

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

***Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. NO ESTADO DA BAHIA,
BRASIL: CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL E
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

DANIEL VIEIRA DE MORAIS

**CRUZ DAS ALMAS / BAHIA
2016**

***Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. NO ESTADO DA BAHIA,
BRASIL: CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL E
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

Daniel Vieira de Morais

Engenheiro Agrônomo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Coorientadora: Profa. Dra. Lorena Andrade Nunes

**CRUZ DAS ALMAS / BAHIA
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

M827d	<p>Morais, Daniel Vieira de. <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> (L.) Taub. do estado da Bahia, Brasil: caracterização populacional e propriedades biológicas / Daniel Vieira de Moraes._ Cruz das Almas, BA, 2016. 68f.; il.</p> <p>Orientador: Carlos Alfredo Lopes de Carvalho. Coorientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Plantas medicinais – Caracterização morfométrica. 2.Plantas medicinais – Dalbergia. 3.Antioxidantes – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 581.634</p>
-------	---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

***Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. NO ESTADO DA BAHIA,
BRASIL: CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL E
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
Daniel Vieira de Moraes**

Realizada em 22 de Julho de 2016

Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB
Examinador Interno (Orientador)

Profa. Dra. Geni Sodré Quinhones
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / UFRB
Examinador Interno

Prof. Dr. Edilson Divino de Araújo
Universidade Federal de Sergipe / UFS
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Às inspirações da minha vida,

À Eliana, minha mãe, corajosa, generosa e compreensível, alicerce único em todos os momentos da vida.

À minha vó, Albertina, percussora de uma linda história de vida e inspiração da palavra mulher.

*Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.
Tenha felicidade bastante para fazê-la
doce.*

*Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa pela confiança, dedicação e generosidade com que me tratou ao longo dessa jornada e, principalmente por mostrar o real significado da palavra educador.

À Profa. Dra. Lorena Nunes Andrade pela coorientação, atenção, críticas e confiança.

Ao Prof. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho pela oportunidade, dedicação despendida durante todo período do mestrado, cordialidade e por acreditar na minha capacidade enquanto orientado.

À Profa. Dra. Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho pela orientação nas análises físico-químicas e biológicas, dedicação e gentileza prestada.

À Vandira Pereira da Mata pelo carinho e apoio durante as coletas em campo.

À Simone Teles (Laboratório de Plantas Mediciniais – UFRB), pelo apoio nas análises físico-químicas.

À Profa. Fabiane de Lima Silva pelo esforço e apoio durante as análises estatísticas.

Aos companheiros do Grupo Insecta, pelo acolhimento e total apoio durante toda etapa deste trabalho. Em especial a Dona Gal, Irana, Cátia, Maiara e Carla.

Às amigas Rosane da Silva Sant'Ana e Marivalda Figueredo Santa Bárbara, pelo carinho, conselhos e respeito ao longo da convivência.

À querida Cerilene Santiago Machado, pela atenção e palavras de apoio nos momentos difíceis.

À família Vieira, pela compreensão, suporte, carinho e, principalmente, pela confiança.

Ao CNPq pelo financiamento da bolsa de pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro vinculado ao Projeto MEC/MCTI/CAPES/CNPq/FAPs nº 09/2014 - Pesquisador Visitante Especial, Processo: 88881.062167/2014-01, Proposta: 189737, sob a coordenação técnica da Profa. Dra. Geni Sodrê Quinhones do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias pela oportunidade de realizar o Curso de Mestrado.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pelo apoio logístico e de infraestrutura que foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

Enfim, agradeço imensamente a todas as pessoas que estiveram presentes e contribuíram neste mestrado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
REFERÊNCIA TEÓRICO	1
 ARTIGO 1	
 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, FOTOPROTETORA E INIBIÇÃO DA TIROSINASE EM EXTRATOS DE <i>Dalbergia ecastaphyllum</i>	16
 ARTIGO 2	
 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA FOLIAR ENTRE POPULAÇÕES DE <i>Dalbergia</i> <i>ecastaphyllum</i> (L.) Taub. DO LITORAL DA BAHIA, BRASIL	40
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58

***Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. DO ESTADO DA BAHIA, BRASIL: CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

Autor: Daniel Vieira de Moraes

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

RESUMO: Esse trabalho teve como objetivo geral identificar e determinar as propriedades biológicas de extratos hidroetanólicos de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub., e realizar a caracterização morfométrica de populações desta espécie localizadas na região litoral da Bahia, Brasil. Nesse estudo foi realizada a caracterização morfométrica foliar de *D. ecastaphyllum* e determinado o conteúdo fenólico e as atividades antioxidante, fotoprotetora e inibição da enzima tirosinase de seus extratos hidroetanólicos. Os resultados da caracterização morfométrica mostram que as maiores diferenças morfológicas foram observadas entre populações de Ilhéus e Itaparica. Não há correlação dessa diferença com a distância geográfica e altitude. A espécie apresenta forma foliar elíptica e ovada. Com relação a composição química, as amostras T5 e T3 apresentaram as maiores concentrações de fenóis totais, com $378,43 \pm 10,50$ e $377,17 \pm 10,50$ mg EAG/g extrato seco, respectivamente. E a amostra A6 apresentou maior teor de flavonoides com 28,59 mg EQ/g extrato seco. A maior atividade antioxidante foi observada na amostra T7, com 48,34% pelo método de inibição da descoloração do β -caroteno e EC50 de $28,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH). Todas amostras avaliadas foram capazes de inibir a enzima tirosinase, com destaque à amostra T5, com EC50: $124,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Houve uma correlação negativa significativa ($r=-75$) entre os flavonoides e atividade inibidora da tirosinase. Todas as amostras avaliadas tiveram valores de fator de proteção solar (FPS) acima de seis em 100% das concentrações avaliadas. Esses valores encontram-se em conformidade com a legislação brasileira e evidencia o potencial de *D. ecastaphyllum* como material fotoprotetor. Os resultados apresentados nesse estudo fornecem informações relevantes sobre a espécie e contribuem para o avanço nas investigações a respeito de suas características físicas e químicas, bem como atividades biológicas.

Palavras-chave: compostos bioativos, Fabaceae, apicultura.

***Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. OF THE STATE OF BAHIA, BRAZIL: CHARACTERIZATION OF POPULATION AND BIOLOGICAL PROPERTIES**

Author: Daniel Vieira de Moraes

Advisor: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

ABSTRACT: This work aimed to identify and determine the biological properties of hidroetanolic extracts of *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub., and perform the morphometric characterization of populations of this species located on the coastal region of Bahia State, Brazil. In this study, the leaf morphometric characterization of *D. ecastaphyllum* was conducted, as well as the phenolic content and the antioxidant activity, photoprotective, and activity inhibition of tyrosinase of the hidroetanolic extracts. The results show that the greatest morphological differences were observed in populations of the municipalities Ilhéus and Itaparica. There is no correlation between this difference with geographical distance and altitude. The species presents elliptic and oval leaf shape. With respect to chemical composition, samples T5 and T3 presented the highest concentrations of total phenolics with 378.43 ± 10.50 and 377.17 ± 10.50 mg EAG/g of dry extract, respectively. Sample T6 showed the highest flavonoid contents with 28.59 mg EQ/g of dry extract. The greatest antioxidant activity was observed in sample T7, with 48.34% by the inhibition β -carotene bleaching assay and EC50 of $28.04 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ by the method of scavenging free radicals (DPPH). All samples evaluated were able to inhibit the enzyme tyrosinase, with emphasis on sample T5, with EC50: $124.62 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. There was a significant negative correlation ($r = -75$) between the flavonoids and the inhibitory activity of tyrosinase. All samples evaluated had values of sun protection factor (SPF) above six in 100% of the concentrations evaluated. These values comply with the Brazilian law and show the potential of *D. ecastaphyllum* as a photoprotection material. The results presented in this study provide important information about the species and contribute to the progress in investigations regarding its physical and chemical characteristics, as well as biological activities.

Keywords: bioactive compounds, Fabaceae , beekeeping.

REFERENCIAL TEÓRICO

Compostos bioativos

Compostos bioativos também conhecidos como metabólitos secundários, são compostos que possuem a capacidade e habilidade de interagir com um ou mais componentes do tecido vivo, apresentando uma ampla variedade de efeitos. A origem dessas substâncias pode ser de material terrestre (plantas, fungos e bactérias) ou aquático (bactérias, mexilhões, algas e etc.) (GUAADAQUI et al., 2014).

Existe uma ampla variedade de metabólitos secundários produzidos pelos vegetais que são responsáveis pela sua defesa natural diante as condições de estresses bióticos e abióticos (RÊGO JÚNIOR et al., 2011). Os metabólitos secundários encontrados em plantas desempenham inúmeras funções tanto na saúde humana, por meio dos tratamentos fitoterápicos, quanto para os próprios vegetais seja na proteção contra patógenos, injúrias, inimigos naturais e/ou auxílio para a adaptação e propagação de algumas espécies (OLIVEIRA et al., 2011; RÊGO JÚNIOR et al., 2011; ANSELMO e LIMA, 2014).

Os três grandes grupos de metabólitos secundários são: os terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os terpenos são os mais numerosos, sintetizados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto), comercialmente apresentam importância no uso de aromas e fragrâncias de produtos alimentícios, e importância medicinal em virtude das propriedades anticancerígena, antimicrobiana e antiúlcera que apresentam (GARCÍA e CARRIL, 2009; SILVA et al., 2010).

O segundo grupo representado pelos compostos fenólicos possuem anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxila (mais de 8000 variações estruturais) derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico, (MICHALAK, 2006; APAK et al., 2007; HUANG et al., 2009). São substâncias representadas em grande número na natureza, que incluem diferentes subclasses como ácido fenólicos, taninos, polifenóis oxidativos, linhanos, estilbenos e flavonoides (FERREIRA, 2009).

O ácido caféico é o ácido fenólico mais abundante em muitas frutas e verduras, na maioria das vezes esterificados com ácido quinico como ácido clorogênico, que é o composto fenólico de maior constituição do café (DAI e MUMPER, 2010).

Os ácidos fenólicos são constituintes muito presentes em produtos de origem vegetal (frutas, verduras, cereais, legumes, óleo, chocolate, etc.) e bebidas (café, chás, cerveja, vinho, etc.), são parcialmente responsáveis pela maioria das propriedades organolépticas dos alimentos (DAI e MUMPER, 2010).

Esses compostos fenólicos são importantes, principalmente na saúde humana devido ao potencial contra doenças cancerígenas e cardiovasculares (CARTEA et al., 2010; TOSS et al., 2010) e têm sido amplamente descritos devido as suas importantes propriedades biológicas, como atividade antioxidante, anti-úlceras, antimicrobiana, antitumorais, antimutagênicas e antibacteriana (SHUI e LEONG, 2002; CICERALE et al., 2010; DASHPUTRE e NAIKWADE, 2011; NASCIMENTO et al., 2014; SHARMA e MISHRA, 2014).

Os alcaloides, que constituem o terceiro grupo de metabólitos secundários, normalmente são sintetizados a partir de lisina, tirosina e triptofano, enquanto alguns como a nicotina e compostos relacionados derivam de ornitina (GARCÍA e CARRIL, 2009).

Existem aproximadamente 12.000 diferentes alcaloides distribuídos em número de classes distintas, identificadas em plantas, muitas com importantes propriedades bioativas para tratamento de doenças (TAKOS e ROOK, 2013).

Neste cenário e considerando a importância dos compostos bioativos, à distribuição de uma determinada espécie vegetal pode apresentar variação em função de condições edafoclimáticas, especialmente em países com diversos biomas como o Brasil. Estudos sobre as populações de uma determinada espécie vegetal são importantes para verificar eventuais variações, de forma a subsidiar ações para a sua exploração econômica.

Uma das formas de caracterizar essas populações é por meio do uso da técnica de morfometria geométrica (BOEGER et al., 2008; CONESA e ROSSELLO, 2012; SILVA et al., 2012)

Morfometria geométrica como técnica para estudos populacionais

O termo morfometria formulado em 1965 por R. Blackith, é compreendido como um conjunto de procedimentos estatísticos interligados para analisar a variabilidade do tamanho e forma de órgãos e organismos. Em termos simples pode-se entender como “medir a forma” ou mensurar as formas orgânicas. (REYMENT, 1996; FORNEL e CORDEIRO-ESTRELA, 2012).

Esta técnica consiste em uma das ferramentas mais utilizadas por pesquisadores das diversas áreas da ciência desde ao longo de muitos anos com o objetivo de desvendar as diferenças existentes entre indivíduos, bem como entender a relação destes com o ambiente ao qual estão inseridos (REYMENT, 1985; BOOKSTEIN, 1996; REYMENT, 1996; WEST et al., 1997; SLICE, 2007; KLINGENBERG et al., 2012; HUANG, et al., 2014; KLINGENBERG, 2015). Com o passar dos anos o seu uso tem sido aperfeiçoado o que permitiu uma melhor compreensão da evolução de muitos seres vivos. Os estudos morfométricos respondem questões relacionadas à origem e adaptação de espécies com o seu ambiente; relação do crescimento com a natureza; dimorfismo sexual; evolução filogenética e auxiliam a classificação taxonômica de muitas espécies (SLICE, 2005).

A morfometria geométrica surgiu no início dos anos de 1990, a partir das dificuldades encontradas por pesquisadores em desenvolver métodos capazes de quantificar e analisar a forma de estruturas morfológicas de objetos e conseguir representá-los por meio de análises multivariadas (ROHLF e MARCUS, 1993).

Uma das principais características dessa técnica é a possibilidade de capturar a geometria da estrutura em estudo e representá-la em formato de duas ou três dimensões (2D e 3D). Além disso, as distâncias existentes entre os marcos anatômicos são determinadas por meio de coordenadas cartesianas, que fornecem informações precisas sobre a sua posição relativa, e assim permite a reconstrução da imagem analisada (FORNEL, 2005). É importante ressaltar que estes marcos apresentam homologia entre si, ou seja, contribuem para uma interpretação morfológica completa dos resultados, ao contrário da morfometria tradicional (ROHLF e MARCUS, 1993).

Destaca-se ainda que este método oferece robustez e ao mesmo tempo uma flexibilidade para determinação de variações morfológicas, podendo ainda ser utilizado para quantificação da assimetria entre objetos (KLINGENBERG, 2015).

Dentre as várias características que a morfometria geométrica apresenta, a utilização de imagens digitalizadas para determinação de coordenadas, é uma das responsáveis por torná-la uma técnica moderna. Ao longo dos anos o seu desenvolvimento sempre esteve alinhado ao avanço tecnológico, o que contribuiu de forma bastante significativa para os estudos nessa área, além de torná-los mais interessante.

