7
São Borja	98,2 a	5,4
Uruguaiana	98,8 a	2,5

\*Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4. 3 Determinação de atividade biológica de *Elionurus muticus*

Atualmente a procura por produtos naturais tem crescido consideravelmente. Nesse sentido, muitos óleos essenciais constituem alternativas eficazes ou complementos de compostos sintéticos da indústria química (Bakkali *et al.*, 2007). Sendo assim, é importante desenvolver uma melhor compreensão das atividades biológicas dos óleos essenciais e extratos naturais, bem como seu modo de ação, visando novas aplicações na saúde humana, agricultura e meio ambiente.

##### 4.3.1 Controle de doenças fúngicas através do uso de óleo essencial

A atividade fungicida do óleo essencial de *E. muticus* foi testada contra três fungos, *Botrytis cinerea*, *B. alli* e *Penicillium expansum*. Esses fungos são responsáveis por consideráveis perdas em pós-colheita de frutas e legumes, podendo gerar prejuízos de até 90% (Tripathi & Dubey, 2004). Além disto, eles podem servir de modelo para relacionar o efeito fungicida do extrato estudado

(Ben-Yehoshua *et al.*, 1992; Rodov *et al.*, 1995). Todos os testes realizados tiveram como tratamento comparativo o óleo essencial de *C. citratus* e o citral, adquiridos comercialmente. *C. citratus* foi empregado por sua importância no mercado mundial de citral. Os tratamentos de contato foram realizados com base no percentual de óleo essencial aplicado, sendo importante considerar na interpretação dos resultados a diferença de concentração em µg/ml entre os três tipos de óleo estudados (Tabela 11).

TABELA 11. Concentração em µg/ml das diferentes concentrações (%) de óleo essencial aplicadas nos fungos fitopatogênicos. Perpignan, 2012.

Concentração (%)	<i>Elionurus muticus</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	Citral
0,010	1,71	1,79	1,66
0,015	2,56	2,69	2,49
0,020	3,42	3,59	3,32
0,030	5,13	5,39	4,99

Os resultados da aplicação por contato nas colônias do fungo *B. cinerea* demonstraram coeficientes de regressão significativos, indicando a efetividade de todos os óleos essenciais testados (Figura 11A, 11C e 11E). O composto puro citral e o óleo essencial de *C. citratus* apresentaram uma atividade mais elevada, inibindo o crescimento micelial em uma concentração de 0,015%, enquanto o óleo essencial de *E. muticus* inibiu na concentração de 0,020%. No entanto, ao considerar a concentração de cada composto, o citral apresentou atividade mais elevada em comparação ao óleo essencial de *C. citratus*, pois na concentração de 0,015% havia 2,49 µg/ml de citral, enquanto que o óleo essencial de *C. citratus* apresentava uma concentração de 2,69 µg/ml.

Da mesma forma, no teste de fumigação para o fungo *B. cinerea*, os coeficientes de regressão foram também significativos, havendo a total inibição do crescimento micelial com todos os óleos essenciais testados (Figuras 11B,

11D e 11F). Novamente o resultado mais consistente foi observado com o composto puro citral, onde houve a inibição de 100% do crescimento com uma concentração de  $1 \times 10^{-3}$   $\mu\text{l/ml}$  de ar. O fungo respondeu aos óleos essenciais de *E. muticus* e de *C. citratus* nas concentrações de  $2 \times 10^{-3}$   $\mu\text{l/ml}$  e  $4 \times 10^{-3}$   $\mu\text{l/ml}$ , respectivamente.

A análise de regressão permitiu estimar a concentração letal aguda ( $CL_{50}$ ), que refletiu os resultados obtidos para o tratamento por contato, onde o óleo essencial de *C. citratus* e o citral apresentaram atividade mais elevada, correspondendo ambas a 0,125% (Tabela 12). Já para o tratamento por fumigação, a  $CL_{50}$  revelou uma atividade mais elevada associada aos tratamentos citral, seguido do óleo essencial de *C. citratus*.

TABELA 12. Concentração letal aguda ( $CL_{50}$ ) do óleo essencial (OE) de *Elionurus muticus*, de *Cymbopogon citratus* e de citral, sobre *Botrytis cinerea*. Perpignan, 2012.

Tratamento	Contato (%)	Fumigação ( $\mu\text{g/ml}$ )
OE <i>E. muticus</i>	0,175	0,75
OE <i>C. citratus</i>	0,125	0,68
Citral	0,125	0,46

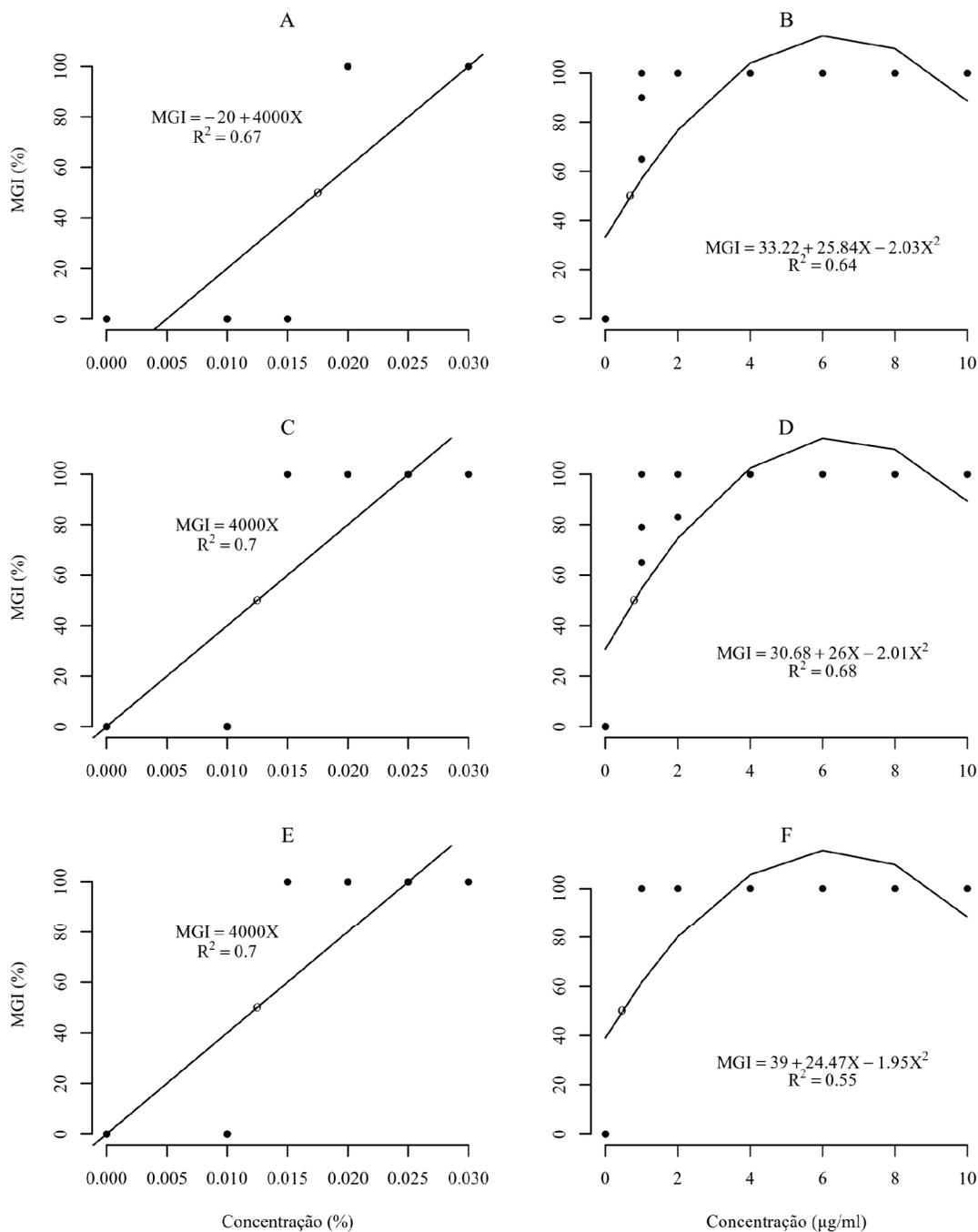


FIGURA 11. Inibição do crescimento micelial (MGI) do fungo *Botrytis cinerea* submetido a diferentes concentrações de óleo essencial aplicadas por dois métodos distintos: A) óleo de *Elionurus muticus* aplicado por contato; B) óleo de *Elionurus muticus* aplicado por fumigação; C) óleo de *Cymbopogon citratus* aplicado por contato; D) óleo de *Cymbopogon citratus* aplicado por fumigação; E) Citral aplicado por contato; F) Citral aplicado por fumigação. Perpignan, 2012.

Os resultados do tratamento por contato e por fumigação sobre o fungo *B. allii* também permitiram observar que todos os tratamentos apresentaram atividade fungicida, considerando a significância dos coeficientes de regressão estimados. O tratamento por contato demonstrou que a maior atividade foi atribuída ao citral, que inibiu totalmente o crescimento micelial na concentração 0,015, seguido pelo óleo essencial de *E. muticus* (0,02%) e o de *C. citratus* (0,03%) (Figuras 12A, 12C e 12E). No entanto, para o tratamento por fumigação, a atividade mais elevada foi observada para citral e óleo essencial de *C. citratus*, na qual ambos inibiram totalmente o crescimento micelial em uma concentração de  $8 \times 10^{-3}$  µl/ml de ar, enquanto o óleo essencial de *E. muticus* inibiu a  $10 \times 10^{-3}$  µl/ml de ar (Figuras 12B, 12D e 12F).

A concentração letal aguda estimada pela regressão para o citral foi de 0,125% e para *E. muticus*, 0,175% (Tabela 13). Já para o óleo essencial de *C. citratus* a equação de regressão não atingiu um MGI de 50%, mesmo na concentração mais elevada, de 0,03%. No experimento com fumigação a dose letal aguda estimada revelou o citral como tratamento mais eficaz, seguido pelo óleo de *E. muticus*.

TABELA 13. Concentração letal aguda (CL<sub>50</sub>) do óleo essencial (OE) de *Elionurus muticus*, de *Cymbopogon citratus* e de citral, sobre *Botrytis allii*. Perpignan, 2012.

Tratamento	Contato (%)	Fumigação (µg/ml)
OE <i>E. muticus</i>	0,175	3,96
OE <i>C. citratus</i>	-	4,94
Citral	0,125	3,48

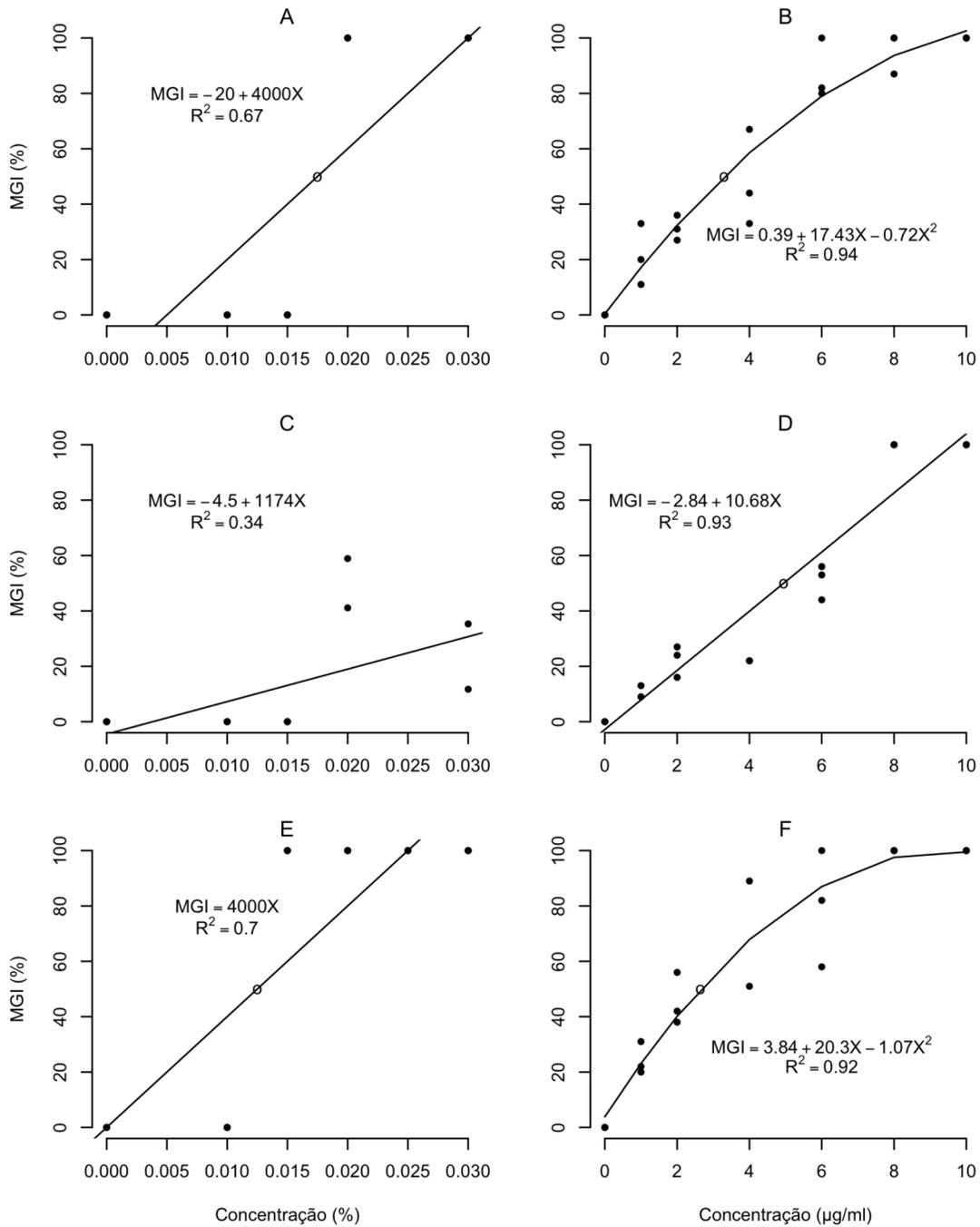


FIGURA 12. Inibição do crescimento micelial (MGI) do fungo *Botrytis. allii* submetido a diferentes concentrações de óleo essencial aplicadas por dois métodos distintos: A) óleo de *Elionurus muticus* aplicado por contato; B) óleo de *Elionurus muticus* aplicado por fumigação; C) óleo de *Cymbopogon citratus* aplicado por contato; D) óleo de *Cymbopogon citratus* aplicado por fumigação; E) Citral aplicado por contato; F) Citral aplicado por fumigação. Perpignan, 2012.

No experimento com o fungo *P. expansum* os tratamentos por contato revelaram coeficientes de regressão significativos, porém apenas os óleos essenciais apresentaram linearidade (Figuras 13A e 13C) Em relação ao citral houve uma tendência de ausência de resposta a partir da concentração de 0,015% (Figura 13E). No teste por contato, o fungo *P. expansum* apresentou uma resposta aos tratamentos similar à obtida para *B. cinerea*, onde o citral e o óleo essencial de *C. citratus* apresentaram uma atividade mais elevada (0,015%) em comparação com o óleo essencial de *E. muticus* (0,02%). Assim como no fungo *B. cinerea*, o citral apresentou uma atividade mais elevada ao se considerar a concentração do composto em  $\mu\text{g/ml}$ . O tratamento por fumigação apresentou regressão quadrática, revelando uma diminuição da inibição total do crescimento micelial com o aumento da concentração do composto aplicado. Os resultados obtidos indicaram que, mais uma vez o citral apresentou maior atividade em relação aos demais tratamentos, inibindo totalmente o crescimento micelial na concentração  $2 \times 10^{-3} \mu\text{l/ml}$ . O óleo essencial de *C. citratus* apresentou atividade mais elevada em relação ao óleo essencial de *E. muticus* (Figura 13B, 13D, 13F).

A concentração letal aguda estimada para o fungo *P. expansum* revelou, novamente, o citral como tratamento mais eficiente tanto para o tratamento por contato, quanto por fumigação. Contudo, no tratamento por contato, o óleo essencial de *E. muticus* apresentou um desempenho superior ao *C. citratus*, diferindo dos resultados obtidos para concentração inibitória total (Tabela 13). Para o tratamento por fumigação, a dose letal aguda estimada refletiu os resultados obtidos para concentração inibitória total, onde o citral apresentou mais atividade, seguida do óleo essencial de *C. citratus* (Tabela 13).

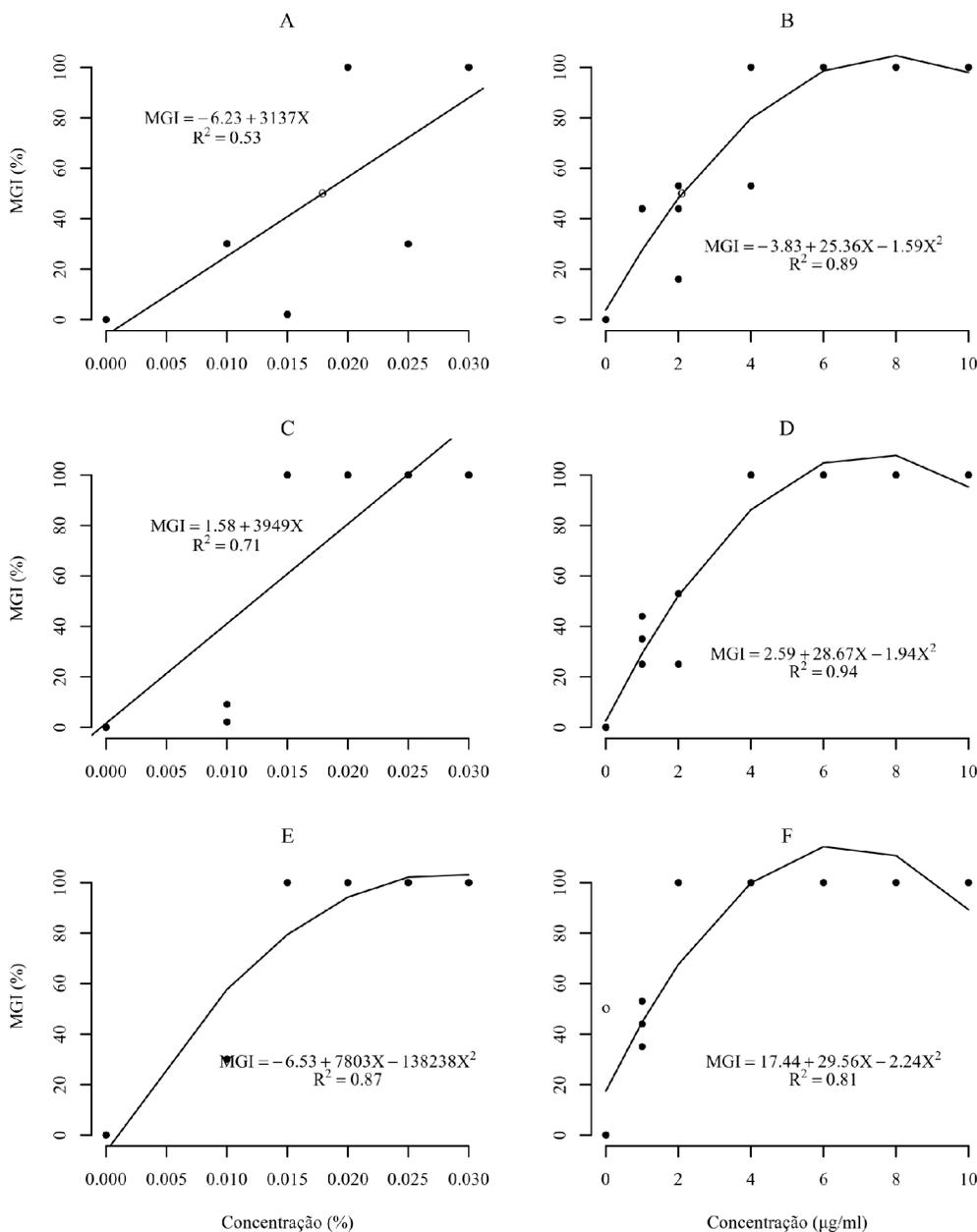


FIGURA 13. Inibição do crescimento micelial (MGI) do fungo *Penicillium expansum* submetido a diferentes concentrações de óleo essencial aplicadas por dois métodos distintos: A) óleo de *Elionurus muticus* aplicado por contato; B) óleo de *Elionurus muticus* aplicado por fumigação; C) óleo de *Cymbopogon citratus* aplicado por contato; D) óleo de *Cymbopogon citratus* aplicado por fumigação; E) Citral aplicado por contato; F) Citral aplicado por fumigação. Perpignan, 2012.

TABELA 14. Concentração letal aguda (CL<sub>50</sub>) do óleo essencial (OE) de *Elionurus muticus*, de *Cymbopogon citratus* e de citral, sobre *Penicillium expansum*. Perpignan, 2012.