Embora as técnicas de morfometria geométrica estejam desenvolvidas a mais de vinte anos, a sua utilização ao longo desse tempo tem se restringido a estudos faunísticos ou na espécie humana. Em alguns campos da ciência, como paleontologia e zoologia, o uso da técnica é extremamente difundido, e isso tem contribuído de forma bastante significativa para a melhoria das investigações nessas áreas (VIÐARSDÓTTIR et al., 2002; BASTIR e ROSAS, 2006; OTTONI et al., 2012; LYCETT e VON CRAMON-TAUBADEL, 2013; CASTANERA et al., 2015).

Quando se refere a estudos botânicos, é perceptível que os avanços não ocorreram da mesma maneira. No entanto, os trabalhos que foram desenvolvidos, como os realizados por Conesa et al. (2012), Savriama et al. (2012), Strelin et al., (2013), Huang et al. (2014) e Viscosi (2015) são muito importantes por demonstrar novas perspectivas e o potencial de uso desta técnica de avaliação populacional.

Desta forma, essa técnica pode ser empregada para estudos populacionais de diferentes espécies vegetais, como por exemplo, uma das mais importantes plantas propolizadora de interesse para a apicultura no Nordeste brasileiro, *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub., tanto pela presença de substâncias bioativas, quanto pela sua distribuição ao longo da costa litorânea, especialmente no estado da Bahia.

***Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub.**

A *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. é uma Fabaceae da subfamília Faboideae (DI STASI et al., 2002), cujo gênero somam mais de 400 espécies, distribuídas em regiões tropicais da América Central e do Sul, África, Madagascar e sul da Ásia (CARVALHO, 1997; VASUDEVA et al., 2009). No Brasil, são encontradas 39 espécies (CARVALHO, 1997).

É uma espécie nativa que também pode ser encontrada ao longo da costa leste do continente americano, desde o sul da Flórida (EUA) ao sul do Brasil, assim

como na costa ocidental da África (CARVALHO, 1997; SILVA et al., 2008). No Brasil, está distribuída em domínios fitogeográficos na Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, abrangendo os estados do Norte (Amapá e Pará), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe), Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (LIMA, 2014).

Popularmente a *D. ecastaphyllum* é conhecida como arco de barril, bejuco de peseta, bejuco sern, bejuco péndola, bugi, bugio, falsa salsa da praia, rabo-de-bugio, rabo-de-macaco, marmelo-do-mangue, feijão de guaiamum, marmeleiro-da-praia e moeda-de-videira (DONELLY et al., 1973; CARVALHO, 1997; SAUR et al., 2000; REYS e CANTILLO, 2003; TAROLA et al., 2007; SILVA, 2008; EGNANKOU, 2009; NJIFOUNFOU et al., 2009; UKOIMA et al., 2010; PICCINELLI et al., 2011).

Na Bahia ocorre em toda a costa litorânea (Figura 1), que envolve as regiões do Litoral Norte, Metropolitana/Salvador, Baixo Sul, Litoral Sul, Costa do Descobrimento e Extremo Sul, estendendo-se na zona litorânea do Estado em áreas de apicun (margeando manguezais), de restinga (arenosas) e ribeirinhas (embocaduras e estuários) (QUEIROZ, 2012; MATA, 2014).

É uma espécie de crescimento escandente ou semi-prostrada. Tanto em áreas de rios e manguezais quanto em áreas de restinga, se desenvolve em emaranhado de ramos e caules, o que auxilia o seu processo de fixação na areia (CARVALHO, 1997; SILVA et al., 2008).

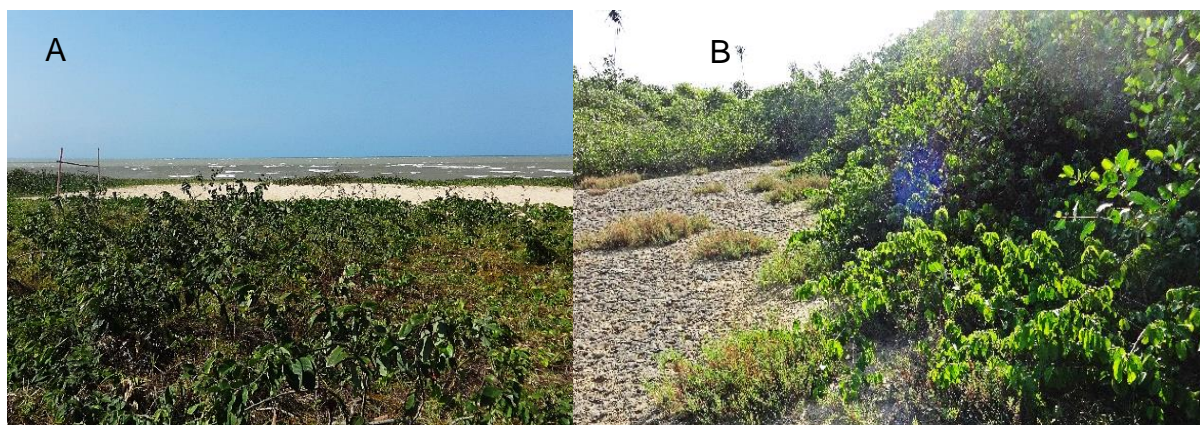


Figura 1. Aspecto do desenvolvimento de *Dalbergia ecastaphyllum*: (A) margem de praia e estuário e (B) manguezal. (Fotos: Daniel Morais).

D. ecastaphyllum é bem adaptada às condições de alta salinidade, apresenta

nódulos em suas raízes que facilitam a fixação do nitrogênio no solo por meio da associação com bactérias e seus frutos são capazes de flutuar devido a sua forma alada. Geralmente cresce em locais em que há constante vaporização de sal e em solos moderadamente salinos, onde indivíduos mais velhos tendem a formar densas moitas. Inicialmente o seu crescimento é moderado e constante, embora plantas mais velhas possam crescer até dois metros por ano (CARVALHO, 1997).

Apresenta alguns aspectos como arbustos entrelaçados com ramos escandentes, flores brancas, pequenas, reunidas em panículas axilares, subfasciculadas e legumes samaróides suborbiculares com a ala reduzida (Figura 2), estigma truncado, anteras cordiformes na base, 1-9 folhetos, folíolos com mais de 4 cm de comprimento, a maioria com mais de 5 cm de comprimento, um folíolo, densamente estrigoso, descolorido, ovário viloso ou acetinado, e frutos pouco estrigulosos quando maduro (LINARES e SOUZA, 2007).



Figura 2. Aspecto geral das flores (A), dos frutos (B) e do desenvolvimento vegetativo (C) de *Dalbergia ecastaphyllum*. (Fotos: Daniel Morais).

D. ecastaphyllum é a principal fonte de resina para a produção de própolis vermelha, produto resultante de uma complexa mistura de material resinoso e balsâmico, oriunda de exsudações de plantas, coletadas e transformadas pelas abelhas operárias (DAUGSCH et al., 2008; PICCINELLI et al., 2011). A própolis destaca-se pela ampla utilidade que possui tanto na medicina complementar como na medicina alternativa em inúmeros países. Isso ocorre devido às propriedades biológicas que apresenta, como anti-inflamatória, antioxidante, antisséptico e antineoplásica, entre outras que tem recentemente atraído a atenção de

pesquisadores das diversas áreas da ciência (AWALE et al., 2008; DAUGSCH et al., 2008; FRANCHI JR. et al., 2012).

Após a análise do perfil químico da planta e da própolis vermelha, Dausch et al. (2008) e Silva et al. (2008) constataram que ambos possuem constituintes químicos semelhantes, onde os principais compostos encontrados foram os isoflavonóides medicarpina e 3-hidróxi-8,9-dimetóxipterocarpna. Esses autores consideram a *D. ecastaphyllum* um recurso vegetal com grande potencial para o desenvolvimento de produtos fitoterápicos devido a sua composição química.

O Brasil apesar de possuir uma enorme biodiversidade, ainda são escassos os estudos a respeito de sua flora nativa, especificamente em espécies importantes para a atividade apícola, como a *Dalbergia ecastaphyllum*.

Embora esta espécie tenha uma grande abrangência no estado da Bahia, não há registro de trabalhos a respeito de sua caracterização morfométrica populacional, bem como estudos de identificação de compostos bioativos em populações dessa região. Além disso, a *D. ecastaphyllum*, desse Estado ocupa domínios da Mata Atlântica, bioma que nos últimos anos em decorrência da ação antrópica teve os seus limites reduzidos, correspondendo apenas a menos de 15 % do território nacional, deixando evidente a necessidade de estudos sobre a espécie e principalmente estratégias que visam contribuir para a preservação do ambiente ao qual está inserida.

Portanto, as investigações nessa espécie poderão contribuir significativamente para valorização dos domínios geográficos em que ocupa, bem como prover informações técnico-científicas necessárias aos futuros trabalhos de domesticação e exploração. Desta forma, o objetivo do trabalho é identificar e determinar as propriedades biológicas e realizar a caracterização morfométrica de populações de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. na região litoral da Bahia, Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSELMO, J. S.; LIMA, R. A. Identificação de classes de metabólitos secundários no extrato etanólico das folhas de *Solanum jamaicense* (solanaceae) e seu potencial fungicida sobre *Candida albicans* in vitro. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.10, n.1, p.11-20, 2014.

APAK, R. et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v. 12, n.7, p.1496-547, 2007.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p.181-189, 2008.

BASTIR, M.; ROSAS, A. Correlated variation between the lateral basicranium and the face: a geometric morphometric study in different human groups. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 9, p. 814-824, 2006.

BOEGER, M. R. T. et al. Variabilidade morfológica foliar de *Miconia sellowiana* (DC.) Naudin (Melastomataceae) em diferentes fitofisionomias no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 3, p. 443-452, 2008.

BOOKSTEIN, F. L. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. **Bulletin of mathematical biology**, v. 58, n. 2, p. 313–365, 1996.

CARTEA, M. et al. Phenolic Compounds in *Brassica* Vegetables. **Molecules**, v.16, n.251-280, 2010.

CARVALHO, A. M. A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergiae) in Brazil. **Brittonia**, v. 49, n. 1, p. 87-109, 1997.

CASTANERA, D. et al. Geometric morphometric analysis applied to theropod tracks from the Lower Cretaceous (Berriasian) of Spain. **Palaeontology**, v. 58, n. 1, p. 183-200, 2015.

CICERALE, S.; LUCAS, L.; KEAST, R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. **International Journal of Molecules Science**.v.11, p. 458-479, 2010.

CONESA, M. A.; MUS, M.; ROSSELLO, J. A. Leaf shape variation and taxonomic boundaries in two sympatric rupicolous species of *Helichrysum* (Asteraceae: Gnaphalieae), assessed by linear measurements and geometric morphometry. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 106, n. 3, p. 498-513, 2012.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DASHPUTRE, N. L. NAIKWADE, N. S. Evaluation of Anti-Ulcer Activity of Methanolic Extract of *Abutilon indicum* Linn Leaves in Experimental Rats. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, n.3, v.2, p. 97-100, 2011.

DAUGSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. 2007. 133p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

DAUGSCH, A., MORAES, C.S., FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian Red Propolis - Chemical Composition and Botanical Origin. **eCAM**, v.5, n.4, p.435-441, 2008.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo:UNESP, 2002.

DONELLY, D.M. X.; KEENAN P. J.; PRENDERGAST, J. P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 1157- 1161, 1973.

DRYDEN, I.L. and MARDIA, K.V. **Statistical Analysis of Shape**. John Wiley & Sons, Chichester. 1988.

EGNANKOU, M. W. Rehabilitation of mangroves between Fresco and Grand-Lahou (Côte d'Ivoire): Important fishing areas. **Nature & Faune**, v. 24, p. 81-89, 2009.

FERREIRA, I.C.F.R., BARROS, L., ABREU, R.M.V. Antioxidants in wild mushrooms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 1543-1560, 2009.

FORNEL, R. **Estudo da variação morfológica craniana entre quatro blocos populacionais de *Ctenomys lami* (Rodentia, Ctenomyidae) através de morfometria geométrica**. 2005. 78f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

FORNEL, R.; CORDEIRO-ESTRELA, P. 2012. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. In: Jorge R. Marinho; Luiz U. Hepp; Rodrigo Fornel. (Org.). *Temas em Biologia: Edição comemorativa aos 20 anos do Curso de Ciências Biológicas e aos 5 anos do PPG-Ecologia da URI Campus de Erechim*. 1ed.Erechim: EDIFAPES, p. 101-120.

FRANCHI JR., G.C.; MORAES, C.S.; TORETI, V.C.; A.DAUGSCH; NOWILL, A.E.; PARK, Y.K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT Assay. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-6, 2012.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología)**. Serie Fisiología Vegetal. v. 2, p.119-145, 2009.

GUAADAOU, A. et al. What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**. v.3, n.3, p. 174-179, 2014.

HUANG, W-Y.; CAI.Y-Z; ZHANG, Y. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. **Nutrition and Cancer**, London, v.62, n.1, p.1-20, 2009.

HUANG, Lan-Jie et al. Understanding diversity in leaf shape of chinese sagittaria (alismataceae) by geometric tools. **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 6, p. 1927-1934, 2014.

KLINGENBERG, C. P. et al. Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: a multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 25, n. 1, p. 115-129, 2012.

KLINGENBERG, C. P. Analyzing Fluctuating Asymmetry with Geometric Morphometrics: Concepts, Methods, and Applications. p. 843–934, 2015.

LIMA, H.C. de; et al. *Fabaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 28 Nov. 2014.

LINARES, L. J.; SOUZA, S., MARIO; Nuevas especies de *Dalbergia* (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae) en México y Centroamérica. **Ceiba**, v. 48, n. 1-2, p. 61-82, 2007.

LYCETT, S. J.; VON CRAMON-TAUBADEL, N. Understanding the comparative catarrhine context of human pelvic form: a 3D geometric morphometric analysis. **Journal of Human Evolution**, v. 64, n. 4, p. 300-310, 2013.

MATA, V. P. **Ocorrência natural e aspectos de interesse agrônômico de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taubert (Fabaceae) no estado da bahia: base para a produção da própolis vermelha**. 2014. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas. 2014.

MICHALAK, A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. **Polish Journal of Environmental Studies**. v.15, n.4, p.523-530, 2006.

NASCIMENTO, P. L. et al. Quantification, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Phenolics Isolated from Different Extracts of *Capsicum frutescens* (Pimenta Malagueta). **Molecules**, v.19, p. 5434-5447, 2014.

NJIFONJOU, O.; ZE ANTOINE, M.; ONDO, S. C. Livelihoods in Cameroon mangrove areas: finding a balance between conservation and sustainable use in a fragile ecosystem. **Nature & Faune**, v. 24, p. 61-68, 2009.

OLIVEIRA, L. S. de; MUZITANO, M. F.; COUTINHO, M. A. S.; MELO, G. O. de; COSTA, S. S. Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos. **Inter Science Place**, n. 17, p. 54-74, 2011.

OTTONI, C. et al. Pig domestication and human-mediated dispersal in western Eurasia revealed through ancient DNA and geometric morphometrics. **Molecular biology and evolution**, p. 261, 2012.

PICCINELLI, A. L. et al. Cuban and brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.6484-6491, 2011.

QUEIROZ, E. P.; CARDOSO, D. B. O. S.; FERREIRA, M. H. dos S. Composição florística da vegetação de restinga da APA Rio Capivara, Litoral Norte da Bahia, Brasil. **Sitientibus**, v. 12, n.1, p. 119-141, 2012.

RÊGO JÚNIOR, N. O. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. **Braz. J. Food Technol.**, v. 14, n. 1, p. 50-57, 2011.

REYMENT, R. A. An idiosyncratic history of early morphometrics. *Advances in morphometrics*. **Springer US**, 1996. 15-22.

REYMENT, R. A. Multivariate morphometrics and analysis of shape. **Journal of the International Association for Mathematical Geology**, v. 17, n .6, p.591-609, 1985.

REYS, O.; CANTILLO, F.A. Fitocenosis presentes em las áreas costeras Del sur de La Sierra Maestra, Cuba. I. comunidades com influência marina. **Foresta Veracruzana**, v.5, n.2, p. 1-7, 2003.

ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A revolution morphometrics. **Trends in Ecology & Evolution**, v.8, n. 4, p. 129-132, 1993.

SAUR, E. et al. Nodulation of legume species in wetlands of Guadeloupe (LESSER). **The Society of Wetland Scientists**, v. 20, n. 4, p. 730-734, 2000.

SAVRIAMA, Y. et al. Geometric morphometrics of corolla shape: dissecting components of symmetric and asymmetric variation in *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae). **New Phytologist**, v. 196, n.3, p. 945-954, 2012.

SHARMA, N.; MISHRA, R. P. K. Pharmacological screening and evaluation of anti-peptic ulcer property of leaves of *Artocarpus integrifolia*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, n. 2, p.522-524, 2014.

SHUI, G., LEONG, L. P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by HPLC. **Journal of Chromatography A**, v.977, p.89-96, 2002.

SILVA, B. B. et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.3, p.313-316, 2008.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. dos S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, M. F. S.; DE ANDRADE, I. M.; MAYO, S. J.. Geometric morphometrics of leaf blade shape in *Montrichardia linifera* (Araceae) populations from the Rio Parnaíba Delta, north-east Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, n. 4, p. 554-572, 2012.

SLICE, D.E. Modern Morphometrics em Slide, D.E. (ed) Modern Morphometrics in Physical Anthropology. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 1-45. 2005.

SLICE, D. E. Geometric Morphometrics. **Annual Review of Anthropology**, v. 36, n. 1, p. 261–281, 2007.

STRELIN, M. M. et al. Study of the polymorphism of the Patagonian *Calceolaria polyrhiza* (Calceolariaceae) using decision tree and sequential covering rule induction. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 173, n. 3, p. 487-500, 2013.

TAKOS, M. A.; ROOK, F. Towards a molecular understanding of the biosynthesis of amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. **International Journal of Molecules Science**, v. 14, p. 11713-11741, 2013.

TAROLA, D.C; MAGRO, T.C; SCHILING, A.C. Impacts associated with trampling on tropical sand dune vegetation. **Snow Landscape Research**, v.81, n.1/2, p.151-162, 2007.

UKOIMA H.N. et al. Andoni marine ecology: emphasis on the biology and importance of some useful plants. **Journal of Economics and Sustainable Development**, v.2, n.1, 2010.

VASUDEVA, N. et al. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia*. **Pharmacognosy Reviews**, v.3, p.307-319, 2009.

VIÐARSDÓTTIR, U. S.; O'HIGGINS, P.; STRINGER, C. A geometric morphometric study of regional differences in the ontogeny of the modern human facial skeleton†. **Journal of Anatomy**, v. 201, n.3, p. 211-229, 2002.

VISCOSI, V. Geometric morphometrics and leaf phenotypic plasticity: assessing fluctuating asymmetry and allometry in European white oaks (*Quercus*). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 179, n.2, p. 335-348, 2015.

WEST, G. B.; BROWN, J. H.; ENQUIST, B. J. A General Model for the Origin of Allometric Scaling Laws. **Biology**. v. 276, p. 122–126, 1997.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 14-21, 2011.

ZHANG, A. et al. Simultaneous determination of 14 phenolic compounds in grape canes by HPLC-DAD-UV using wavelength switching detection. **Molecules**, v. 18, p.14241-14257, 2013.

ARTIGO 1

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, FOTOPROTETORA E INIBIÇÃO DA TIROSINASE EM EXTRATOS DE *Dalbergia ecastaphyllum*¹

¹ Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Acta Scientiarum. Agronomy, em versão na língua inglesa.

Atividade antioxidante, fotoprotetora e inibição da tirosinase em extratos de *Dalbergia ecastaphyllum*

Resumo: A *Dalbergia ecastaphyllum* é uma planta nativa com grande importância para a atividade apícola, sendo também utilizada em medicina tradicional. Pela primeira vez, os extratos desta planta foram avaliados quanto à presença de antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos e quanto à inibição da tirosinase, eliminação de radicais livres e efeito fotoprotetor. Foi determinada a atividade antioxidante pelos métodos de sequestro de radical livre (DPPH) e sistema β -caroteno/ácido linoléico. A atividade de inibição da tirosinase foi avaliada e calculado o EC50. A atividade fotoprotetora foi também determinada usando diferentes níveis de concentrações de extratos de *Dalbergia ecastaphyllum*. As amostras T3 e T5, apresentaram os teores mais elevados de fitoquímicos. O Fator de Proteção Solar (FPS) das amostras foi superior a 6, sendo a amostra T6 a que evidenciou um efeito fotoprotetor mais acentuado. A amostra T7 apresentou maior atividade antioxidante quantificada pelo método do DPPH e pelo método de descoloração do β -caroteno, com 92,41 % e 48,34%, respectivamente. Todas as amostras inibiram a enzima tirosinase, sendo a amostra T4 a mais eficaz ($124,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Verificou-se uma correlação significativa e negativa entre os flavonoides e a inibição da tirosinase. Os resultados gerais obtidos fornecem informações relevantes sobre a espécie e indicam o seu potencial para uso na indústria de cosmético e farmacêutica.

Palavras-chave: compostos bioativos, atividade antioxidante, inibição da tirosinase, efeito protetor.

Antioxidant activity, photoprotective and inhibition of tyrosinase from extracts of *Dalbergia ecastaphyllum*

Abstract: *Dalbergia ecastaphyllum* is a native plant with importance for beekeeping, and widely used in folk medicine. For the first time, the extracts of this plant were assessed for the presence of hydrophilic and lipophilic antioxidants, as well as inhibition of tyrosinase, free radicals scavenging and sunscreen protection. The antioxidant activity was evaluated by free radical scavenging (DPPH) and β -carotene bleaching assay. The tyrosinase inhibitory activity was evaluated and calculated the EC₅₀. The photoprotective activity was measured using different concentrations of *D. ecastaphyllum* extracts. The Sun Protection Factor (SPF) of the samples was higher than 6, and the sample T6 showed the most pronounced photoprotective effect. Sample T7 presented the highest antioxidant activity by free radical scavenging DPPH and β -carotene bleaching method, with 92.41% and 48.34%, respectively. All samples inhibited the tyrosinase, especially the sample T4 that was most effective (124.62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Significant negative correlation was found between flavonoid contents and inhibition of tyrosinase. The overall results provide relevant information about the specie, indicating as potential material to cosmetic and pharmaceutical industry.

Keywords: compound bioactive, antioxidant activity, inhibition of tyrosinase, protective effect.

Introdução

A formação de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico, com importantes funções biológicas (Barbosa et al., 2010). Por sua vez, quando são produzidos e acumulados em excesso no organismo ocasiona o estresse oxidativo, fenômeno capaz de induzir diversas doenças crônicas e degenerativas, assim como o processo de envelhecimento e algumas patologias agudas (trauma e acidente vascular cerebral) (Pham-Huy, He & Pham-Huy, 2008).

O controle da produção desses radicais pode ser determinado por diversos compostos antioxidantes, substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que atuam causando o bloqueio do seu efeito danoso. Assim, estudos que identifiquem recursos naturais capazes de atuar como agentes antioxidante são extremamente importantes. Visto que estes antioxidantes podem ter origem endógena ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes como os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides (Atoui et al., 2005; Sousa et al., 2007).

A determinação da propriedade antioxidante utiliza-se em procedimentos experimentais com aplicação de métodos espectrofotométricos, cromatográficos, de electroforese capilar e quimiluminescência, bem como eletroquímicos. Os mais aplicados são os métodos espectrofotométricos e os eletroquímicos. É importante destacar que uma só técnica não permite a avaliação de todos os compostos envolvidos no poder antioxidante de uma amostra complexa e, por isso, por espectrofotometria usam-se vários procedimentos (DPPH, por exemplo) de forma a medir diferentes características nas amostras.

Tirosinase é uma enzima multifuncional distribuída na natureza (bactéria, fungo, plantas e animais) (Aumeeruddy-Elalfi, Gurib-Fakim & Mahomoodally, 2016). A sua principal importância diz respeito a produção de melanina, um biopolímero heterogêneo que desempenha importante função de proteção contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta na pele humana, e é responsável pela cor da pele, olhos e cabelo (Passeron, Mantoux & Ortonne, 2005; Chang, 2009). Contudo, quando acumulada em excesso resulta em distúrbios de hiperpigmentação, como lentigo, nevo, sardas, manchas de idade, cloasma e melanoma (Kumar et al., 2011; Germanò et al., 2012). Para combater esse tipo de desordem são utilizados os chamados “

inibidores de tirosinase” como a hidroquinona, o ácido kójico e retinoides. No entanto, é relatado que estes inibidores causam efeitos adversos como citotoxicidade e mutagenicidade (Nerva et al., 2003; Ko et al., 2014).

Essa mesma enzima é reportada em estudo do Mal de Parkinson, uma progressiva doença neurodegenerativa caracterizada pela seletiva degeneração de dopamina. A Tirosinase quando produzida em excesso é capaz de aumentar a produção de dopamina intracelular, seguida da indução de formação de melanina, e assim causar a morte de células (Hasegawa, 2010). Isso, denota a importância de estudos que identifiquem materiais capazes de inibir a ação desta enzima.

A *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub é uma espécie botânica encontrada no Brasil que apresenta grande importância ecológica e econômica, principalmente no que diz respeito a pastagem apícola e produção de própolis vermelha. Esta planta contém isoflavonóides medicarpina e 3-hidróxi-8,9-dimetóxipterocarpna, mesmo constituintes presentes na própolis vermelha (Daugsch et al. 2008; Silva et al. 2008).

Neste trabalho, e pela primeira vez, os extratos hidroetanólicos de *D. ecastaphyllum* (L) Taub., provenientes do Brasil, foram investigados quanto ao conteúdo de fenóis totais, flavonoides, carotenoides e clorofilas, atividade antioxidante, fotoprotetora e inibição da enzima tirosinase.

Material e métodos

Material vegetal

Folhas de *Dalbergia ecastaphyllum* foram coletadas em sete municípios (Tabela1), pertencentes ao estado da Bahia, Brasil, no mês de outubro de 2014. Em seguida, foram secas em estufa de circulação de ar (40 °C) por 72 horas, trituradas em moinho de facas e armazenadas em frascos de policarbonato fechados, mantidos sob temperatura ambiente e protegidos da luz.

Preparação dos extratos

Para preparação dos extratos hidroetanólicos, 15 g de folhas de cada amostra foram macerados em etanol 70% na proporção de 1:10, sob agitação constante à

temperatura ambiente por 14 dias. Posteriormente, os extratos foram filtrados em papel filtro e rotaevaporados a 40° C até a evaporação total do solvente. Os extratos secos foram armazenados em tubos fechados e mantidos sob temperatura ambiente na ausência de luz.

Tab. 1: Dados geográficos de sete municípios de coleta de *Dalbergia ecastaphyllum* no estado da Bahia.

Amostra	Localidade	Coordenadas	
		Latitude	Longitude
T1	Itaparica	12° 53' 18" S	38° 40' 43" W
T2	Vera Cruz	13° 5' 60" S	38° 45' 00" W
T3	Nova Viçosa	17° 57'40.8" S	39°27'53.8" W
T4	Prado	17° 06'11.8" S	39°15'54.9" W
T5	Caravelas	17° 43'57.4" S	39°15'54.9" W
T6	Ilhéus	15° 40' 38" S	38° 56' 42" W
T7	Canavieiras	14° 47' 36" S	39° 2' 46" W

Determinação de fenóis e flavonoides

Os fenóis totais (FT) foram estimados com base em procedimentos descritos por Wolfe, Wu e Liu (2003) com algumas modificações. Uma alíquota de 0,5 mL de solução de extrato (0,2 mg/mL) foi misturada com o reagente Folin-Ciocalteu (2,5 mL, previamente diluído em água 1:10 v/v) e carbonato de sódio (75 g/L, 2 mL). Os tubos contendo a mistura foram agitados no vórtex durante 15 s, e deixaram-se repousar durante 30 min a 40°C para observação do desenvolvimento da cor. A absorbância foi então medida em espectrofotômetro (UV-Vís) a 765 nm. O ácido gálico foi utilizado para obter a curva padrão (0,15 – 0,93 µg/mL), e os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extrato.

Na quantificação de flavonoides (FLT), 0,5 mL da solução de extrato (0,5 mg/mL) foi misturada com água destilada (2 mL) e solução de NaNO₂ (5%, 0,15 mL), agitando-se a mistura no vórtex. Decorridos 6 min, adicionou-se uma solução de AlCl₃ (10%, 0,15 mL), agitou-se novamente e deixou-se repousar 6 min. Adicionou-se à

mistura uma solução de NaOH (4%, 2 mL) e água destilada até um volume final de 5 mL, deixando-se repousar por 15 minutos. A intensidade da coloração rosa foi medida a 510 nm (Zhishen, Mengcheng & Jianning, 1999). Utilizou-se quercetina para construir a curva padrão (0,03-0,26 mM) e os resultados foram expressos em mg equivalentes de quercetina por grama de extrato.

Determinação de carotenoides e clorofilas

Os compostos β -caroteno, licopeno e clorofilas *a* e *b* foram determinados de acordo com o método do Nagata e Yamashita (1992) com algumas modificações. As 150 mg de amostra pulverizada foram agitadas em 10 mL de acetona/hexano (4:6 v/v) no vórtex por 1 min e filtradas através de papel filtro. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 453, 505, 645 e 663 nm.