Tratamento	Contato (%)	Fumigação (µg/ml)
OE <i>E. muticus</i>	0,012	2,76
OE <i>C. citratus</i>	0,018	2,57
Citral	0,010	1,21

Ao analisar os resultados obtidos para o tratamento de contato, foi possível observar que as concentrações mínimas para inibição total ou parcial do fungo obtidas no presente estudo, são elevadas em relação aos resultados obtidos por outros autores para *B. cinerea* (Hossain *et al.*, 2008; Marandi *et al.*, 2011) e *P. expansum* (Zabka *et al.*, 2009; Marandi *et al.*, 2011; Kadoglidou *et al.*, 2011; Nguefack *et al.*, 2012). Por exemplo, Tripathi *et al.*, (2008) avaliaram o efeito de 26 óleos essenciais, dentre eles, o óleo de *C. citratus*. Os melhores resultados indicaram 100% de mortalidade a uma concentração de 0,05%, sendo que para *C. citratus* a mesma concentração apresentou 95% de mortalidade. A mesma tendência foi observada para tratamento de fumigação (Lee *et al.*, 2007; Siripornvisal *et al.*, 2009; Osório *et al.*, 2013).

A atividade dos óleos essenciais está relacionada com sua composição química, com a configuração estrutural dos seus componentes constituintes e seus grupos funcionais e, possivelmente, com interações sinérgicas e antagonísticas entre seus componentes (Nguefack *et al.*, 2012). Os óleos essenciais abundantes em citral são bem conhecidos por suas propriedades bactericidas e fungicidas (Cacciabua *et al.*, 2005; Sabini *et al.*, 2006; Tzortzakis *et al.*, 2007; Nguefack *et al.*, 2012). Ben-Yehoshua *et al.* (1992) e Rodov *et al.* (1995) observaram uma correlação entre a redução da concentração de citral em cascas de limão e o aumento da susceptibilidade à infecção por *P. digitatum*.

Os resultados obtidos demonstraram que, de maneira geral, o composto puro citral foi mais eficiente como fungicida comparado com os óleos essenciais. Linde *et al.* (2010) também observaram uma atividade fungicida mais elevada do composto puro em comparação com o óleo essencial, cujo componente majoritário era o citral. Isso pode ser explicado pela complexidade de compostos dos óleos essenciais que, mesmo apresentando o citral como composto majoritário, apresentam pequenas quantidade de outros compostos (limoneno, mirceno, geranial, etc.), que podem apresentar uma associação entre os seus efeitos e a presença de citral no óleo essencial.

O citral apresenta melhor atividade em pH alcalino (Onawunmi, 1989). Entre os três tratamentos, o composto puro citral apresentou pH menos ácido, correspondendo a 4,6, seguido pelo óleo essencial de *E. muticus* com pH em torno de 4,3 e por último o óleo essencial de *C. citratus* com pH = 3,8. Sendo assim, é possível que o pH dos tratamentos tenha contribuído para as diferenças observadas, principalmente considerando a avaliação da atividade fungicida por contato.

Ao comparar os testes por contato e por fumigação, foi observado que para os fungos *B. allii* e *P. expansum*, a exposição ao óleo por contato apresentou mais toxicidade em comparação ao tratamento por fumigação. Por outro lado, para o fungo *B. cinerea* houve uma inversão, onde o teste por fumigação apresentou maior toxicidade. A absorção do óleo essencial pelo fungo ocorre de forma mais rápida quando o óleo é aplicado via fumigação, devido a sua volatilização. Quando o óleo é acrescentado no meio de cultura, ele é absorvido de forma mais lenta, acompanhando o crescimento do fungo e a utilização do substrato no meio de cultura. O fungo *B. cinerea* apresenta um

crescimento mais acelerado comparado ao *B. alli* e *P. expansum*, talvez por isso, o tratamento por fumigação tenha sido mais eficiente nesse fungo em relação ao tratamento por contato. Alvarez-Castellanos *et al.* (2001) também observaram uma atividade fumigante mais significativa em espécies de crescimento rápido, entre elas *B. cinerea*.

Poucos estudos têm focado no mecanismo pelo qual os óleos essenciais inibem microrganismos. Diversos autores têm destacado que um dos efeitos da toxicidade inclui danos nas membranas celulares (Burt, 2004; Isman & Machial, 2006). Os óleos essenciais são lipofílicos, assim, passam através da parede celular e da membrana citoplasmática. Isto afeta a estrutura das diferentes camadas de polissacáridos, ácidos graxos e fosfolípidos, determinando alterações de permeabilidade destas membranas (Isman & Machial, 2006). Anomalias morfológicas das hifas do fungo *Trichophyton mentagrophytes* foram observadas após serem expostas ao citral (0,09 mg/ml), apresentando uma alta degeneração celular. A membrana plasmática adquiriu um aspecto ondulado ocasionando a separação da parede celular. Também foi observada a desintegração da mitocôndria. Ao aumentar a concentração de citral (0,2 mg/ml) ainda se observou a degradação da parede celular, o desaparecimento do citoplasma e o rompimento das organelas (Park *et al.*, 2009). No presente trabalho estes aspectos não foram analisados, uma vez que o principal objetivo era explorar o potencial do óleo essencial produzido pela espécie *E. muticus*.

Estudos sugerem que a atividade tóxica do citral pode estar relacionada à sua conformação. Sendo o citral da classe dos aldeídos  $\alpha$ ,  $\beta$  – insaturados, a posição do grupo carbonila e dos carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  gera uma conjugação entre eles, o que torna o carbono  $\beta$  mais polarizado positivamente e por

consequência mais reativo com nucleofílicos (espécie que doa um par de elétrons para um eletrofilo para formar uma ligação química em uma reação) (Wuriatmo, 2011). O efeito tóxico destes aldeídos é baseado na sua capacidade de funcionar como agentes alquiláticos diretos, capazes de ligar-se covalentemente a grupos celulares nucleofílicos, tais como as proteínas sulfidril e grupos aminosdos patógenos; modificando processos celulares e sendo potencialmente tóxicos aos patógenos (Witz, 1989). Sendo assim, a diferença na susceptibilidade dos fungos aos tratamentos pode estar relacionada com o conteúdo de proteína na parede celular do fungo (Wuriatmo, 2011).

#### **4.3.2 Avaliação da atividade citotóxica em *Artemia salina***

Os testes de toxicidade são elaborados com o objetivo de avaliar ou prever os efeitos de substâncias tóxicas nos sistemas biológicos e averiguar a toxicidade relativa das substâncias que são preponderantes na avaliação do ambiente (Olivero-Verbel *et al.*, 2009). Nesse sentido, o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *A. salina* tem sido empregado para verificar a toxidade de diversos extratos de plantas (Ajaiyeob *et al.*, 2006; Ameen *et al.*, 2011; Kpoviessi *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos demonstram que os óleos essenciais de ambas as espécies avaliadas (*E. muticus* e *C. citratus*) e o composto puro citral apresentam uma elevada toxidade para as Artemias (Figura 14). No entanto, o óleo essencial de *E. muticus* e o citral apresentaram uma toxicidade mais elevada em comparação ao óleo essencial de *C. citratus*.

A concentração letal (CL<sub>50</sub>) demonstrou também a maior toxidez de *E. muticus* e citral em relação ao *C. citratus* (Tabela 15). Os óleos essenciais

utilizados apresentam como composto majoritário o citral. Sendo assim, os resultados sugerem que o efeito tóxico foi devido, principalmente, ao alto teor de citral encontrado no óleo. O óleo essencial de *E. muticus* apresentou um teor de cerca de 80% de citral em uma concentração de 2,62 mg/ml, enquanto o óleo essencial de *C. citratus* apresentou um teor de cerca de 75% com uma concentração de 2,41 mg/ml.

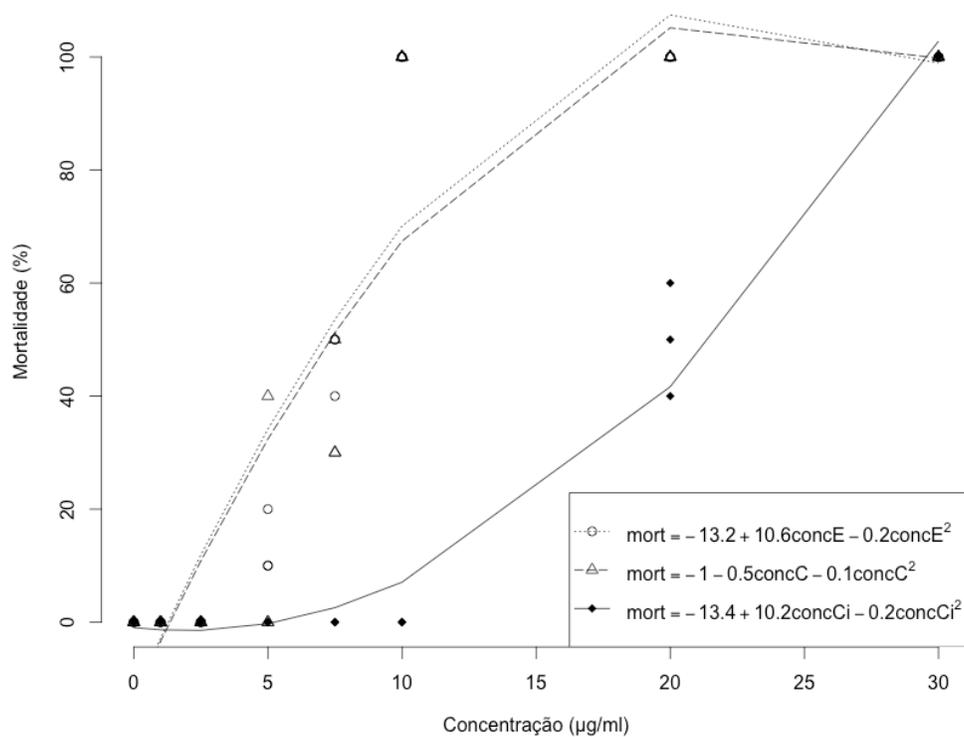


FIGURA 14. Mortalidade de *Artemia salina* submetida a diferentes concentrações do óleo essencial de *Elionurus muticus* (○), *Cymbopogon citratus* (△) e citral (●). Perpignan, 2012.

A quantidade de citral mais elevada em *E. muticus* pode explicar a sua atividade superior em relação ao *C. citratus*. Os coeficientes de regressão foram significativos para os três tratamentos. Diversos trabalhos têm demonstrado a atividade tóxica do citral em vários organismos e células (Hierro *et al.*, 2006; Sabini *et al.*, 2006; Koffi *et al.*, 2009; Mesa-Arango *et al.*, 2009; Olivero-Verbel, 2009; Oliveira & Berbet 2011), entretanto, seu modo de ação é pouco conhecido.

TABELA 15. Concentração letal aguda (CL<sub>50</sub>) do óleo essencial (OE) de *Elionurus muticus*, de *Cymbopogon citratus* e de citral, em *Artemia salina*. Perpignan, 2012.