A quantificação foi realizada de acordo com as seguintes equações: β -caroteno (mg/100 mL) = $0,216 \times A_{663} - 1,220 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$; Licopeno (mg/100 mL) = $-0,0458 \times A_{663} + 0,204 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$; Clorofila *a* (mg/100 mL) = $0,999 \times A_{663} - 0,0989 \times A_{645}$; Clorofila *b* (mg/100 mL) = $-0,328 \times A_{663} + 1,77 \times A_{645}$. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa seca.

Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa seca.

Atividade antioxidante

Atividade de sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Este procedimento foi realizado seguindo o método descrito por Alencar et al. (2007). A 0,5 mL de extratos sob diferentes concentrações (6,4, 8, 16, 32, 48, 64 e 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) adicionaram-se 3 mL de etanol e 0,3 mL de uma solução etanólica contendo radicais DPPH (0,5 mM). Em seguida, a mistura foi deixada em repouso durante 60 min no escuro. A redução do radical DPPH foi determinada pela medição da absorbância a 517 nm. A atividade antioxidante foi calculada pela taxa de declínio da absorbância da solução de DPPH /amostras em relação à solução controle (DPPH em etanol), de acordo a equação: % Atividade antioxidante = $(1 - (\text{Abs}_{\text{amostra}}/\text{Abs}_{\text{controle}})) \times 100$, onde: $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é absorbância da solução de DPPH

(amostras) e Abs_{controle} é absorvância da solução controle (DPPH em etanol). A concentração ($\mu\text{g/mL}$) de extrato necessária para sequestrar 50% da concentração inicial de DPPH (EC50) foi calculada. Utilizou-se quercetina como controle positivo.

Autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Este ensaio foi realizado seguindo o método descrito por Ahn et al. (2004) com algumas modificações. Preparou-se uma solução de β -caroteno dissolvendo este composto (5 mg) em clorofórmio (25 mL). Transferiu-se 4 mL desta solução para um balão de fundo redondo e foram adicionados ácido linoleico (80 μL) e emulsionante Tween 20 (800 μL), em seguida, evaporou-se a 40 °C sob vácuo, para remoção do clorofórmio. Transferiram-se alíquotas (4,8 mL) desta emulsão para tubos de ensaio contendo 0,2 ml de extrato (80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Logo após a adição da emulsão, agitou-se e determinou-se o tempo zero de absorvância a 470 nm. Posteriormente foram incubados num banho a 55 °C durante 2 h. Após esse período determinou-se novamente a absorvância a 470 nm. Foi preparado um branco com o solvente de extração (etanol) em substituição a solução de extrato. A atividade antioxidante (AA) foi expressa pela porcentagem de inibição em relação ao controle (emulsão + etanol) após o período de 120 minutos de incubação de acordo a equação: $AA = (RDC_{\text{controle}} - RDA_{\text{mostra}}) / RDC_{\text{controle}} * 100$, onde $RDC_{\text{controle}} [= \ln(a/b) / 120]$ é a porcentagem de branqueamento do β -caroteno sem a presença do antioxidante, \ln é o logaritmo natural, a = absorvância no tempo 0, b = absorvância depois de 120 minutos e $DRA_{\text{mostra}} [= \ln(a/b) / 120]$ é a porcentagem de branqueamento do β -caroteno com a presença do antioxidante.

Inibição da enzima tirosinase

A atividade inibidora da tirosinase foi determinada de acordo com o método modificado de Chang et al. (2007). Uma alíquota de 20 μL de tirosinase (1000 U/mL em 50 mmol de solução tampão de fosfato, pH 6,8) foi misturada com 100 μL de extrato (dissolvido em DMSO) e 1,9 mL de 50 mmol de solução tampão de fosfato (pH 6,8). A mistura foi incubada a 25°C durante 5 min. Em seguida, foi adicionado 880 μL

de L-3,4-dihidroxiifenilalanina (L-DOPA) como substrato na mesma solução para iniciar a reação. O aumento da absorvância a 475 nm foi realizado em espectrofotômetro. Todas as reações foram realizadas em triplicata em microplacas de 96 poços, utilizando-VERSA Max (Molecular Devices, CA, EUA). Ácido kójico foi usado como um controle positivo. A atividade inibidora da tirosinase foi calculada utilizando a fórmula: $\text{Atividade inibidora da tirosinase\%} = [A0 - A1 / A0] \times 100$, onde A0 é a absorvância a 475 nm, com DMSO, no lugar da amostra e A1 é a absorvância a 475 nm com a amostra testada.

Atividade fotoprotetora *in vitro*

Determinação do comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$)

A determinação do comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) foi realizado seguindo o método descrito por Violante et al. (2009). Os extratos secos foram diluídos em etanol na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e realizada varredura em espectrofotômetro entre os comprimentos de onda de 260 a 400 nm.

Determinação *in vitro* do Fator de Proteção Solar (FPS)

Para determinação do fator de proteção solar (FPS), extratos secos foram diluídos em etanol (32, 48, 64, 80 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e realizada a leitura das absorvâncias entre os comprimentos de onda, 290 a 320 nm. O FPS médio foi calculado de acordo com a equação descrita por Mansur et al. (1986): $\text{FPS} = \text{FC} \cdot \sum \text{EE}(\lambda) \cdot 2 \cdot \text{I}(\lambda) \cdot \text{Abs}(\lambda)_{290}$, onde FC = fator de correção (igual a 10); EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ ; I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda λ ; Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorvância da solução da preparação no comprimento de onda (λ).

Análise estatística

Os ensaios relativos a cada uma das amostras foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em valores médios \pm desvio padrão (DP).

Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) considerando o delineamento inteiramente casualizado, e quando significativo, as médias dos tratamentos foram comparadas usando o teste Tukey ($p < 0,05$). Foram realizadas análises multivariadas: (i) análise de componentes principais (CPA) visando compreender melhor a relação entre as características compostos antioxidantes com a característica de inibição da enzima tirosinase; (ii) análise de correlação canônica (AVC) foi realizada como análise complementar para verificar as associações existentes entre os grupos de características X (compostos antioxidantes) com as características Y (métodos antioxidantes). Para as análises de CPA e AVC utilizaram-se a matriz de correlação fenotípica. Todas as análises foram realizadas utilizando-se programa R versão 3.3.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

Resultados e discussão

Carotenoides e clorofila

Os resultados dos teores de carotenoides e clorofilas obtidos estão apresentados na tabela 2. Os valores de β -caroteno variaram de $0,03 \pm 0,008$ a $0,14 \pm 0,009$ mg/100 g de massa seca. Os valores encontrados para licopeno foram maiores, variaram de $0,33 \pm 0,009$ a $0,50 \pm 0,011$ mg/100 g de massa seca. Os carotenoides são considerados pigmentos naturais que atuam na proteção contra o estresse oxidativo, e desta forma desempenham importante ação antioxidante (Fiedor & Burda, 2014). Dentre os compostos lipofílicos avaliados a clorofila *a* foi a que apresentou uma maior quantidade, com destaque à amostra T7, que teve uma média superior aos outros locais, com $0,97 \pm 0,018$ mg/100 g de massa seca. A mesma amostra foi a que também apresentou maior teor de clorofila *b*, $0,41 \pm 0,0016$ mg/100 g de massa seca, comparado as demais amostras.

Tabela 2. Composição de antioxidantes lipofílicos (mg/100 g de massa seca) de amostras de *Dalbergia ecastaphyllum*.

Localidades	β -caroteno	Licopeno	Clorofila a	Clorofila b
Itaparica	0,14 \pm 0,009a	0,41 \pm 0,002b	0,66 \pm 0,008 d	0,33 \pm 0,003bc
Vera Cruz	0,08 \pm 0,015b	0,35 \pm 0,006cd	0,58 \pm 0,010ef	0,28 \pm 0,028c
Nova Viçosa	0,08 \pm 0,008b	0,40 \pm 0,007b	0,72 \pm 0,017c	0,39 \pm 0,00ab
Prado	0,06 \pm 0,007cb	0,36 \pm 0,011c	0,61 \pm 0,021ed	0,35 \pm 0,016bc
Caravelas	0,14 \pm 0,005a	0,40 \pm 0,000b	0,54 \pm 0,016f	0,30 \pm 0,005c
Ilhéus	0,03 \pm 0,008c	0,33 \pm 0,009d	0,84 \pm 0,022b	0,39 \pm 0,031ab
Canavieiras	0,16 \pm 0,013a	0,50 \pm 0,011a	0,97 \pm 0,018a	0,41 \pm 0,016a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$).

Conteúdo fenólico e atividade antioxidante

Os resultados do conteúdo fenólico e EC50 estão apresentados na tabela 3. O FT entre as amostras apresentou diferença significativa, variando de 297,89 a 378,43 mg EAG/g extrato seco. As amostras T5 e T3 apresentaram as maiores concentrações, com $378,43 \pm 10,50$ e $377,17 \pm 10,50$ mg EAG/g extrato seco. Com relação ao TFL, a maior concentração foi observada para a amostra T6 com $28,59 \pm 2,10$ mg EQ/g extrato seco e a menor concentração para amostra T1 com $10,62 \pm 3,65$ mg EQ/g extrato seco. Os flavonoides são considerados antioxidantes hidrofílicos que atuam como agentes antimicrobianos, fotorreceptores e responsáveis por importantes funções nas plantas como pigmentação, proteção contra raios UV e defesa contra agentes patogênicos (Han, Zhang & Skibsted, 2012; Bubols et al., 2013).

Com relação a atividade antioxidante, a amostra de T7 revelou ter a maior capacidade, $28,04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, seguida de T5 com $30,17 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Tabela 3). Estas mesmas amostras também apresentaram valores superiores ao padrão quercetina, embora não tenham diferido estatisticamente. Para todas as amostras analisadas o valor de EC50 foram estatisticamente significativos.

A análise da atividade antioxidante das amostras por métodos diferentes, capacidade de sequestro de radicais livres DPPH e inibição da descoloração do β -caroteno, estão apresentados na figura 1. O método de capacidade de sequestro de radicais livres DPPH é o mais simples e utilizado para avaliação da atividade

antioxidante de extratos de planta (Subedi et al., 2014). O mecanismo do método é evidenciado pela descoloração do radical DPPH em função da doação de elétrons por compostos antioxidantes, responsáveis pela estabilização deste radical (Misra et al. 2015). Os resultados obtidos mostraram que as amostras investigadas por esse método apresentaram uma atividade antioxidante acima de 50 %, com uma variação de 79,98 a 95,21%, denotando o potencial antioxidante dos extratos de *D. ecastaphyllum*.

Um extrato que inibe ou retarda o processo oxidativo pode ser considerado um potencial sequestrador de radicais livres e antioxidante secundário (Lagha-Benamrouche & Madani, 2013), cuja capacidade antioxidante está estritamente relacionada com a sua composição química. Em ordem decrescente a atividade antioxidante das amostras é classificada da seguinte forma pelo método DPPH: T2 > T5 > T7 > T6 > T3 > T4 > T1.

A inibição da descoloração do β -caroteno é um método bioquímico baseado na descoloração do β -caroteno em função da sua redução com radicais formados pela oxidação da emulsão de ácido linoleico. Esse processo é diminuído na presença de agentes antioxidantes que atuam como doadores de átomos de hidrogênio aos radicais, desse modo prevenindo a descoloração do β -caroteno (Kaur & Geetha, 2006; Misra et al., 2015).

Tabela 3. Teor de fenois totais, flavonoides e EC50 da atividade sequestradora de radicais livres DPPH de extratos hidroetanólicos de *Dalbergia ecastaphyllum*.

Amostras	Fenois totais (mg EAG/g extrato seco)	Flavonoides totais (mg EQ/g extrato seco)	Atividade antioxidante EC 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
T1	297,89 \pm 4,54b	10,62 \pm 3,05c	46,99 \pm 0,82a
T2	336,55 \pm 7,57ab	13,22 \pm 0,55cb	35,85 \pm 0,90ab
T3	377,17 \pm 10,50a	19,51 \pm 0,32b	40,14 \pm 0,58ab
T4	302,24 \pm 7,08ab	16,37 \pm 3,25cb	33,86 \pm 1,21abc
T5	378,43 \pm 10,50a	18,96 \pm 3,15b	30,17 \pm 0,82bc
T6	337,11 \pm 3,62ab	28,59 \pm 2,10a	40,28 \pm 1,56ab
T7	351,26 \pm 3,85ab	13,04 \pm 3,25cb	28,04 \pm 0,56bc
Ác. Gálico			18,19 \pm 2,64c
Quercetina			33,90 \pm 1,06abc

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$).

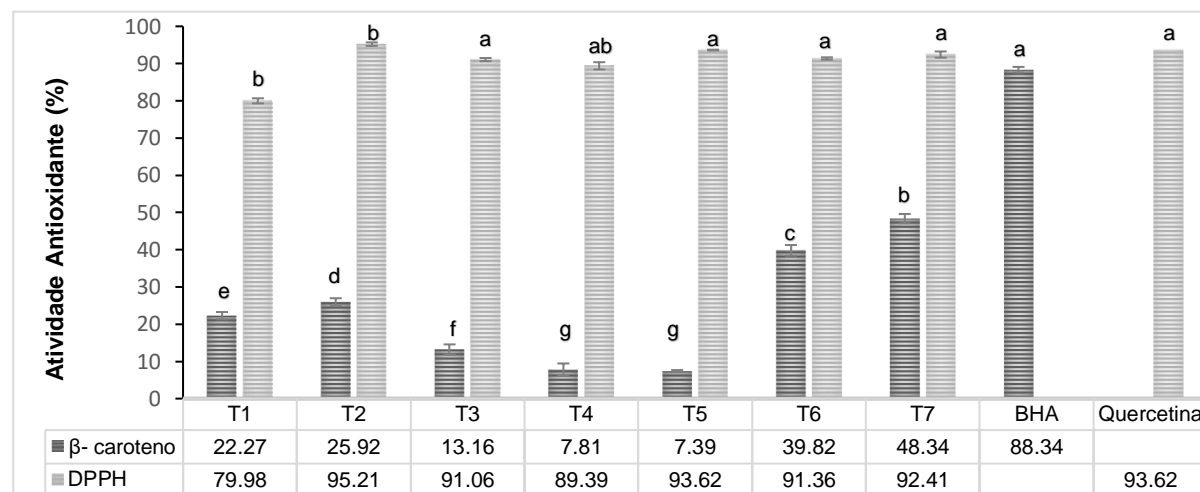


Figura 1. Atividade antioxidante de extratos hidroetanólicos (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de *Dalbergia ecastaphyllum* pelo método de capacidade de sequestro de radicais livres DPPH e inibição da descoloração do β -caroteno. Resultados estão expressos por média \pm desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si ($p < 0,05$).