Tratamento	CL <sub>50</sub> (µg/ml)
OE <i>E. muticus</i>	7,8
OE <i>C. citratus</i>	20,0
Citral	7,8

O teste de letalidade de *A. salina* pode classificar os compostos testados em duas categorias (Carballo *et al.*, 2002): aqueles em que a CL<sub>50</sub> é inferior a 40 ppm (40 µg/ml) podem ser considerados como de atividade antitumoral e aqueles com CL<sub>50</sub> menor do que 1ppm (1 µg/ml) como de atividade inseticida. Os resultados obtidos evidenciaram a atividade citotóxica dos óleos essenciais de *E. muticus* e *C. citratus*, especialmente o óleo de *E. muticus*, que demonstrou uma toxidez mais elevada. Os testes de letalidade de *A. salina* são preliminares. No entanto, considerando as observações de Carballo *et al.* (2002), os óleos essenciais avaliados, bem como o citral, apresentaram uma possível atividade antitumoral.

### 4.3.3 Avaliação da atividade fitotóxica em cebola e alface

Metabólitos secundários de plantas são liberados no solo como exsudatos de tecidos de plantas ou através da decomposição de resíduos vegetais (Rizvi & Rizvi, 1992). Algumas dessas substâncias, como os óleos essenciais, interferem na germinação e crescimento de plantas, podendo apresentar ação inibitória ou ainda estimuladora e, sendo assim, desempenhando importante papel nas interações químicas entre plantas (Dayan *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2006). O potencial fitotóxico dos compostos é, frequentemente, verificado através da sua influência na germinação e viabilidade de sementes (Gniazdowska & Bogatek, 2005). O presente trabalho avaliou a atividade do óleo essencial de *E. muticus* e do composto puro citral na germinação e no crescimento de diásporos de alface (*Lactuca sativa*) e cebola (*Allium cepa*), as quais foram escolhidas por serem plantas modelo em estudos de atividade fitotóxica (Souza Filho *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos permitiram observar que os dois tratamentos (óleo essencial e citral) demonstraram efeito inibidor da germinação da alface e da cebola, não havendo diferença entre os tratamentos (Figura 15). A dose de 2 µl, tanto de óleo essencial, quanto de citral, inibiu totalmente a germinação da dos diásporos de alface e cebola. A velocidade de germinação foi menor para cebola em comparação à alface, que apresentou quase o dobro de velocidade. De maneira geral, sintomas como clorose e pontos de necrose foram observados nas radículas submetidas às doses mais elevadas. Os mesmos sintomas foram descritos por Singh *et al.* (2006) em diversas espécies tratadas com citronelal.

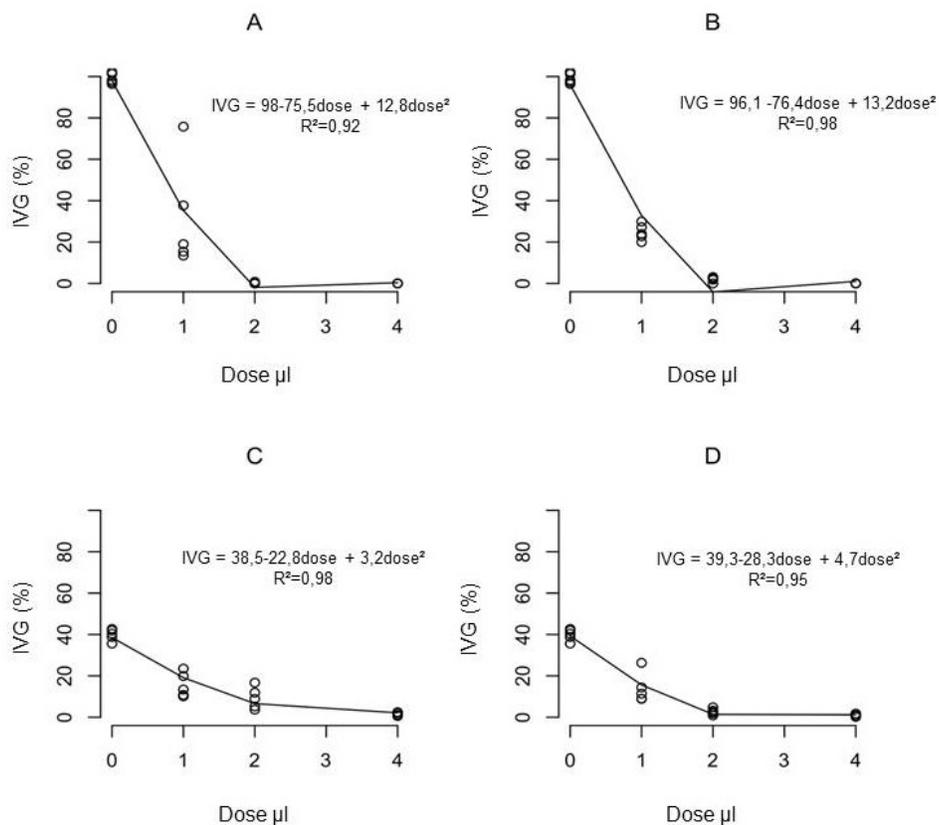


FIGURA 15. Índice de velocidade de germinação (IVG) de diáporos de alface submetidas ao óleo essencial de *Elionurus muticus* (A) e citral (B) e de diáporos de cebola submetidas ao óleo essencial de *Elionurus muticus* (C) e citral (D). Porto Alegre, 2013.

O efeito dos tratamentos no crescimento foi avaliado através da medição do comprimento das radículas e do peso das plântulas. A elongação de radículas de alface foi afetada pelos tratamentos mais drasticamente que as da cebola. Mais uma vez, a dose de 2 µl foi mais tóxica para a alface. No entanto, o comprimento de raiz da cebola não diferiu significativamente entre os tratamentos (Figura 16). Em relação ao peso da plântula, foi observado que, de maneira geral, os tratamentos reduziram o peso em relação ao controle para as duas espécies (Figura 17).

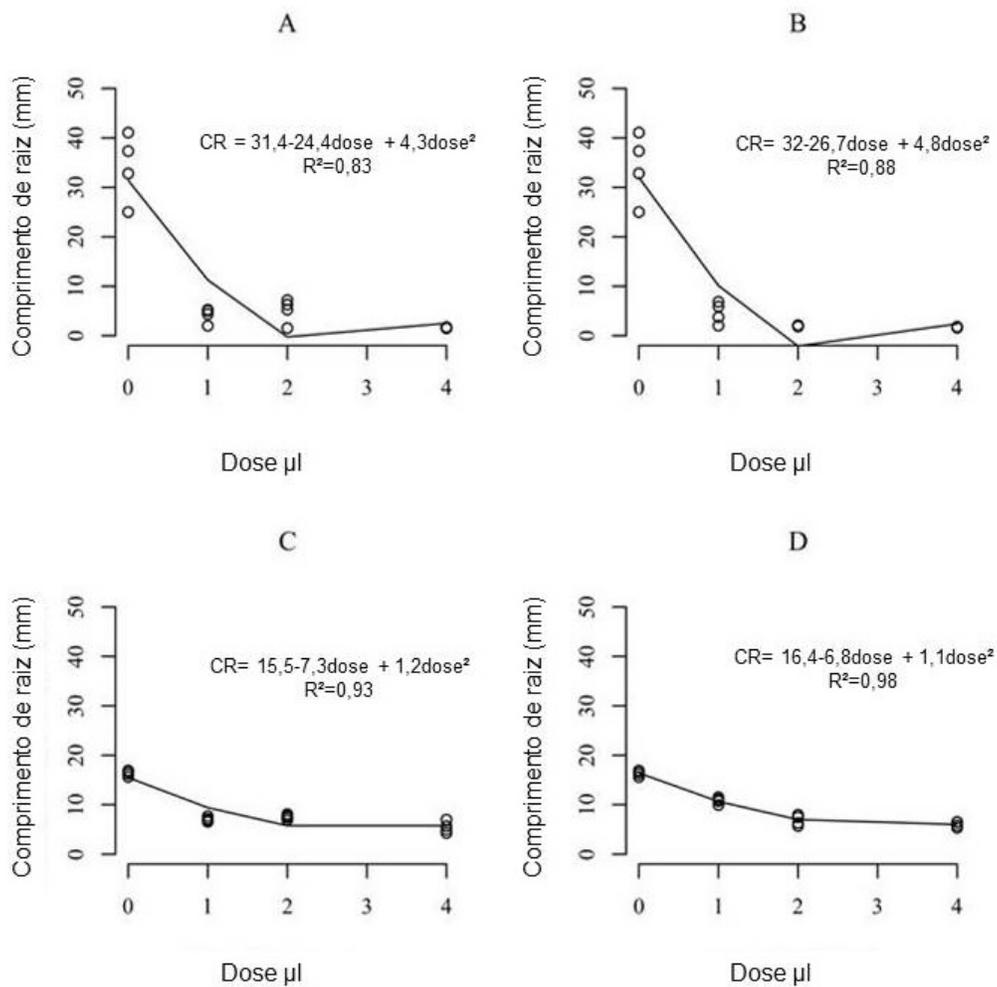


FIGURA 16. Comprimento de raiz (mm) de diásporos de alface submetidos ao óleo essencial de *Elionurus muticus* (A) ou citral (B) e de diásporos de cebola submetidos ao óleo essencial de *Elionurus muticus* (C) ou citral (D). Porto Alegre, 2013.

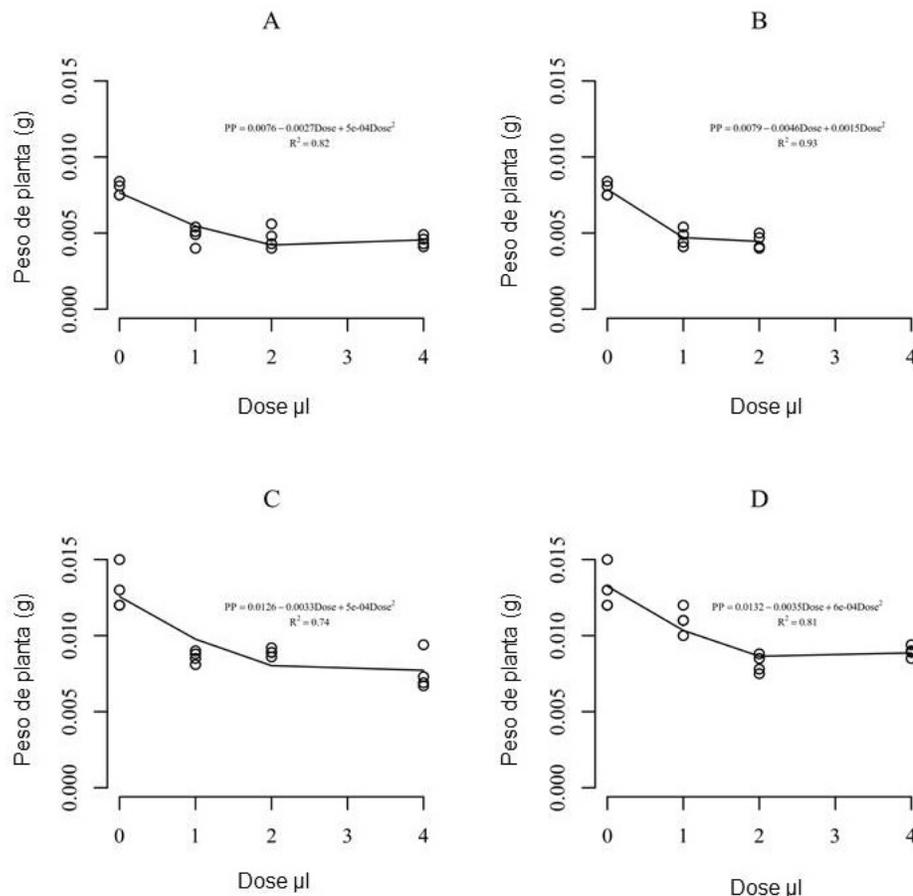


FIGURA 17. Peso de planta (g) de diásporos de alface submetidos ao óleo essencial de *Elionurus muticus* (A) ou citral (B) e de diásporos de cebola submetidos ao óleo essencial de *Elionurus muticus* (C) ou citral (D). Porto Alegre, 2013.

O efeito observado dos tratamentos sobre a germinação e crescimento das plantas estudadas é a manifestação secundária de efeitos primários que ocorrem em nível celular e molecular (Ferreira & Aquila, 2000). Acredita-se que o efeito tóxico de óleos essenciais em plantas envolve alterações no metabolismo celular (Gniazdowska & Bogatek, 2005). O óleo essencial de *E. muticus* é rico em monoterpenos, cerca de 90%. Estudos demonstraram que, de maneira geral, monoterpenos inibiam a atividade mitótica (Romagni *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2006; Schmidt-Silva *et al.*, 2011). Chaimovitsh *et al.*, (2012)

relataram que o citral poderia causar distúrbios nos microtúbulos mitóticos, inibindo o ciclo celular e aumentando a frequência de células anormais em raízes de trigo.

#### **4.4 Atividade de captura de radicais livres**

A exposição das plantas aos diversos fatores ambientais acarreta na produção de moléculas quimicamente ativas e radicais livres, que, por sua vez, podem gerar danos celulares (Hassan *et al.*, 2009). As plantas apresentam um excelente sistema antioxidante que inclui tanto moléculas de baixo peso molecular, quanto enzimas que reduzem as formas oxidadas, prevenindo a acumulação dessas moléculas quimicamente ativas (Asada *et al.*, 1999). Sendo assim, no presente trabalho foi analisada a capacidade de captura de radicais livres do extrato metanólico de sete populações naturais de *E. muticus*, utilizando o Difenilpicrilhidrazil (DPPH) como radical livre. Esta análise visou reproduzir reações que ocorrem em um sistema oxidante natural, tais como a auto-oxidação de lipídios ou outras substâncias insaturadas (Molyneux, 2003).

Os resultados observados demonstraram variabilidade de resposta para os diferentes extratos metanólicos extraídos (Tabela 16). O percentual de inibição do DPPH variou de 11,5 a 40,4%, sendo que a população Águas Claras apresentou maior atividade de captura do radical DPPH em comparação às demais populações. Muchuweti *et al.* (2006), utilizando DPPH como radical livre, relataram uma inibição de cerca de 50% do radical pelo extrato metanólico de *E. muticus*. A inibição em torno de 50% é considerada moderada neste trabalho, quando comparada a outras espécies avaliadas que apresentaram até 99% de inibição. Bonani *et al.* (2006), comparando a

atividade antioxidante de diversas espécies, também consideraram moderada a atividade de *E. muticus*.

TABELA 16. Média e desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição e concentração efetiva mínima para inibir 50% (CE<sub>50</sub>) do radical livre DPPH por diferentes populações naturais de *Elionurus muticus*. Porto Alegre, 2013.

Populações	% Inibição		CE <sub>50</sub> (mg/ml)	
	Média*	DP	Média	DP
Águas Claras	40,4 a	11,46	1,1 a	0,48
Fontoura Xavier	11,5 b	0,97	2,0 b	0,27
Morro Santana	10,0 b	1,87	1,8 ab	0,11
Morro São Pedro	11,5 b	0,00	2,2 b	0,12
São Borja	13,7 b	5,56	1,8 ab	0,31
São Francisco de Paula	9,7 b	1,11	2,0 b	0,20
Uruguaiana	8,5 b	3,76	2,0 b	0,32

\*Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Os resultados para a concentração efetiva mínima para inibir 50% do radical (CE<sub>50</sub>) mostraram que a população Águas Claras ainda se destaca, porém não diferindo estatisticamente das populações Morro Santana e São Borja. As concentrações efetivas das populações de *E. muticus* são relativamente baixas em comparação às obtidas por outros autores (Ara & Nur, 2009; Hasan *et al.*, 2009; Padmanabhan & Jangle, 2012), indicando mais uma vez, uma atividade moderada de captura do radical DPPH.

A análise da atividade de captura do radical DPPH utilizada neste trabalho foi realizada a partir de extratos metanólicos das plantas, sem que houvesse isolamento de nenhum composto. Sendo assim, a capacidade de captura avaliada está baseada na ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes no extrato, ocasionando uma análise de parâmetros integrados.

Os testes de atividade de captura *in vitro* são rápidos e podem ser considerados confiáveis na detecção de mudanças no estresse oxidativo *in*

*vitro*. Contudo, a similaridade com modelos biológicos é limitada (Guiselli *et al.*, 2000). No entanto, sendo o isolamento químico de compostos ativos puros um processo muito demorado e trabalhoso, esses métodos são uma ferramenta importante para realização de *screenings*, eliminando processos de isolamento desnecessários. Apesar da atividade ter sido considerada moderada para as populações de *E. muticus*, alguns autores que obtiveram valores inferiores aos obtidos consideram ainda assim como uma atividade promissora (Peteros & Uy, 2010).

## 5 CONCLUSÕES

As populações de *Elionurus muticus* estudadas apresentaram variabilidade genética para os caracteres avaliados, especialmente para os caracteres associados ao óleo essencial. A distribuição da variabilidade genética estimada foi predominantemente intrapopulacional. Os resultados indicaram a possibilidade de seleção de plantas com caracteres relevantes, como alto rendimento de óleo essencial e de citral. Além disso, a acentuada variabilidade genética dentro das populações sugere a ocorrência preferencial de alogamia nas populações naturais.

Através de análises citogenéticas foi possível determinar o número cromossômico ( $2n=20$ ) e observar a regularidade da meiose e da formação de grãos de pólen na espécie. O cariótipo foi determinado pela primeira vez para a espécie e permitiu verificar a presença de um cromossomo satélite.

As avaliações de atividade biológica indicaram a possível aplicação do óleo essencial de *E. muticus* no controle de fungos fitopatogênicos e no controle da germinação e desenvolvimento de outras plantas. Além disso, as avaliações revelaram uma citotoxicidade do óleo. O extrato metanólico de *E. muticus* pode ser utilizado na captura de radicais livres. A maioria das investigações sobre atividade biológica tem caracterizado o fenômeno, mas

não consideram as aplicações práticas. O conjunto de propriedades atribuídas ao óleo essencial e ao extrato metanólico no presente trabalho indicam diferentes aplicações de *E. muticus* na agricultura e na medicina. Atualmente a demanda por citral tem sido suprida pelo óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. No entanto, os valores de rendimento de óleo essencial para ambas as espécies são similares. Além disto, *E. muticus* é uma espécie nativa do sul do Brasil, abundante no bioma Pampa, por isso, está bem adaptado e os custos de produção são mais reduzidos em comparação ao *C. citratus*, que é uma planta introduzida. Sendo assim, a exploração de *E. muticus* como fonte natural de citral é uma alternativa viável. O estudo mais aprofundado de populações e o melhoramento genético nessa espécie poderiam contribuir para uma melhor exploração desse recurso.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W. S. et al. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Laham, v.18, p. 265-267, 1925.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 3.ed. Londres: Allured Publ. Corp., 1995. 469p.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5.ed. California: Academic Press, 2005. 948p.

AHARONI, A. et al. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. **Trends in Plant Science**, Riverport Lane, v.10, n.12, p.594-602, 2005.

AJAIYEGBA, E. O. et al. In vitro cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. **Phytochemistry**, Jena, v.13, p.295-298, 2006.

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. New York: J. Wiley, 1960. 381p.

ALLEM, A. C. The terms genetic resource, biological resource, and biodiversity examined. **Environmentalist**, Hampshire, v.20, p.335-341, 2000.

ALVAREZ-CASTELLANOS, P. P. et al. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Phytochemistry**, Nova York, v.57, p.99-102, 2001.

ALVES, L.I.F. et al. Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, v. 34, n. 2, p. 259-267, 2011.

AMEEN, M. O. et al. Bioactivity of rhizome essential oils from two varieties of *Cyperus articulatus* (L.) grown in Nigeria, using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality tests. **Journal of Medicinal Plants Research**, Muenster, v. 5, n.6, p. 1031-1033, 2011.

ANWAR, F. et al. Changes in composition and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruit at different

stages of maturity. **Journal of Herbs, Spices and Medicinals Plants**, Birmingham, v.15, p.1-16, 2009.

AQUINO-NETO, F. R.; NUNES, D. da S. e S. **Cromatografia** - Princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187p.

ARA, N. & NUR, H. *In vitro* antioxidant activity of methanolic leaves and flowers extracts of *Lippia alba*. **Research Journal of Medicine and Medical Sciences**, Kano, v. 4, n.1, p.107-110, 2009.

ARAÚJO, A. A. de. **Principais gramíneas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Sulina, 1971. 255p.

ARENAS, P. Medicine and magic among the Maka indians of the Paraguayan Chaco. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 21, p.279-295, 1987.

ASADA, K. The water in cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 50, p. 601-639, 1999.

AZIZI, A. et al. Correlations between genetic, morphological and chemical diversities in a germoplasm collection of the medicinal plant *Origanum vulgare* L. **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v. 9, p. 2784-2800, 2012.

BABUSHOK, V. I. et al. Retention indices for most frequently reported essential oil compounds in GC. **Chromatographia**, Nova York, v. 69, p. 257-269, 2009.

BAKKALI F. et al. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n.2, p. 446-475, 2008.

BALTISBERGER, M. & WIDMER, A. Chromosome numbers and karyotypes within the *Ranunculus alpestris* - group (Ranunculaceae). **Organisms, Diversity & Evolution**, Jena, v. 9, p. 232-243, 2009.

BASKAUF, C. J. & BURKE, J. M. Population Genetics of *Astragalus bibullatus* (Fabaceae) Using AFLPs. **Journal of Heredity**, Washington, v.100, n.4, p.424-431, 2009.

BEN-YEHOSHUA, S. et al. Preformed and induced antifungal materials of citrus fruit in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, p. 1217-1221, 1992.

BENNETT, M.D. Plant genome values: How much do we know? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 2011-2016, 1998.