Entre as amostras estudadas, T7 apresentou uma maior inibição, seguida de T6. Amostras de T1 e T2 apresentaram valores próximos e não diferiram estatisticamente, 22,27 e 25,92%. Os resultados podem ser representados em ordem de atividade antioxidante da seguinte maneira: T7 > T6 > T2 > T1 > T3 > T5 > T4.

Atividade inibidora da tirosinase

A enzima tirosinase amplamente distribuída em plantas e tecidos de animais é considerada elemento fundamental na síntese da melanina (Lima, et al., 2014). É capaz de converter a L-tirosina em L-DOPA e oxidar a L-DOPA para formação de dopacromo (Liang et al., 2014). Os resultados obtidos neste estudo mostram que os extratos hidroetanólicos de *Dalbergia ecastaphyllum* são capazes de inibir a atividade da enzima tirosinase (Tabela 4). A amostra T5 teve uma maior atividade inibitória, com 124,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, seguida de T4 com 147,88 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nenhum dos extratos avaliados foi superior a acarbose, cujo EC50 foi de 5,92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 4. Atividade inibitória da tirosinase de extratos hidroetanólicos de *Dalbergia ecastaphyllum*.

	Inibição da Tirosinase EC 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
T1	184,41 \pm 3,35c
T2	471,81 \pm 3,51a
T3	171,72 \pm 3,64d
T4	147,88 \pm 2,2e
T5	124,62 \pm 3,73f
T6	201,7 \pm 2,45b
T7	463,22 \pm 5,67a
Acarbose	5,92 \pm 0,28g

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$).

Atividade fotoprotetora

Dentre os compostos fenólicos presentes em espécies vegetais, os flavonoides têm sido amplamente estudado e são considerados como responsáveis por conferir proteção contra raios UV (Agati et al., 2012). Estes compostos apresentam dois picos de absorção entre os comprimentos de onda 240-280 e 300- 550 nm (Bobin, Raymond & Martini, 1995). No presente estudo verificou-se que não houve a formação dos dois

picos característicos em *Dalbergia ecastaphyllum*, onde o comprimento de onda máximo observado foi de 280 nm para todas as amostras avaliadas (Figura 2).

O FPS para todos extratos hidroetanólicos de *Dalbergia ecastaphyllum* avaliados encontram-se dentro do padrão exigido pela legislação brasileira, através da RDC Nº 30, 1º de junho de 2012, onde determina que um produto é considerado fotoprotetor quando este apresenta um FPS de no mínimo 6 (Anvisa, 2012). O FPS entre as amostras variou de 13,08 a 47,80 (Figura 3). Em todas amostras foi possível observar que mesmo na menor concentração (32 µg/mL), os valores encontrados foram superiores ao exigido pela legislação. Ao comparar esses resultados com os encontrados em alguns estudos realizados em outras espécies vegetais é possível observar que a *Dalbergia ecastaphyllum* apresenta um maior FPS. Em extratos hidroetanólicos de *Marcetia taxifolia* a 100 µg/mL, Costa et al. (2015) observaram um FPS menor que 10. Oliveira et al. (2013) verificaram um FPS abaixo de 8 em extrato etanólico de *Encholirium spectabile* a 100 mg/mL. E Gupta et al. (2016) determinaram um FPS de 7.39 em extrato hexano de *Potentilla atrosanguinea* a 120 µg/mL.

Os resultados apresentados nesse estudo evidenciam a propriedade fotoprotetora dos extratos de *Dalbergia ecastaphyllum* e o seu potencial para uso na formulação de produtos fotoprotetores.

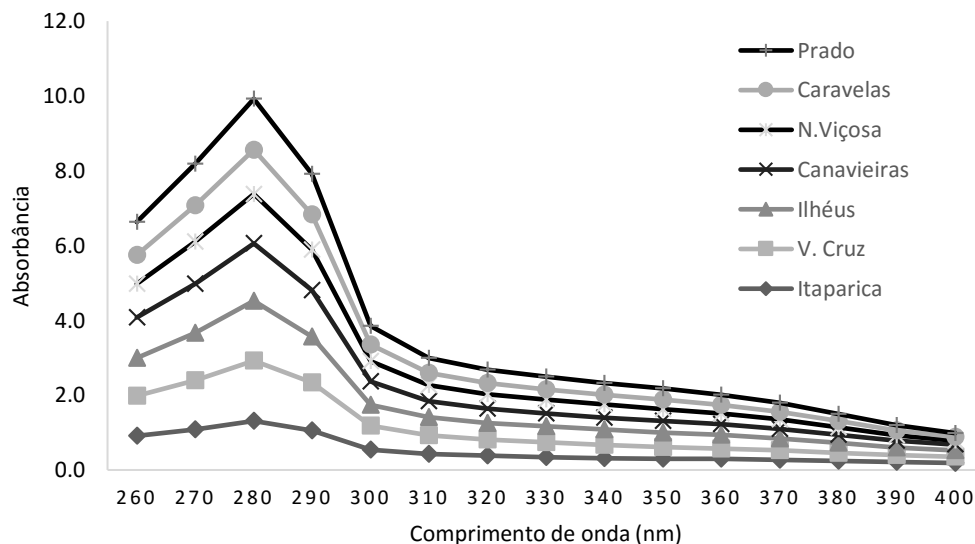


Figura 2. Espectro da absorção de raio UV (260 a 400 nm) de extrato de *Dalbergia ecastaphyllum* (1000 µg.mL⁻¹).

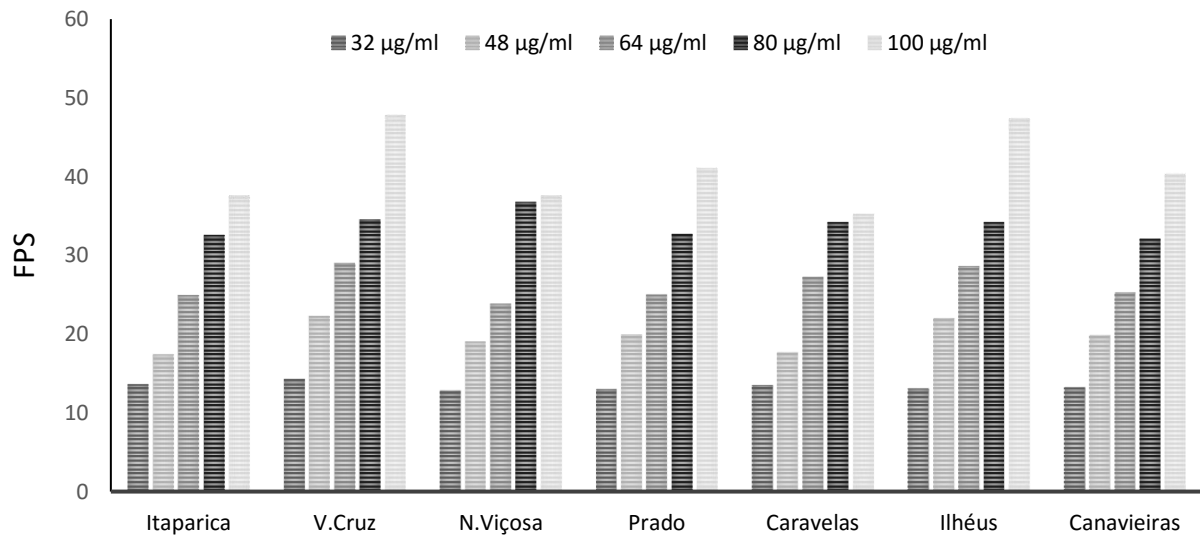


Figura 3. Fator de proteção solar (FPS) de extratos de *Dalbergia ecastaphyllum*.

Análise multivariada

Matriz de correlação e respectivos valores de significância estão apresentados na Tabela 5. Os valores apresentados mostram que existe uma correlação entre β -caroteno e licopeno, ($r= 0,79$), o que não é surpreendente, visto que ambos são hidrocarbonetos constituintes dos carotenoides antioxidantes. Assim como a clorofila *a* e *b* que apresentaram uma alta correlação ($r= 0,84$), ambas são pigmentos fotossintéticos. Houve uma correlação entre β -caroteno e flavonoides ($r= -59$), isso mostra que o aumento no conteúdo de um desses compostos diminui o conteúdo do outro. Uma correlação significativa foi observada para flavonoides e atividade inibidora da tirosinase ($r= -75$), demonstrando a importância deste constituinte para essa atividade biológica.

Análise de componentes principais das variáveis (compostos lipofílicos, hidrofílicos e atividade inibidora da enzima tirosinase) foi realizada a fim de melhor compreender a correlação do conjunto de dados avaliados (Figuras 4a e 4b). Os dois primeiros componentes principais (PCs) descrevem 67,57 % do total da variação. Esses PCs mostram a correlação entre os parâmetros avaliados (Figura 4a). β -caroteno, licopeno, clorofila *a* e *b* foram caracterizadas pelo CP1, com uma significativa correlação entre os carotenoides e a atividade inibidora da tirosinase. Os

flavonoides e o teor de fenóis foram as variáveis que melhor contribuíram para o CP2 (28,7%).

A dispersão das amostras em função dos escores dos PCs estão representados na Figura 4b. Há uma formação evidente de grupos em função da similaridade entre estes. As amostras T7 são caracterizadas pela maior quantidade de licopeno. As amostras T1, T2, T3, T4 e T5 foram caracterizadas pelo teor de fenóis totais, principalmente T3, que também se caracteriza pelo alto teor de flavonoides e formou um grupo específico.

É importante destacar que nessas amostras os teores de compostos hidrofílicos são inferiores às demais. A amostra T6 formaram um único grupo em função do alto teor de flavonoides presente na composição dos seus extratos. Os resultados encontrados nesta análise estão de acordo aos apresentados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 5. Correlação entre as variáveis da análise multivariada.

Variáveis	BET	LIC	CLA	CLO	FEN	FLAV	TIR
BET	1,00						
LIC	0,79*	1,00					
CLA	0,09	0,55	1,00				
CLO	0,01	0,46	0,84*	1,00			
FEN	0,21	0,22	0,09	0,13	1,00		
FLAV	-0,59*	-0,45	0,19	0,28	0,30	1,00	
TIR	0,20	0,32	0,39	0,11	-0,39	-0,75*	1,00

CLA= clorofila *a*; clorofila *b*; LIC= licopeno; BET= β -caroteno; FEN= fenóis totais; FLAV= flavonoides; TIR= inibição da enzima tirosinase.

* significância ($p < 0,05$)

Análise de correlação canônica foi realizada a fim de verificar qual a relação entre os compostos fenólicos com os métodos de avaliação de atividade antioxidante empregados. Este procedimento permite determinar a força das relações existentes entre dois conjuntos de dados e obter os pesos canônicos a partir da combinação linear entre estes conjuntos (Shin & Lee, 2015).

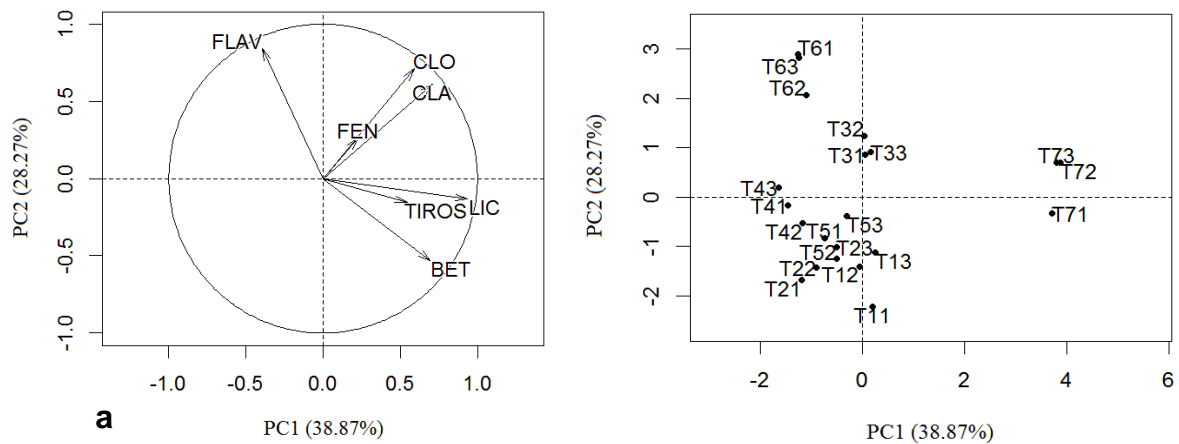


Figura 4. Correlação do conjunto de dados (a) e escore dos componentes principais (b) da atividade inibidora da tirosinase (TIROS) e conteúdo fenólico (CLA= clorofila a; clorofila b; LIC= licopeno; BET= β -caroteno; FEN= fenóis totais; FLAV= flavonoides) de extratos hidroetanólicos de *Dalbergia ecastaphyllum* (T1= Itaparica; T2= V. Cruz; T3= N. Viçosa; T4= Prado; T5= Caravelas; T6= Ilhéus e T7= Canavieiras).

Ao analisar o resultado apresentado na Figura 5, é possível observar que as variáveis canônicas 1 e 2 (Can 1 e Can 2) explicam 99,7% do total da variação encontrada, onde Can 1 representa 86,5% desta variação e mostra que há uma maior relação dos compostos hidrofílicos com o método de inibição da descoloração do β -caroteno. Nota-se também que há uma considerável relação entre o método e o teor de flavonoides.

A Can 2 explica 13,5% da variação, e é determinada principalmente pelo método DPPH, onde se pode inferir que o teor de fenóis totais responde pela atividade antioxidante. Há uma relação com flavonoides, porém não tão alta quando comparada aos compostos hidrofílicos com o outro método. Esse resultado mostra que existem substâncias presentes em *Dalbergia ecastaphyllum* que não foram identificadas no presente estudo, mas que respondem pela ação antioxidante dos extratos.

As correlações canônicas e os pares canônicos estimados entre as características X (compostos antioxidantes) e Y (métodos antioxidantes) em *D. ecastaphyllum* estão representados na Tabela 6. Todas as correlações canônicas foram estatisticamente significativas. Isso mostra que as características X e Y são altamente correlacionadas, com pares canônicos (r) de 0,95 e 0,75. Analisando as variáveis no primeiro par canônico, houve uma predominância do método de inibição da descoloração do β -caroteno, enquanto no segundo par canônico há um destaque para o método do DPPH. A proporção de variância comum para as duas variáveis

canônicas, que é dada pelo coeficiente de correlação canônica ao quadrado (r^2), no primeiro e segundo par canônico foi de 90 % e 56%, respectivamente.