BHANDARI, R. et al. New constituents of *Bothriochloa bladhii*. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 5, p. 325-327, 1993.

BHUIYAN, N. I. et al. Essential oil in roots of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex small from Bangladesh. **Bangladesh Journal of Botany**, Dhaka, v. 37, n2 , p. 213-215, 2008.

BIZZO, H. R. et al. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOLDRINI, I. I & BOSSLE, W. P. Composição botânica dos campos naturais da Estação Experimental Zootécnica de Tupanciretã da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul: relação ilustrada de gramíneas (parte II). **Anuário Técnico do Instituto de Pesquisas Zootécnicas "Francisco Osório"**, Porto Alegre, v.5, t. 2, dez. 1978.

BOHLMANN, J. et al. Terpenoid biomaterials. **The Plant Journal**, Malden, v. 54, p.656-669, 2008.

BORGHETTI, F. & FERREIRA, A. G. Interpretação de resultados de germinação. In: Ferreira, A. G. & BORGHETTI, F. (org.) **Germinação – do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 209-222.

BOTTESELLE, G di V. et al. Influência da adubação nitrogenada na composição química e no rendimento do óleo essencial de *Elyonurus viridulus*. In: **Anais da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia, 2006.

BRAMMER, S.P. et al. **Citogenética Vegetal: da era clássica à molecular**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 9p. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 85). Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do85\\_.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85_.htm). Acesso em 20/03/11.

BROWN, W. V. Chromosome numbers of some Texas grasses. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York. v. 78, n.04, p. 292-299, 1951.

BOLAT, Ý. et al. An investigation on pollen viability, germination and tube rowth in some stone fruits. **Turkish Journal of Agriculture Forestry**, Ankara, v.23, p.383-388, 1999.

BONANI, V. F. L. et al. Prospecção de agentes antioxidantes de vegetais de Mato Grosso do Sul. In: **Anais da 58ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Científica**. Florianópolis, 2006.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p.223-253, 2004.

CACCIABUE, M. et al. *Elionurus muticus* from north of Argentina: evaluation of the antibacterial activity of three essential oil chemotypes. **Biocell**, Mendoza, v. 29, n. 2, p.223, 2005.

CARBALLO J.L. et al. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, Londres, v.2, n.17, p. 1-5, 2002.

CARLIER, L. et al. Importance and functions of grasslands. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, Bourke, v. 37, n. 1, p. 25-30, 2009.

CARSON, C.F. et al. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.46, n.6, p. 1914–1920, 2002.

CARVALHO, C.R. et al. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Science**, Limerick, v. 174, p. 613–617, 2008.

CASTRO, L. O. de; RAMOS, R. L. D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais:** *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., capim-cidrô, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack. , capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver. Porto Alegre: FEPAGRO, 2003. 31p. (Boletim FEPAGRO, 11).

CAVALLI, S. S. Polimorfismos moleculares. In: Genética e evolução vegetal. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2003. p. 311-332.

CAVALLI, S. S. & WINGE, H. Variabilidade genética em populações naturais. In: Genética e evolução vegetal. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2003. p.165-175.

CELARIER, R. P. *Elyonurus argenteus*, a south african grass with five chromosome pairs. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 8, n.3, p. 157-162, 1957.

CHAGAS, F. F. et al. Avaliação sazonal do potencial fitotóxico do extrato etanólico bruto de *Elyonurus muticus* (Spreng.) Kuntze. In: **Anais da 58ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Científica**. Águas de Lindóia, 2006.

CHAGONDA, L. S. et al. The essential oils of wild and cultivated *Cymbopogon validus* (Stapf) Stapf ex Burt Davy and *Elyonurus muticus* (Spreng.) Kunth from Zimbabwe. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 15, p.100-104, 2000.

CHAIMOVITSH, D. et al. The relative effect of citral on mitotic microtubules in wheat roots and BY2 cells. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 14, p. 354–364, 2012.

CHENG, A. X. et al. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, Pequim, v. 49, n. 2, p. 179-186, 2007.

COLPO, Fernando. **Potencial inseticida de óleos de origem vegetal sobre *Gropholita molesta***. Porto Alegre: UFRGS, 2010. 24f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Porto Alegre, 2010.

CONTERATO, I. F. et al. Seed dimorphism, chromosome number and karyotype of the amphicarpic species *Trifolium argentinense* Spreng. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.57, p.727–731, 2010.

CRAVEIRO, A. A. **Óleos de plantas do nordeste**. 1.ed. Fortaleza: Edições UFC, 1981. 210p.

CRESTE, S. et al. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 19, p. 299-306, 2001.

CZEPAK, M. P. **Produção de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e *Elionurus latiflorus* Nees em diferentes arranjos espaciais**. Botucatu: UNESP, 2006. 97f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2000.

DAVIES, P. Domesticación. In: Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales e aromáticas nativas, Uruguay: Instituto Nacional de Investigación Agropecuária, 2004. p 15-18.

DAYAN F.E. et al. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, Nova York, v. 26, p. 2079-2094, 2000.

DOMYATI, F. M. et al. Molecular markers associated with genetic diversity of some medicinal plants in Sinai. **Journal of Medicinal Plants Research**, Muenster, v. 5, n. 2, p. 200-210, 2011.

DUBEY, N. K. et al. Current status of botanicals in storage pest management. **Journal of Biopesticides**, Palayamkottai, v. 1, n.2, p.182 – 186, 2008.

DUDAI, N. et al. Simple colorimetric measurement of citral in lemon scented essential oils using Schiff's reagent. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 629, p. 499- 504, 2004.

DZINGIRAI, B. et al. Phenolic content and phospholipids peroxidation inhibition by methanolic extracts of two medicinal plants: *Elionurus muticus* and *Hypoxis hemerocallidea*. **African Journal of Biochemistry Research**, Nairobi, v. 1, n. 7, p. 137-141, 2007.

ECHEVERRIGARAY, S. & AGOSTINI, G. Genetic relationship between commercial cultivars and brazilian acessions of *Salvia officinalis* L. based on RAPD markers. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, p. 13-17, 2006.

EINHELUG, E A. & J. A. RASMUSSEN. Prior cropping with grain sorghum inhibits weeds. **Journal of Chemical Ecology**, Nova York, v. 15, p. 951-960, 1993.

FACHINETTO, J. M. et al. Variability of the chromosomal number and meiotic behavior in populations of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) from southern Brazil. **Caryologia**, Firenze, v.61, n. 2, p. 164-169, 2008.

FATOPE, M. O. Phytocompounds: their bioassay and diversity. **Discovery and Innovation**, Quênia, v. 7, n.3, p. 229–236, 2005.

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

FIELD, C. R. Palatability factors and nutritive values of the food of buffaloes (*Syncerus caffer*) in Uganda. **African Journal of Ecology**, Oxford, v. 14, p. 181-201, 1976.

FIGUEIRAS, T. S. Gramineae (Poaceae). In: FLORA dos Estados de Goiás e Tocantins. 1. ed. Goiânia: Ed. da UFG, 1995. p. 48-49.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 333p.

FÜLLER, T. N. et al. Phenotypical, phytochemical and molecular characterization of capim-carona [*Elionurus muticus* (Spreng.) Kuntze] populations. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Viçosa, v. 12, p. 261-268, 2010.

GBENOU, J. D. et al. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 40, n. 2, p. 1127-1134, 2012.

GHISELLI, A. et al. Total antioxidant capacity as a tool to access redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology & Medicine**, Nova York, v.9, n.11, p. 1106-1114, 2000.

GOEDERT, C.O. Histórico e avanços em recursos genéticos no Brasil. In: NASS, L.L. (Ed.). Recursos genéticos vegetais. Brasília: Embrapa, 2007. p. 23-60.

GOMES, F. **Estudo dos compostos voláteis do alecrim utilizando as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), hidrodestilação e extração com fluido supercrítico**. 2003. 69f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GOULD, F. W. & SODERSTROM, T. R. Chromosome numbers of tropical American grasses. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 54, n. 6, p. 676-683, 1967.

GRAÑA, E. et al. Citral induces auxin and ethylene-mediated malformations and arrests cell division in *Arabidopsis thaliana* roots. **Journal of Chemical Ecology**, Nova York, v. 39, n. 2, p. 271-282, 2013.

GUENTHER, E. The production of essential oils: methods for distillation on, effleurage, maceration and extraction with volatile solvents, In: GUENTHER, E. The essential oils. 2 ed. New York: Robert E. Krieger, 1972. 218p.

GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 142p.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**. 1ed. Ribeirão Preto: Ed. Funpec, 2002. 131p.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 52-60, 2005.

GNIAZDOWSKA A. & BOGATEK R. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. **Acta Physiologia Plantarum**, Bratislava, v, 27, n. 3B, p. 395-407, 2005.

HASAN, S.M.R. et al. DPPH free radical scavenging activity of some Bangladeshi medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, Muenste, v. 3, n. 11, p. 875-879, 2009.

HELDT, H. W. **Plant biochemistry & molecular biology**. Oxford: Oxford University Press. 521p., 1997.

HESS, S. C. et al. Evaluation of seasonal changes in chemical composition and antibacterial activity of *Elyonurus muticus* (Sprengel) O. Kuntze (Gramineae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 370-373, 2007.

HEYDORN, S. et al. Citral, a fragrance allergen and irritant. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 49, p. 32-36, 2003.

HIERRO, I. et al. In vivo larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* S.L. **Phytomedicine**, Jena, v. 13, p. 527–531, 2006.

HILU, K. W. Phylogenetics and chromosomal evolution in Poaceae (grasses). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 52,p. 13-22, 2004.

HIRAI, N. Application of allelochemicals to agriculture. **Biological Science in Space**, Nogoya, v. 17, n. 1, p. 4-5, 2003.

HOSSAIN, M. A. et al. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. **Industrial crops and products**, Phoenix, v. 27, p.328–334, 2008.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, Londres, v. 108, p.986-995, 2008.

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

ISMAN, M. B. & MACHIAL, C. M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. In: *Advances in Phytomedicine*: Rai M., Carpinella M.C, Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006. p. 29-44.

ISSOLAH, R. et al. Karyotype variation within some natural populations of sulla (*Hedysarum coronarium* L., Fabaceae) in Algeria. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 53, p. 1653-1664, 2006.

JUMP, A.S. et al. Wide variation in spatial genetic structure between natural populations of the European beech (*Fagus sylvatica*) and its implications for SGS comparability. **Heredity**, Londres, v. 108, p. 633–639, 2012.

KABERA, J. Insecticidal effects of essential oils of *Pelargonium graveolens* and *Cymbopogon citratus* on *Sitophilus zeamais* (Motsch.). **African Journal of Food Science**, Nairobi, v. 5, n. 6, p. 366 – 375, 2011.

KADOGLIDOU, K. et al. Inhibitory and stimulatory effects of essential oils and individual monoterpenoids on growth and sporulation of four soil-borne fungal isolates of *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, and *Verticillium dahliae*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 130, p. 297–309, 2011.