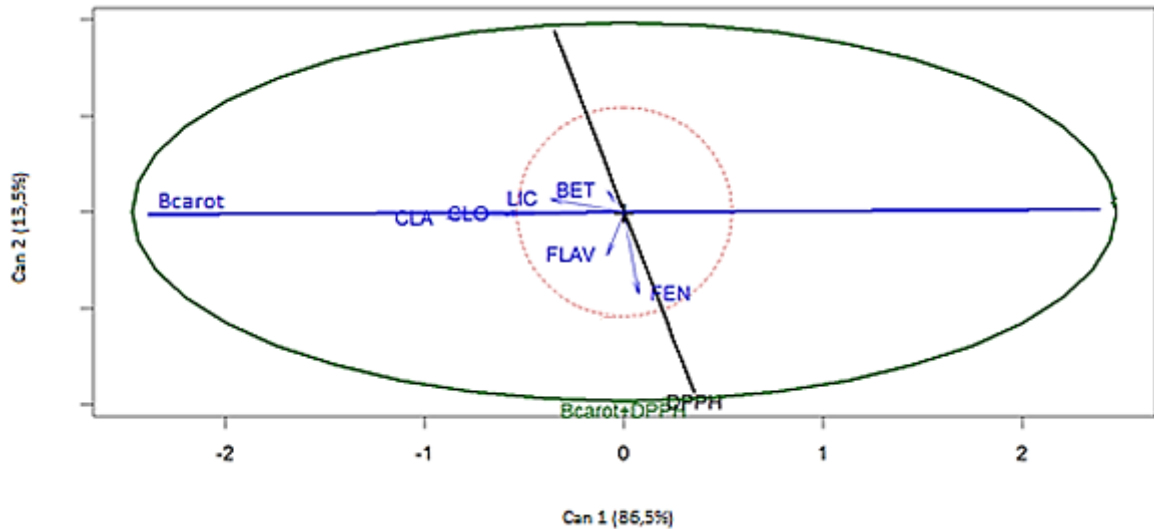


Figura 5. Análise de correlação canônica de compostos fenólicos e métodos de determinação de atividade antioxidante. CLA= clorofila *a*; clorofila *b*; LIC= licopeno; BET= β -caroteno; FEN= fenóis totais; FLAV= flavonoides; Bcarot= inibição de descoloração do β -caroteno e DPPH= sequestro de radicais livres DPPH.

Tabela 6. Correlações canônicas estimadas entre as características X (compostos antioxidantes) e Y (métodos antioxidantes).

Variáveis	Pares Canônicos	
	1 ^o	2 ^o
BET	-0,08	0,17
LIC	-0,35	0,10
CLA	-0,85	-0,05
CLO	-0,58	-0,01
FEN	0,07	-0,64
FLAV	-0,08	-0,34
Bcarot	-0,93	-0,11
DPPH	0,01	-0,75
R	0,95	0,75
F	7,81**	3,61*
r^2	0,90	0,56
A	0,0000067	0,0262620

CLA= clorofila *a*; clorofila *b*; LIC= licopeno; BET= β -caroteno; FEN= fenóis totais; FLAV= flavonoides; Bcarot= inibição de descoloração do β -caroteno e DPPH= sequestro de radicais livres DPPH.

** significativo a 1% ($p < 0,05$)

* significativo a 5% ($p < 0,05$)

Conclusão

Os extratos de *Dalbergia ecastaphyllum* apresentaram um elevado conteúdo de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos e pronunciada capacidade antioxidante, avaliada pelos ensaios do DPPH e inibição da descoloração do β -caroteno. Todas as amostras inibiram a enzima tirosinase e evidenciaram bom efeito protetor sugerindo a possível utilização destes extratos na proteção contra as radiações ultravioletas.

Este é o primeiro estudo que fornece informações relevantes sobre os fitoquímicos presentes nesta espécie e indica o seu potencial para uso nas indústrias de cosméticos e farmacêutica. No entanto, é necessário efetuar estudos adicionais onde sejam identificados os constituintes químicos da planta, mecanismos de ação e interação entre eles.

Referências

- Agati. G., Azzarello. E., Pollastri. S., & Tattini. M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*. 196. 67–76.
- Ahn. M. R., Kumazawa. S., Hamasaka. T., Bang. K. S., & Nakayama. T. (2004). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(24). 7286-7292.
- Anvisa. 2012. Resolução RDC n. 30 de 1º de junho de 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União. Brasília. DF.
- Atoui. A. K., Mansouri. A., Boskou. G., & Kefalas. P. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chemistry*. 89(1). 27-36.
- Aumeeruddy-Elalfi. Z., Gurib-Fakim. A., & Mahomoodally. M. F. (2016). Kinetic studies of tyrosinase inhibitory activity of 19 essential oils extracted from endemic and exotic medicinal plants. *South African Journal of Botany*. 103. 89–94.

- Barbosa. K. B. F.. Costa. N. M. B.. Alfenas. R. D. C. G.. De Paula. S. O.. Minim. V. P. R.. & Bressan. J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. nutr.* 23(4). 629-643.
- Bobin. M. F.. Raymond. M.. & Martini. M. C. (1995). Propriedades de absorção UVA/UVB de produtos naturais. *Cosmet Toil (edição em português)*. 7. 44-50.
- Bubols. G. B.. Vianna. D. D. R.. Medina-Rejon. A.. von Poser. G.. Lamuela-Raventos. R. M.. Eifler-Lima. V. L.. & Garcia. S. C. (2013). The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 13(3). 318–34.
- Chang. T. S.. Ding. H. Y.. Tai. S. S. K.. & Wu. C. Y. (2007). Mushroom tyrosinase inhibitory effects of isoflavones isolated from soygerm koji fermented with *Aspergillus oryzae* BCRC 32288. *Food Chemistry*. 105(4). 1430–1438.
- Chang. T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International journal of molecular sciences*. 10(6). 2440-2475.
- Costa. S. C. C.. Detoni. C. B.. Branco. C. R. C.. Botura. M. B.. & Branco. A. (2015). In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 25(4).
- da Silva Frozza. C. O.. Garcia. C. S. C.. Gambato. G.. de Souza. M. D. O.. Salvador. M.. Moura. S.. ... Roesch-Ely. M. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*. 52. 137–142.
- Daugusch. A.. Moraes. C. S.. Fort. P.. & Park. Y. K. (2008). Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 5(4). 435-441.

- De Oliveira. R. G.. Souza. G. R.. Guimarães. A. L.. De Oliveira. A. P.. Silva Morais. A. C.. Da Cruz Araújo. E. C.. ... Almeida. J. R. G. D. S. (2013). Dried extracts of *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae) present antioxidant and photoprotective activities in vitro. *Journal of Young Pharmacists*. 5(3). 102–105.
- Fiedor. J.. & Burda. K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*. 6(2). 466–488.
- G. Agati. E. Azzarello. S. Pollastri. M. Tattini. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci*. 196 (2012) 67e76.
- Germanò. M. P.. Cacciola. F.. Donato. P.. Dugo. P.. Certo. G.. D'angelo. V.. ... & Rapisarda. A. (2012). *Betula pendula* leaves: Polyphenolic characterization and potential innovative use in skin whitening products. *Fitoterapia*. 83(5). 877-882.
- Gupta. V. K.. Kaur. R.. Singla. R.. & Jaitak. V. (2016). Photoprotective. antioxidant screening and new ester from dry root extracts of *Potentilla atrosanguinea* (Himalayan cinquefoil). *South African Journal of Botany*. 103. 49–53.
- Gupta. V. K.. Kaur. R.. Singla. R.. & Jaitak. V. (2016). Photoprotective. antioxidant screening and new ester from dry root extracts of *Potentilla atrosanguinea* (Himalayan cinquefoil). *South African Journal of Botany*. 103. 49–53.
- Han. R. M.. Zhang. J. P.. & Skibsted. L. H. (2012). Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants. *Molecules*. 17(2). 2140–2160.
- Hasegawa. T. (2010). Tyrosinase-expressing neuronal cell line as in vitro model of Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*. 11(3). 1082-1089.
- Kaur. I. P.. & Geetha. T. (2006). Screening methods for antioxidants-a review. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 6(3). 305-312.

- Zhishen. J.. Mengcheng. T.. & Jianming. W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*. 64(4). 555-559.
- Ko. H. H.. Chiang. Y. C.. Tsai. M. H.. Liang. C. J.. Hsu. L. F.. Li. S. Y.. ... & Lee. C. W. (2014). Eupafolin, a skin whitening flavonoid isolated from *Phyllanthus nodiflorus*, downregulated melanogenesis: Role of MAPK and Akt pathways. *Journal of ethnopharmacology*. 151(1). 386-393.
- Kumar. C. M.. Sathisha. U. V.. Dharmesh. S.. Rao. A. A.. & Singh. S. A. (2011). Interaction of sesamol (3, 4-methylenedioxyphenol) with tyrosinase and its effect on melanin synthesis. *Biochimie*. 93(3). 562-569.
- Lagha-Benamrouche. S.. & Madani. K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*. 50. 723–730.
- Liang. C. P.. Chang. C. H.. Liang. C. C.. Hung. K. Y.. & Hsieh. C. W. (2014). In vitro Antioxidant activities, free Radical Scavenging Capacity, and Tyrosinase inhibitory of Flavonoid compounds and Ferulic Acid from *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames. *Molecules*. 19(4). 4681–4694.
- Lima. C. R.. Silva. J. R. A. de Tássia Carvalho Cardoso. E.. Silva. E. O.. Lameira. J. do Nascimento. J. L. M.. ... Alves. C. N. (2014). Combined kinetic studies and computational analysis on kojic Acid analogous as tyrosinase inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 19(7). 9591–605.
- Mansur. J. D. S.. Breder. M. N. R.. Mansur. M. C. D. A.. & Azulay. R. D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.* 61(3). 121-4.

- Misra. A.. Srivastava. S.. Verma. S.. & Rawat. A. K. S. (2015). Nutritional evaluation. antioxidant studies and quantification of poly phenolics. in *Roscoeia purpurea* tubers. *BMC Research Notes*. 8(1). 324.
- Aumeeruddy-Elalfi, Z.. Gurib-Fakim, A. & Mahomoodally, M. F. (2016). Kinetic studies of tyrosinase inhibitory activity of 19 essential oils extracted from endemic and exotic medicinal plants. *South African Journal of Botany*. 103. 89-94.
- Nerya. O.. Vaya. J.. Musa. R.. Izrael. S.. Ben-Arie. R.. & Tamir. S. (2003). Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *Journal of agricultural and food chemistry*. 51(5). 1201-1207.
- Passeron. T.. Mantoux. F.. & Ortonne. J. P. (2005). Genetic disorders of pigmentation. *Clinics in dermatology*. 23(1). 56-67.
- Pham-Huy. L. A.. He. H.. & Pham-Huy. C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 4(2). 89-96.
- Shin, H., & Lee, S. (2015). Canonical correlation analysis for irregularly and sparsely observed functional data. *Journal of Multivariate Analysis*, 134, 1-18.
- Silva. B. B.. Rosalen. P. L.. Cury. J. A.. Ikegaki. M.. Souza. V. C.. Esteves. A.. & Alencar. S. M. (2008). Chemical composition and botanical origin of red propolis. a new type of Brazilian propolis. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 5(3). 313-316.
- Sousa. C. D. M.. Silva. H. R.. Vieira-Jr. G. M.. Ayres. M. C. C.. Costa. C. D.. Araújo. D. S.. ... & Chaves. M. H. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*. 30(2). 351-355.

- Subedi. L.. Timalsena. S.. Duwadi. P.. Thapa. R.. Paudel. A.. & Parajuli. K. (2014). Antioxidant activity and phenol and flavonoid contents of eight medicinal plants from Western Nepal. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 34(5). 584–590.
- Team, R. C. (2016). R: A language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013. Disponível em: <http://www.r-project.org>.
- Violante. I. M. P.. Souza. I. M.. Venturini. C. L.. Ramalho. A. F. S.. Santos. R. A. N.. & Ferrari. M. (2009). Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 19(2 A). 452–457.
- Wolfe. K.. Wu. X.. Liu. R.H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51. 609-614.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4), 555-559.

ARTIGO 2

MORFOMETRIA GEOMÉTRICA FOLIAR ENTRE POPULAÇÕES DE *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) TAUB. DO BRASIL¹

¹ Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Journal of Applied Botany and Food Quality, em versão na língua inglesa.

Morfometria geométrica foliar entre populações de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. do Brasil

Resumo: As folhas são estruturas presentes nas plantas que expressam importantes características de acordo com o ambiente no qual estão inseridas. Ao longo dos anos, a sua caracterização tem permitido identificar espécies vegetais e correlacionar o efeito de fatores abióticos como gases, luz, temperatura e herbivoria sob o seu desenvolvimento. O objetivo dessa investigação é caracterizar populações de *Dalbergia ecastaphyllum* do Brasil utilizando a morfometria geométrica para analisar a forma de foliar. Foram avaliadas 200 folhas de quatro populações desta espécie. Os quatro primeiros componentes principais explicaram 97,81% da variação pela análise de componentes principais. Houve significância entre as amostras através da análise de NPMANOVA ($p= 0,0001$). Os resultados do teste de Mentel mostraram que não houve correlação das distâncias geográficas com a forma. Na análise de variação canônica, as duas primeiras variáveis responderam por 96,77 % da variação total e no teste de validação cruzada a média encontrada foi de 83,33%. As folhas desta espécie são elípticas e ovadas.

Palavras chaves: forma, Fabaceae, variação morfométrica.

Geometric Morphometrics of leaf between populations of *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. from Brazil.

Abstract: Leaves are structures in plants that express important features according to the environment where they are inserted. Over the years, leaf characterization has allowed to identify plant species and correlate the effect of abiotic factors such as gases, light, temperature and herbivory under its development. The objective of this research was to characterize populations of *Dalbergia ecastaphyllum* of Brazil using the geometric morphometry to analyze the leaf shape. We evaluated 200 leaves of four populations of this species. The first four principal components explained 97.81% of variation by principal component analysis (PCA). There was significance among the samples through the analysis of NPMANOVA ($p = 0.0001$). The results of the Mentel test showed no correlation of geographical distances with the leaf shapes. In the analysis of canonical variance, the first two variables accounted for 96.77% of the total variation, and in the cross-validation test, the average was 83.33%. The leaves of this species are elliptic and oval.

Keywords: shape, Fabaceae, morphometric variation.

Introdução

Dalbergia ecastaphyllum (Fabaceae), é uma espécie nativa do Brasil, com registros ao longo da costa leste do continente americano e na costa ocidental da África (CARVALHO, 1997; OLIVEIRA e CORTEZ, 2015). No Brasil ocorre desde a Amazônia, na região norte, até a Mata Atlântica, na região sul do país (LIMA, 2014).

Popularmente conhecida por rabo-de-bugio, é considerada por alguns autores como uma planta típica de mangue ou de áreas alagáveis (CARVALHO, 1997; REYS e CANTILLO, 2003), que pode ser encontrada em solos arenosos, auxiliando no processo de estabilização da areia e na fixação de dunas (GUTTLER, 2007). O hábito vegetativo também é bastante variável, é escandente ou semi-prostrada quando se desenvolve em ambientes alagáveis, ou de arbustivo a arvoreta, quando cresce sobre dunas de areia (CARVALHO, 1997; REYS e CANTILLO, 2003; MARQUES, 2005).

O padrão de desenvolvimento da *D. ecastaphyllum* é bastante variável nos habitats em que predomina. BOEGER et al. (2008) ressaltam que os fatores ambientais afetam comumente a estrutura das plantas e que as modificações decorrentes desta interação são expressas na sua morfologia e anatomia. Denotando a importância dos estudos de caracterização e relação com o meio em que vivem.

A *D. ecastaphyllum* é considerada a origem botânica da própolis vermelha do Nordeste, substância resinosa muito rica em compostos fenólicos, que desempenha atividades antimicrobianas, antioxidantes e antitumorais (CASTRO et al., 2009; FROZZA et al., 2013). O que tem impulsionando cada vez mais as pesquisas relacionadas a sua bioprospecção.

Dentre as estruturas existentes nas plantas, as folhas são as que melhor expressam o efeito do ambiente sob o seu desenvolvimento. Por isso, caracteriza-las é um processo extremamente importante tanto para a sua identificação e utilização, quanto para a compreensão das suas relações com o meio em que estão inseridas (PIRES et al., 2015). Principalmente, quando se refere a *D. ecastaphyllum*, visto que é uma espécie cuja principal forma de reconhecimento em campo é por meio das suas estruturas foliares.

Uma das ferramentas possíveis de avaliar modificações em folhas é a morfometria geométrica, que consiste na análise das posições relativas de marcos

anatômicos e conjuntos de pontos usados para aproximar (curvas) superfícies e para quantificar o tamanho e forma. É uma técnica que permite estudar diretamente a forma do objeto, que se dá por meio da visualização de uma grade de deformação, permitindo a descrição das diferenças entre formas, bem como estimar a matriz de variância-covariância entre características particulares (BOOKSTEIN, 1991; DRYDEN e MARDIA, 1998).

Apesar da *D. ecastaphyllum* exercer uma importância ecológica no ambiente, ainda são limitados os estudos que relacionem a influência do meio ambiente com os seus aspectos morfológicos. O objetivo dessa investigação foi caracterizar a *Dalbergia ecastaphyllum* utilizando a morfometria geométrica para analisar a forma de foliar.

Material e Métodos

Área de estudo e populações

Foram amostradas quatro populações de *D. ecastaphyllum* localizadas na região litorânea do estado da Bahia, distribuídas à beira de praias, rios, mangues e apicuns, distantes da zona urbana. Estas situam-se em dois territórios: região Metropolitana de Salvador (municípios de Vera Cruz e Itaparica) e Litoral Sul (municípios de Ilhéus e Canavieiras) (Tab. 1). Essas regiões caracterizam-se por estarem inseridas no bioma da Mata Atlântica e formarem ecossistemas variados (MDA, 2010).

A região Metropolitana de Salvador apresenta clima quente e úmido com temperatura média anual de 25° C. É onde está localizada a Baía de Todos os Santos, segunda maior baía do mundo, conferindo importância turística e ambiental para a região.

O Litoral Sul apresenta regime pluviométrico com chuvas regulares durante todo o ano. As temperaturas médias variam de 22 e 25°C, com clima úmido a subúmido. O território possui importantes sistemas de manguezais e restingas, que recebem influência marítima e apresentam solos arenosos e de baixa fertilidade, criando condições especiais para a formação de um ecossistema ideal ao desenvolvimento de muitas espécies (MDA, 2010).

Tab. 1: Dados geográficos de quatro municípios de coleta de *Dalbergia ecastaphyllum* no estado da Bahia.

Localidade	Território	Coordenadas	
		Latitude	Longitude
Itaparica	Metropolitana	12° 53' 18" S	38° 40' 43" W
Vera Cruz	Metropolitana	13° 5' 60" S	38° 45' 00" W
Canavieiras	Litoral Sul	14° 47' 36" S	39° 2' 46" W
Ilhéus	Litoral Sul	15° 40' 38" S	38° 56' 42" W

Coleta das folhas

Para cada população de *D. ecastaphyllum* foram coletados 50 folíolos intactos, sem incidência de ataques de pragas e doenças ou danificados pelo vento. Todos eles foram coletados na região do terço médio dos ramos caulinares, com uma distância de aproximadamente 5 metros entre plantas, essa distância foi estabelecida como parâmetro afim de diminuir a possibilidade de repetir a amostragem em um mesmo indivíduo. Exsicatas foram identificadas e depositadas no herbário HURB da UFRB (Universidade Federal do Recôncavo da Bahia).

Preparo das amostras

As folhas foram digitalizadas com escala em scanner HP Deskjet F2050. As digitalizações foram feitas a partir da superfície abaxial das folhas, conforme metodologia proposta por Vieira et al. (2014). Em seguida, as imagens foram convertidas em formato "TPS" utilizando o software TPS-Útil (ROHFL, 2010).

Após as conversões foram definidos os marcos anatômicos das 200 imagens por meio do software TPS-Dig2 (ROHFL, 2010). Foram utilizados um total de 16 marcos e semimarcos anatômicos para realizar as análises morfométricas (Fig. 1). A escolha desses marcos foi baseada na posição da nervura principal e secundária das folhas, seguindo o mesmo padrão de metodologia realizada por VIEIRA et al. (2014).



Fig. 1: Disposição dos marcos anatômicos (1-2) e semimarcos (3-16) em folíolo de *Dalbergia ecastaphyllum*.

Os marcos 1 e 2 representam posição da nervura principal que segue um padrão de fácil identificação. Um marco anatômico deve ter na sua localização uma característica homóloga possível de ser reconhecida em cada amostra em estudo (WEBSTER e SHEETS, 2010). Os demais são semimarcos: os 3-4, 7-8, 9-10 e 13-14, representam as variações na região distal e proximal da borda foliar em relação ao pecíolo, seguindo como padrão a localização das nervuras secundárias, embora em algumas amostras isso não seja possível, pois esse número é variável. SILVA et al. (2012) ressaltam que a comparação de nervuras secundárias em folhas não é fácil quando não há estudos ontogênicos a respeito da espécie investigada. Os 5-6, 11-12 e 15-16 são semimarcos que determinam o ângulo de curvatura formado na região central da folha interceptando as nervuras secundárias.

A quantidade de semimarcos escolhidos para esse trabalho foi realizada de forma que representasse o máximo possível o folíolo de *D. ecastaphyllum* durante as medições morfométricas de forma. É importante destacar que o número de semimarcos a ser determinado em uma investigação depende da complexidade das curvas ou superfícies e da escala espacial do objeto em interesse (GUNZ e MITTEROECKER, 2013). O alinhamento dos semimarcos foi realizada no software TPS Relw (ROHFL, 2010).

Análises estatísticas

Foi realizada a análise de componentes principais (ACP), afim de verificar a variação total da forma das folhas de *D.ecastaphyllum* e obter as grades de deformação com tendências de variação para cada componente principal. Também foi realizada a análise de variação canônica (VCA) para determinar as diferenças significativas existentes entre as populações em estudo. A VCA determina se os grupos pré-definidos durante a análise podem ser distinguidos estatisticamente baseado em dados multivariados (WEBSTER e SHEETS, 2010). As análises foram realizadas no software MorphoJ (KLINGENBERG, 2011).

Foi determinada as significâncias estatísticas por meio da análise multivariada não paramétrica (NPMANOVA) e o teste de Mantel para avaliar a correlação entre populações, distâncias geográficas e altitudes utilizando o software PAST (HAMMER et al., 2001).

Resultados e discussão

Na análise de componentes principais das populações de *D. ecastaphyllum*, os quatro primeiros componentes explicaram 97,81% da variação da forma foliar entre as plantas das diferentes localidades. O componente principal (PC) 1 foi de 62,59 %, explicando mais da metade de toda a variação de forma existente. Esse componente representa modificações nas extremidades proximal e distal, com modificações na região distal quando é positivo, e região proximal quando negativo, conferindo forma ovada ao objeto (Fig. 2). A dominância de um componente significa que a maior parte das variações de forma estão concentradas em uma única dimensão e que mudanças de forma decorrentes de processos evolutivos ocorrerão nesta direção (VISCOSI, 2015).

O componente PC 2 responde por 21,97 % da variação e mostra uma contração da forma com maior direcionamento a modificações relacionadas a largura, conferindo forma elíptica quando em eixo negativo. Os PCs 3 e 4 (11,44 e 1,82 %) dizem respeito a padrões não assimétricos da forma. Valores positivos no PC3 tendem a uma

extensão na região apical. No PC4, valores positivos tendem a modificações mais acentuadas na região proximal (Fig.3)

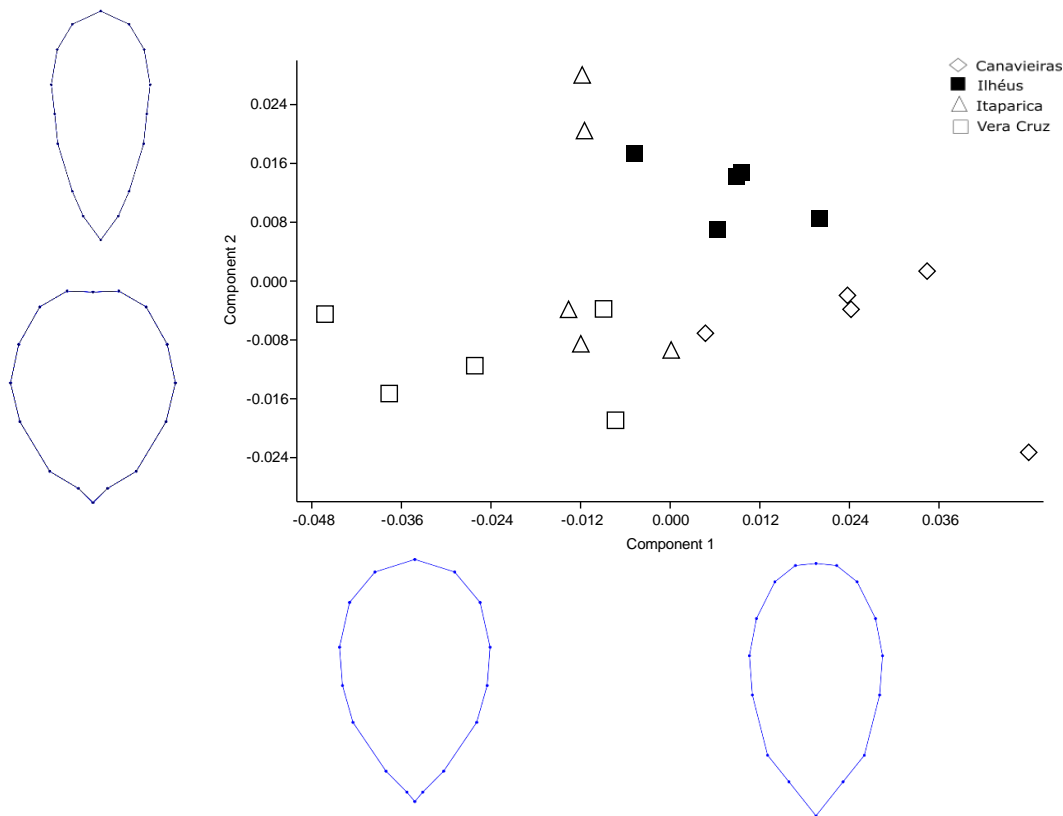


Fig. 2: Análise de componentes principais (CPA) de forma foliar de 4 populações de *Dalbergia ecastaphyllum*. Eixo dos componentes 1 e 2 (PC1 e PC2), usando uma matriz de coordenadas de marcos anatômicos alinhados pelo método de Procrustes e o desenho da mudança das formas das folhas.

Os resultados da análise de ACP mostraram que ocorreu uma separação natural dos indivíduos, com formação de alguns grupos isolados. A ACP é considerada um método capaz de reduzir uma grande quantidade de variáveis em poucas dimensões capazes de representar a maioria das variações do conjunto de dados analisados, e, também, um modo rápido e conveniente de exploração das informações. Embora não seja considerada um teste estatístico, a ACP é capaz de auxiliar na procura por algum tipo de ordenação nos dados sem a necessidade de um fator *a priori* para testar algum tipo de hipótese (MONTEIRO e REIS, 1999;

MITTEROECKER e GUNZ, 2009; WEBSTER e SHEETS, 2010; FORNEL e CORDEIRO-ESTRELA, 2012).