KAŁUŻNA – CZAPLIŃSKA. J. GC–MS analysis of biologically active compounds in cosmopolitan grasses. **Acta Chromatographica**, Katowice, v.19, p.279-282, 2007.

KAUL, K. V. & VATS, S. K. Essential oil composition of *Bothriochloa pertusa* and phyletic relationship in aromatic grasses. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 26,p. 347-356, 1998.

KETOH G. et al. Inhibition of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) development with essential oil extracted from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. (Poaceae), and the wasp *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Stored Product Research**, Manhattan,v.41, p.363–371, 2005.

KHANUJA, S. P. S. et al. Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon* Spreng. (Poaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford,v. 33, p. 171-189, 2005.

KIM, J. et al. Fumigant antifungal activity of plant essential oils and components from West Indian bay (*Pimenta racemosa*) and thyme (*Thymus vulgaris*) oils against two phytopathogenic fungi. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 23, p.272–277, 2008.

KIRICI, S. et al. Study of Essential oil and agricultural properties of vetiver (*Vetiveria Zizanioides*) in the Southeastern of Mediterranean. **Advances in Environmental Biology**, Jordan, v. 5, n. 2, p.447-451, 2011.

KLAMT, A. & SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Karyotype morphology and evolution in some *Lathyrus* (Fabaceae) species of southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 2, p. 463-467, 2000.

KOFFI, K. et al. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, Dhaka, v. 4, p. 29-34, 2009.

KOLB, A. & DURKA, W. Reduced genetic variation mainly affects early rather than late life-cycle stages. **Biological Conservation**, Essex, v. 159, p. 367–374, 2013.

KOLB, N. et al. **Estúdio de las condiciones para la producción de aceite esencial de “espartillo”**. Universidad Nacional de Misiones, 2006. Disponível em:

[http://www.unam.edu.ar/index.php?option=com\\_content&task=view&id=241&Itemid=123](http://www.unam.edu.ar/index.php?option=com_content&task=view&id=241&Itemid=123)>. Acesso em: 05 de abr. 2011.

KOLB, N. et al. **Evaluación de la aptitud del espartillo para su explotación comercial**. Universidad Nacional de Misiones, 2007. Disponível em: <[http://www.unam.edu.ar/index.php?option=com\\_content&task=view&id=243&Itemid=123](http://www.unam.edu.ar/index.php?option=com_content&task=view&id=243&Itemid=123)>. Acesso em: 05 de abr. 2011.

KOSHIMA, F. A. T. et al. Produção de biomassa, rendimento de óleo essencial e de citral em capim-limão, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, com cobertura morta nas estações do ano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n. 4, p. 112-116, 2006.

KPOVIESSI, B. G. H. K. et al. Chemical variation of essential oil constituents of *Ocimum gratissimum* L. from Benin, and impact on antimicrobial properties and toxicity against *Artemia salina* Leach. **Chemistry & Biodiversity**, Zurique, v. 9, p. 139-150, 2012.

KUMAR, J. et al. Genetic diversity analysis in *Cymbopogon* species using DNA markers. **Plant Omics Journal**, Queensland, v. 2, n. 1, p. 20-29, 2009.

LABINAS, A. M. et al. Effect of Java grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). **Maringá**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1401-1405, 2002.

LEE, S.O. et al. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. **The Plant Pathology Journal**, Seul, v. 23, n. 2, p. 97-102, 2007.

LEMAIRE, G. Ecophysiology of grasslands: Dynamic aspects of forage plant populations in grazed swards. In: GOMIDE, J.A., MATTOS, W.R.S., Da SILVA, S.C. (Eds.) International Grassland Congress, 19, São Pedro, 2001. **Proceedings...** São Pedro:FEALQ, 2001. p.29-37.

LEMAIRE, G. & AGNUSDEI, M. Leaf tissue turn-over and efficiency of herbage utilization. In: LEMAIER, G., HODGSON, J., MORAES, A., et al. (Eds.)

Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology. CAB International, 200. p.265-288.

LEWU, F. B. et al. Morphological diversity among accessions of *Pelargonium sidoides* DC. in the Eastern Cape, South Africa. **Genetic Resource and Crop Evolution**. Dordrecht, v. 54, p.1–6, 2007.

LI, Q. et al. Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 58, p. 157–165, 2010.

LI, J. et al. Potential allelopathic effects of volatile oils from *Descurainia sophia* (L.) Webb ex Prantl on wheat. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 39, n.1, p. 56–63, 2011.

LIÉBANA, C. et al. Morphological and cytogenetic characterization in native populations of *Hedeoma multiflorum* Benth. **Molecular Medicinal Chemistry**, Indiana, v. 21, p. 38-40, 2010.

LIEN A. P. et al. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, Monterey Park, v.4, n. 2, p. 89-96, 2008.

LIMA-BRITO, J., et al. Genetic variability in *Sambucus nigra* L. clones: a preliminary molecular approach. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 90, p. 47-52, 2011.

LINDE, J.H. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lippia rehmannii* from South Africa. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 76, p. 37–42, 2010.

LONGHI-WAGNER, H. M. et al. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo (Poaceae)**. São Paulo: Hucitec, 2001. p.88.

LOPES M. G. et al. Chromosome contribution to Andean polyploid species of *Senecio* (Asteraceae), from Argentina. **Caryologia**, Firenze, v. 55, p. 27-35, 2002.

LOVE, R.M. La citología como ayuda práctica al mejoramiento de los cereales. **Revista Argentina Agronômica**, Buenos Aires, v.1, n.16, p.1-13, 1949.

LOVETT, J. V. & RYUNTYU, M. Allelopathy: broadening the context. In: RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. (Ed.) **Allelopathy: basic and applied aspects**. London: Chapman & Hall, 1992. p. 11-19.

LUNARDI, M. P. M. et al. Chromosome number variability in the South American medicinal plant *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss (Celastraceae). **Cytologia**, Tóquio, v. 69, p. 439-445, 2004.

LYNCH, M. & MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, Columbia, v.3, p.91-99, 1994.

McLAUGHLIN J.L., et al. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, Horsham, v. 32 p.513-524, 1998.

MAHMOOD, U. et al. Volatile constituents of *Capillipedium parviflorum*. **Phytochemistry**, Nova York, v. 65, p. 2163-2166, 2004.

MARTIN, J.T. & B.E. JUNIPER. **The cuticles of plants**. 1.ed. Londres: Edward Arnold, 1970. 347p.

MAO, L. et al. Germination of various weed species in response to *Vetiver* oil and nookatone. **Weed Technology**, Chapaig, v. 18, p. 263-267, 2004.

MAO, P.S. et al. Cytological evaluation and karyotype analysis in plant germplasms of *Elytrigia* Desv. **Agricultural Sciences in China**, Beijin, v. 9, n.11, p. 1553-1560, 2010.

MARANDI, R. J. et al. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear with *Thymus kotschyanus*, *Ocimum basilicum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, Muenster, v. 5, n. 4, p. 626-634, 2011.

MARINOVA, G. & BATCHAROV, V. Evaluation of the methods for derermination os the free radical scavenging activity by DPPH. **Bulgarian Journal of Agricultural Academy**, Sofia, v. 17, n. 1, p. 11-24, 2011.

MASI, L. et al. Assessment of agronomic, chemical and genetic variaility in common basil (*Ocimum basilisum* L.). **European Food Research and Technology**, Berlim, v. 223, p. 273-281, 2006.

MESA-ARANGO, A. C. et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n.6, p. 878-884, 2009.

MEVY, J. P. et al. Composition and some biological activities of the essential oils from an African pasture grass: *Elionurus elegans* Kunth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbia, v. 50, n. 15, p. 4240-4243, 2002.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). 1998. Primeiro relatórionacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica. Ministério do Meio Ambiente (MMA), Brasília.

MOHR, F. V. & PORTO, M. L. Morro Santana: o verde luxuriante nas encostas íngremes. In: MENEGAT, R.; PORTO, M. L.; CARRARO, C. C.; FERNANDES, L. A. D. (Coords.). **Atlas Ambiental de Porto Alegre**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998. 228p.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**, Songkla, v 26, n.2, p. 211-219, 2004.

MONTANHER A. B. P. et al. An application of the brine shrimp bioassay for general screening of Brazilian medicinal plants. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 21, p. 175-178, 2002.

MORLIN, D., et al. Genetic diversity in the germplasm of tropical maize landraces determined using molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.12, n.1, p.99-114, 2013.

MUCHUGI, A. et al. Genetic structuring of important medicinal species of genus *Warburgia* as revealed by AFLP analysis. **Tree Genetics & Genomes**, California, v. 4, n. 4, p. 787-795, 2008.

MUCHUWETI, M. et al. Phenolic content and phospholipids peroxidation inhibition by methanolic extracts of two medicinal plants: *Elionurus muticus* and *Hypoxis hemerocallidea*. **African Journal of Biochemistry Research**, Durban, v. 1, n. 7, p. 137-141, 2007.

NASS, L. L. & PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, n.3, p.581-587, 2000.

NEITZKE, R. S. et al. Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.28, p.47-53, 2010.

NELSON, C.J. Shoot morphological plasticity of grasses: leaf growth vs. tillering. In: LEMAIRE et.al (ed.) Grassland ecophysiology and grazing ecology. Wallingford: CAB-International, 2000. p.101-126.

NGUEFACK, J. et al. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, Guildford, v. 23, p. 377- 383, 2012.

NODARI, R. O. & GUERRA, M. P. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal. In: FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento. 2.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis : Editora da UFSC, 2000. p. 27-38.

OLIVEIRA, M. T. R. & BERBET, P. A. Efeito da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata*. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 1200-1204, 2011.

OLIVERO-VERBEL, J. et al. Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Caribe, v. 8, n. 5, p. 419-427, 2009.

ONAWUNMI G. O. Evaluation of the antifungal activity of lemon grass oil. **International Journal of Crude Drug Research**, Lisse, v. 27, n.2, p. 121-6, 1989.

OSÓRIO, G.T. et al. Efeito de agentes fumigantes sobre o bolor azul e o mofo cinzento em frutos de maçã. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n.1, p.063-067, 2013.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v 18, n.2, p. 301-307, 2008.

PADALIA, R. C. et al. Chemical fingerprinting of the fragrant volatiles of nineteen indian cultivars of *Cymbopogon* Spreng. (Poaceae). **Records of Natural Products**, Ancara, v. 5, n.4 p. 290-299, 2011.

PADMANABHAN, P. et al. Evaluation of DPPH radical scavenging activity and reducing power of four selected medicinal plants and their combinations. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, Dabok, v. 4, n. 2, p. 143-146, 2012.

PAGLIARINI, M. S. et al. Meiose vegetal: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais, 2. 2004. Brasília. **Anais...**Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 24-41.

PALMA-SILVA, C. et al. Meiotic behavior and pollen viability of wild populations of the neotropical species *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae). **Plant Species Biology**, Quioto, v. 23, p. 217–221, 2008.

PARK, M.J. et al. Effect of citral, eugenol, nerolidol and  $\alpha$ -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, Milano, v. 80, p. 290-296, 2009.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, Barking, v. 41, n.3, p. 274-285, 2008.

PETEROS, N. P. & UY, M. M. Antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of four philippine medicinal plants. **Journal of Medicinal Plant Research**, Muenster, v. 4, n. 5, p. 407-414, 2010.

POUR, B. M. & SASIDHARAN, S. In vivo toxicity study of *Lantana camara*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Pequim, v.11, p. 230-232, 2011.

POZZOBON, M. T. **Caracterização citogenética de acessos de germoplasma de espécies silvestres e semi domesticadas do gênero *Capsicum* (Solanaceae)**. 2005. 152f. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

PRATES, H. T. et al. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 193-197, 1998.

PRIPDEEVECH, P. S. et al. Highly volatile constituents of *Vetiveria zizanioides* roots grown under different cultivation conditions. **Molecules**, Basel, v.11, p.817-826, 2006.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>. Acesso em 24/03/13.

RANGAHAU, M. K. Essential oils and their production. **Crop and Food Research**, New Zealand, v. 39, p.1-4, 2001.

RANJBAR, M. et al. Chromosome number and meiotic behaviour of two populations of *Onobrychis chorassanica* Bunge (*O. sect. Hymenobrychis*) in Iran. **Journal of Cell and Molecular Research**, Oxford, v.2 , n. 1,p. 49-55, 2010.

RAUBER, C. S. et al. Avaliação da estabilidade do óleo volátil de *Cymbopogon citratus*. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE LATINO-AMERICANA DE FITOQUÍMICA, 3., 1999, Gramado. Anais...Gramado: Metrópole, 1999. 678p.

RENVOIZE, S. A. Studies in *Elionurus* (Gramineae). **Kew Bulletin**, Richmond, v. 32, n. 3, p.666-672, 1978.

RIZVI S.J., RIZVI S.J. **Allelopathy Basic and Applied Aspects**. 2.ed. Londres: Chapman & Hall, 1992. p.504.

RODOV, V. et al. Preformed antifungal compounds of lemon fruit: citral and its relation to disease resistance. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. Londres, v.43,p. 1057–1061, 1995.

ROMAGNI, J.G. et al. Inhibition of plant asparagine synthetase by monoterpene cineol. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 123, n. 2, p. 725-732, 2000.

ROSENGURTT, B. et al. **Gramíneas uruguayas**. Montevideo: Departamento de Publicaciones de la Universidad de la Republica, 1970. 489p

ROSSLENBROICH H. J. & STUEBLER, D. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, p. 557-561, 2000.

RUFINO, M.S.M. et al. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico** [da] Embrapa, v. 127, p.1-4, 2007.

SABINI, L. I. et al. Study of the citotoxic and antifungal activity of the essencial oil of *Elyonurus muticus* against *Candida* spp. **Molecular Medicinal Chemistry**, Indiana, v. 11, p. 31-33, 2006.

SACCHETTI, G., et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. **Food Chemistry**, Londres,v. 91, p.621–632, 2005.

SADDIQ, A. A. et al. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 98,p. 89-93, 2010.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 34, p. 3-21, 2001.

SANTOS, A. S. et al. Descrição de Sistemas e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. **Comunicado Técnico** [do] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Belém, v. 99, p. 1-7, 2004.

SANTOS, C.A.F. et al. Genetic similarity of *Jatropha curcas* accessions based on AFLP markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 10, p.64-369, 2010.

SANHUEZA, R. M. V.; et al. *Botrytis cinerea*, mofo cinzento da videira. **Comunicado Técnico** [da] Embrapa, v. 20,p.1-2, 1996.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T. & MORAES-FERNANDES, M.I.B. Chromosome numbers, karyotypes and meiotic behavior of populations of some *Trifolium* (Leguminosae) species. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 2, p. 379-390, 1988.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Cytogenetics of the genus *Leucaena* Benth. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.309-314, 2004.

SCHMIDT-SILVA, V. et al. Cytotoxicity of essential oils from two species of *Heterothalamus* (Asteraceae). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 59, p. 681–690, 2011.

SCHWAB, W. et al. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. **The Plant Journal**, Malden, v. 54, p. 712-732, 2008.

SCRAMIM, S. & SAITO, M. L. Essential oil of *Elyonurus muticus* (Sprengel) O. Kuntze (Gramineae). **Journal of Essential Oil Research**, New York, v. 12, p. 298-300, 2000.

SCRIVANTI, L. R. et al. Essential oil composition of *Bothriochloa* Kuntze (Poaceae) from South America and their chemotaxonomy. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 37, p. 206–213, 2009.

SCRIVANTI, L.R. Allelopathic potential of *Bothriochloa laguroides* var. *laguroides* (DC.) Herter (Poaceae: Andropogoneae). **Flora**, Londres, v. 205, p. 302-305, 2010.

SCHNAUBELT, K. **Advanced aromatherapy – the science of essential oil therapy**. Healing Arts Press, Vermont, 138p. 1998.

SCHUBERT, R. N. et al. Atividade antimicrobiana de *Elionurus latiflorus* e de *Tagetes minuta* sobre leveduras de mastite. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Anais...**Bento Gonçalves: SBOE, 2012.

SERAFINI, L. A. et al. **Óleos Essenciais – Extrações e Aplicações de Óleos Essenciais de Plantas Aromáticas e Medicinais**. 1.ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 55p.

SHARMA, A. & SEN, S. **Chromosome botany**. Enfield: Science Publishers, 2002. 168p.

SILOU, T. et al. Study of essential oil composition of *Elionurus hensii* Schum from Congo. **Journal of Essential Oil Research**, New York, v. 18, p. 518-520, 2006.

SILVA, C. M. S. da et al. Estudo da composição química e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Elyonurus muticus* (Sprengel) Kuntze. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. **Anais...**Fortaleza: SBQ, 2009.

SINAI, A. C. et al. Óleos Essenciais, Potencial Anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 16, p. 38-43, 2000.

SINGH, H. P. et al. Phytotoxicity of the volatile monoterpene citronellal against some weeds. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tubingen, v. 61, p. 334-340, 2006.

SIRIPORNVISAL, S. et al. Antifungal activity of essential oils derived from some medicinal plants against grey mould (*Botrytis cinerea*). **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, Bangkok, Volume especial, p.229-233, 2009.

SHASANY, A.K. et al. Use of RAPD and AFLP markers to identify Inter- and intraspecific hybrids of *Mentha*. **Journal of Heredity**, Washington, v. 96, n. 5, p. 542-549, 2005.

SOLIS, P. N. et al. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). **Planta Medica**, Stuttgart, v.26, p.250-252, 1993.

SOUZA, P.P.R. de et al. Antifungal action of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil against *Penicillium* spp from environment air of a dry food industry. **International Research Journal of Microbiology**, Sapele, v. 2, n.5, p.173-178, 2011.

SOUZA FILHO, A.P.S. et al. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório – revisão crítica. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.

STACE, C.A. Cytology and cytogenetics as a fundamental resource for the 20th and 21th centuries. **Taxon**, Utrecht, v. 49, p. 451–477, 2000.

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. Melbourne: Addison-Wesley, 1971. 216 p.

STEFANAZZI, N. et al. Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curcuionidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, p. 639-646, 2010.

STESSY, T. F. **Plant taxonomy: the systematic evaluation of comparative data**. New York: Columbia University Press, 1990. 510p.

SUTIL, S. B. et al. *Minthostachys verticillata*: toxicity of its essential oil and major constituents to *Artemia salina* and cell lines. **Molecular Medicinal Chemistry**, Indiana, v. 10, 41-42, 2006.

TAIZ, L. & ZAIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p.95-105.

TERBLANCHE, F. C. **The characterization, utilization and manufacture of products recovered from *Lippia scaberrima* Sond.** 2000. 138f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - University of Pretoria, Pretoria.

TOFÖLLI, J. G. et al. *Botrytis* sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. **Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.11-20, 2011.

TORRE, de la M. P. et al. Analysis of genetic variability by ISSR markers in *Calibrachoa caesia*. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v 15, n 2, p. 2-12, 2012.

TRIPATHI, P. & DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, p. 235–245, 2004.

TRIPATHI, P. et al. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Secaucus, v. 24, p.39–46, 2008.

TZORTZAKIS, N. G. et al. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlim, v. 8, p. 253–258, 2007.

VASEY, Geo. Special uses and properties of some mexican grasses. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, Lawrence, v. 14, n. 5, p. 98-100, 1887.

VEGETTI, A. C. & ANTÓN, A. M. Estructura del diseminulo en especies de Andropogoneae (Poaceae). **Anales Jardín Botánico de Madrid**, Madrid, v. 56, n. 1, p. 95-106, 1998.

VERLET, N. Essential oils: supply, demand and price determination. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.344, p.9–16, 1993.

VILELA-MORALES, E. A. & VOIS, A. C. C. Recursos genéticos vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v.17, n.2, p.11-42, 2000.

VITTI, A.M.S.; BRITO, O. J. **Óleo essencial de eucalipto**. Documentos Florestais, Piracicaba: ESALQ, 26p, 2003.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**. London, v.3, n.21, p.4407-4414, 1995.

- WATSON, L. & DALLWITZ, M. J. **The Grass for the World**. Cambridge: CAB International, 1994. p.366-367.
- WELKER, C. A. D.; LONGHI-WAGNER, H. M. A Família Poaceae no Morro Santana, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, n.4, p.53-92, 2007.
- WILLIAMSON, B. et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, Amsterdam, v.8, n. 5, p. 561–580, 2007.
- WRIGHT, S. Isolation by Distance. **Genetics**, Bethesda, MD, n. 28, p. 114-138, 1943.
- WURIATMO, E. **Application of citral to control postharvest diseases of oranges**. 2011. 203f. Tese (Doutorado em Filosofia) – School of Agriculture, Food and Wine, Faculty of Science, The University of Adelaide, Adelaide.
- YAMAMOTO, P. Y. **Interação genótipo X ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** Campinas : IAC, 2006. 78f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico, Campinas, 2006.
- ZABKA, M. et al. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, Phoenix, v. 30, p. 250–253, 2009.
- ZHANG, J.Y. et al. Morphological diversity of wild medicinal *Paris* L. from China and Vietnam. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 10, n.73, p. 16421-16428, 2011.
- ZHU, R.R. et al. Genetic diversity of *Aquilegia* (Ranunculaceae) species and cultivars assessed by AFLPs. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n.2, p. 817-827, 2011.
- XIE, W.G. et al. Genetic variation and comparison of orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) cultivars and wild accessions as revealed by SSR markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v 11, n.1, p. 425-433, 2012.