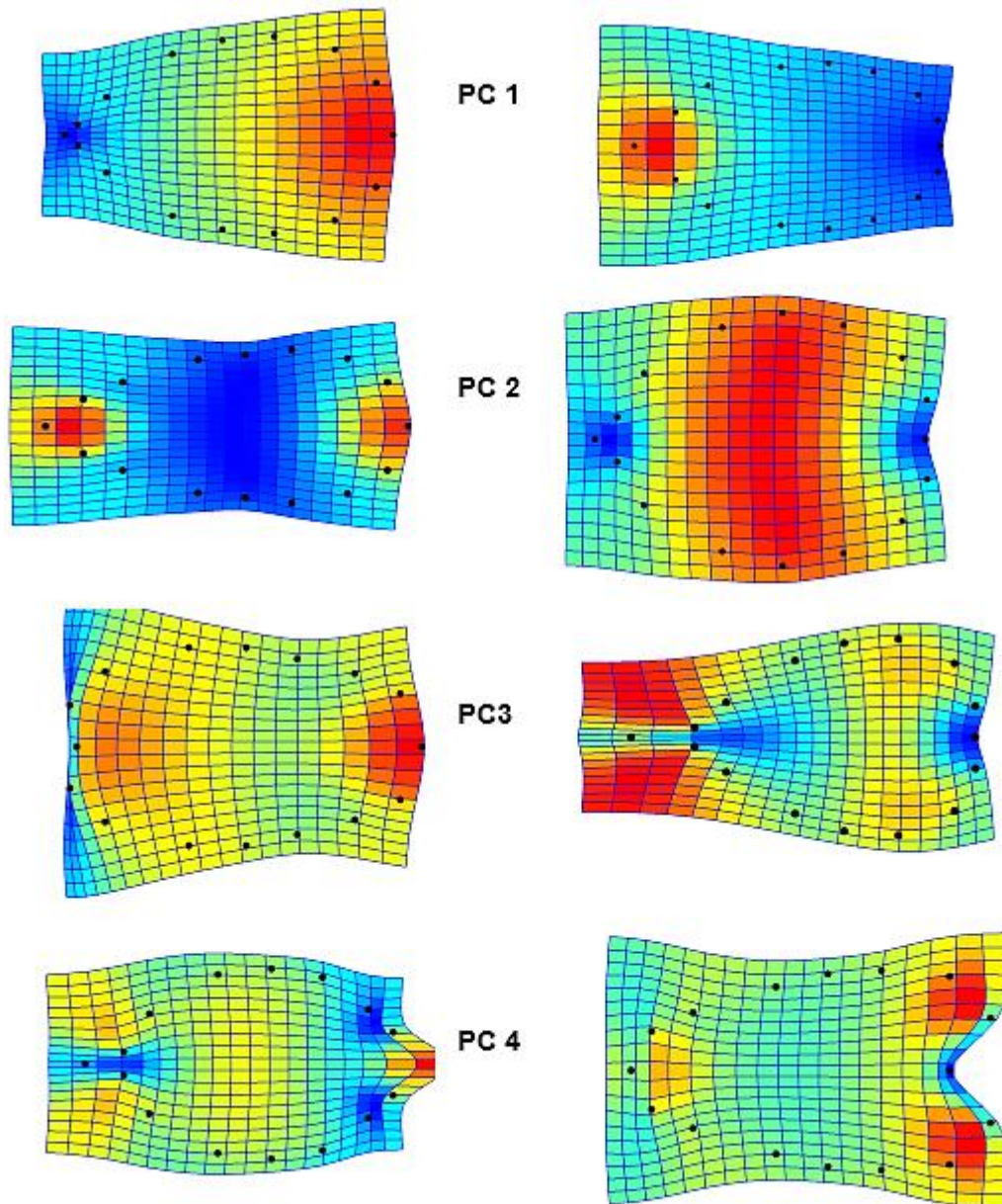


Fig. 3: Deformação de folhas de *Dalbergia ecastaphyllum* representadas por 4 componentes principais. Cor vermelha representa expansão, cor verde distorção e cor azul contração. Lado esquerdo corresponde a valores negativos nos PC e lado direito, valor positivo.

Os resultados da NPMANOVA mostram que houve uma significância entre as médias das populações analisadas utilizando a distância Euclidiana (Valor de permutação = 9,999, resultado total SS = 0,01639, SS dentro dos grupos = 0,006089,

$F = 9.023$, $P = 0.0001$), onde a população de Itaparica difere das populações de Canavieiras e Ilhéus, e Vera Cruz difere apenas da população de Ilhéus (Tab. 2). Mesmo estando em regiões diferentes, as populações de Vera Cruz e Canavieiras não se diferenciam estatisticamente, o que significa que os padrões de forma foliar apresentados nessas regiões se assemelham, um fato muito importante para a identificação da espécie em campo.

Vera Cruz e Itaparica estão sob mesmas condições edafoclimáticas e mesmo território de identidade, região Metropolitana de Salvador, além disso ambas estão delimitadas por áreas de beira de praia e principalmente manguezal, onde são facilmente encontradas. As populações de Ilhéus e Canavieiras estão no território do Litoral Sul, que embora pertençam ao mesmo bioma, Mata Atlântica, ambas se situam à beira de praias e áreas de apicuns. As diferenças existentes entre as populações podem estar relacionadas ao ambiente no qual estão localizadas, principalmente no que diz respeito a plasticidade fenotípica. De acordo com PALMER et al. (2012), a plasticidade resulta em diferenças características bastante notáveis nas espécies vegetais.

Em estudo realizado com *Sagittaria* (Alismataceae), HUANG e LIU (2014) afirmam que a variação de forma e as diferenças interespecíficas observadas estão relacionadas às condições ambientais. VISCOSI (2015) relata que as características simétricas das folhas de *Quercus frainetto* Ten., *Q. petraea* (Matt.) Liebl e *Q. pubescens* Willd podem estar relacionadas a fatores hereditários e que a variabilidade assimétrica pode estar associada a efeitos da assimetria flutuante, sem influência genética.

Dentre os componentes abióticos existentes que afetam a forma foliar, a temperatura e a luz são componentes muito importantes. Devido à tendência flutuante que possuem, estes fatores podem interferir no processo de crescimento das folhas, bem como na sua forma (WALTER e SCHURR, 2005), atuando como sinalizadores na expressão de genes envolvidos não só na iniciação da formação das folhas na região meristemática do caule, bem como atuando no crescimento, expansão e maturação da mesma. Além destes, a concentração de CO_2 , altitude e herbivoria também podem influenciar a forma de folhas (DKHAR e PAREEK, 2014).

O hábito vegetativo bastante variável da *D. ecastaphyllum*, a condiciona a apresentar modificações nas suas estruturas foliares, uma vez que se comporta como arbusto a arvoreta, podendo ser escandente ou semi-prostrada, o que interfere no recebimento da luminosidade. De acordo com TSUKAYA (2005), diferença na intensidade de luz nas plantas resultam em formas de folhas variadas. O autor relata que baixa intensidade induz ao alongamento do pecíolo com redução da borda foliar, enquanto alta intensidade luminosa promove uma expansão na borda da folha, assim inibindo o alongamento do pecíolo.

Tabela 2. Análise multivariada não paramétrica (NPMANOVA) de forma de foliar de 4 populações de *Dalbergia ecastaphyllum*.

	Itaparica	Vera Cruz	Canavieiras	Ilhéus
Itaparica		0,0558	0,0432*	0,0468*
Vera Cruz	0,0558		0,0504	0,0492*
Canavieiras	0,0432*	0,0504		0,1086
Ilhéus	0,0468*	0,0492*	0,1086	

* Médias com diferença significativa a 5% de probabilidade

As investigações realizadas em espécies vegetais utilizando a morfometria geométrica têm mostrado uma vasta aplicabilidade da técnica, como em estudo evolutivo de espécies (KLINGENBERG et al. 2012); taxonômicos (CONESA et al. 2012) e diversidade genética (SAVRIAMA et al., 2012; STRELIN et al., 2013). E isto, tem contribuído significativamente para o avanço dos estudos botânicos, além de mostrar as novas perspectivas e potencial que a técnica apresenta.

As análises das distâncias de Mahalanobis e Procrustes (Tab. 3) mostram que a maior diferença entre populações ocorreu entre Ilhéus e Itaparica, enquanto que a maior proximidade morfológica ocorreu entre Ilhéus e Canavieiras, ambas com 14,4420. Estas áreas estão geograficamente próximas entre si (4km) e apresentam semelhanças de clima e relevo. Estes resultados corroboram aos que foram apresentados na Figura 2.

Não houve correlação entre a forma, distância geográfica e altitude para as populações estudadas. O valor do coeficiente de correlação ao analisar forma e distância geográfica foi de $r= 0,7245$ com significância de $p=0,1240$. Com relação a

forma e altitude, o valor do coeficiente de correlação foi de $r= 0,4009$, a $p=0,2092$ de significância. VIEIRA et al. (2014) também não verificaram correlação da estrutura morfológica com dados geográficos ao avaliarem as espécies *Anacardium microcarpum* e *A. occidentale*.

Tab. 3: Distância de Mahalanobis (metade inferior da tabela) e distância de Procrustes (metade superior da tabela) entre as populações estudadas obtidas através da Análise de Variáveis Canônicas.

	Itaparica	Vera Cruz	Canavieiras	Ilhéus
Itaparica		0,0404	0,0406	0,0255
Vera Cruz	14,6642		0,0527	0,0406*
Canavieiras	16,2456	17,5693		0,0280
Ilhéus	26,5958	20,6145	14,4420	

* Médias com diferença significativa a 5% de probabilidade

Na análise de VCA as duas primeiras variáveis canônicas acumulam 96,77 % da variação total, onde a primeira variável explica 70,87 % e a segunda 25,90 da variação total (Fig 4). A análise de variável canônica fornece uma descrição entre as diferenças dos grupos determinados *a priori* em um conjunto de dados multivariados e tem por finalidade verificar a relação de magnitude de diferenças entre grupos em comparação àquela dentro dos grupos (MONTEIRO e REIS, 1999).

Pelo teste de validação cruzada entre as populações, a média de identificação correta foi de 83,33%, é um valor alto, e por esse motivo garante confiabilidade sob a separação entre grupos formados a partir da forma foliar. Esse tipo de análise permite verificar a eficiência das equações geradas para que haja uma correta classificação dos indivíduos nos seus respectivos grupos (FRANCOY e IMPERATRIZ-FONSECA, 2010).

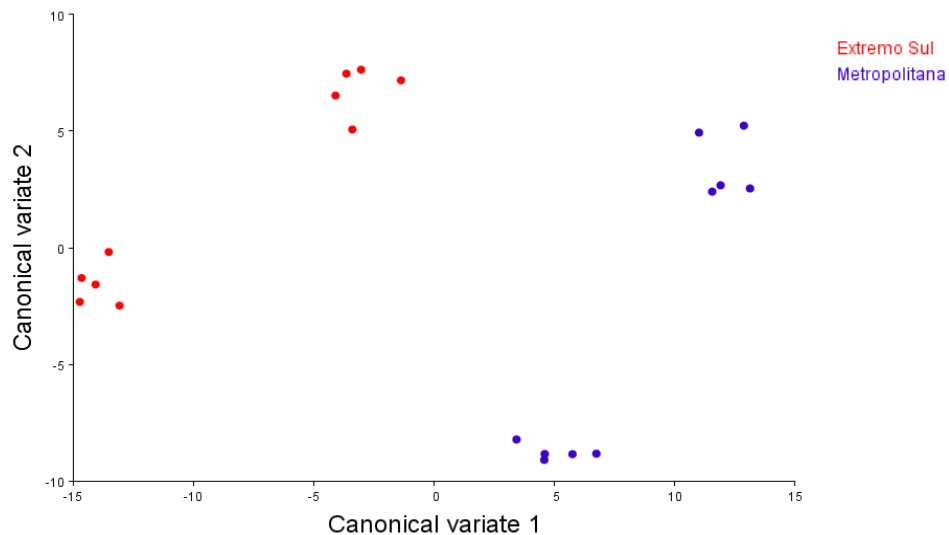


Fig. 4. Dispersão gráfica das quatro populações de *Dalbergia ecastaphyllum* em relação a eixos cartesianos estabelecidos de variáveis canônicas obtidas a partir da forma foliar.

Os resultados obtidos nessa investigação revelam que os folíolos de *D. ecastaphyllum* apresentam forma elíptica e ovada. Além disso, mostram que as populações avaliadas apresentam diversidade morfológica, e que a partir das características geográficas é possível discriminá-las.

Referências

- BOEGER, M.R.T., GLUZEZAK, R.M., PIL, M.W., GOLDENBERG, R., MEDRI, M., 2008: Variabilidade morfológica foliar de *Miconia sellowiana* (DC) Naudin (Melastomataceae) em diferentes fitofisionomias no Estado do Paraná 1. *Revista Brasil. Bot.* 31, 443–452.
- BOOKSTEIN, F.L., 1991: *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press.
- CARVALHO, A.M., 1997: A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergiae) in Brazil. *Brittonia*. 49, 87-109.
- CASTRO, M.L., NASCIMENTO, A.M., IKEGAKI, M., COSTA-NETO, C.M., ALENCAR, S.M., ROSALEN, P.L., 2009: Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. *Bioorganic Med. Chem.* 17, 5332–5335.

- CONESA, M.A., MUS, M., ROSSELLO, J.A, 2012: Leaf shape variation and taxonomic boundaries in two sympatric rupicolous species of *Helichrysum* (Asteraceae: Gnaphalieae), assessed by linear measurements and geometric morphometry. *Biological Journal of the Linnean Society*. 106, 498-513.
- DRYDEN, I.L., MARDIA K.V., 1998: *Statistical shape analysis*. John Wiley & Sons, New York. 376.
- DKHAR, J.; PAREEK, A, 2014: What determines a leaf's shape?. *EvoDevo*. 5,47.
- FORNEL, R., CORDEIRO-ESTRELA, P., 2012: Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. In: Jorge R. Marinho; Luiz U. Hepp; Rodrigo Fornel. (Org.). *Temas em Biologia: Edição comemorativa aos 20 anos do Curso de Ciências Biológicas e aos 5 anos do PPG-Ecologia da URI Campus de Erechim*. 1ed.Erechim: EDIFAPES, 101- 120.
- FRANCOY, T.M., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L, 2010: A morfometria geométrica de asas e a identificação automática de espécies de abelhas. *Oecol. Austr.* 14, 317-321.
- FROZZA, C.O.S, GARCIA, C.S.C., GAMBATO, G., DE SOUZA, M.D.O., SALVADOR, M., MOURA, S., PADILHA, F.F., SEIXAS, F.K., COLLARES, T., BORSUK, S., DELLAGOSTIN, O.A., HENRIQUES, J.A.P., ROESCH-ELY, M., 2013: Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem. Toxicol.* 52, 137–142.
- GUNZ, P., MITTEROECKER, P, 2013: Semilandmarks: A method for quantifying curves and surfaces. *Hystrix*. 24,103–109.
- GUTTNER, F.N., PLÁCIDO, A.P.F. E, AYALA, L., 2007: Comportamento morfológico da praia do Rio das Pacas, Florianópolis-SC-Brasil. *PerCursos*. 8, 72- 89.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D., 2001: PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4, pp 9. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 30.09.2015.
- HUANG, L., LIU, Y., 2014: Understanding diversity in leaf shape of chinese *Sagittaria* (Alismataceae) by geometric tools. 46, 1927–1934.
- KLINGENBERG, C.P, 2011: MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour.*11,353–357.

- KLINGENBERG, C.P., DUTTKE, S., WHELAN, S., KIM, M., 2012: Developmental plasticity , morphological variation and evolvability: a multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. *Journal of evolutionary biology* 25, 115–129.
- LIMA, H.C., 2014: *Fabaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 28 Nov. 2014.
- MARQUES, M.C.M., OLIVEIRA, P.E.A.M., 2005: Características reprodutivas das espécies vegetais da planície costeira. História natural e conservação da Ilha do Mel. Edited by MCM Marques and RM Britez. UFPR, Curitiba, 169-188
- MDA. Plano Territorial de Desenvolvimento Sustentável Litoral Sul. 2010. Disponível em http://sit.mda.gov.br/download/ptdrs/ptdrs_qua_territorio090.pdf. Acesso em : 30.03.2016.
- MITTEROECKER, P., GUNZ, P., 2009: Advances in geometric morphometrics. *Evolutionary Biology*.36, 235–247.
- MONTEIRO, L.R., REIS, S.F, 1999: Princípios de Morfometria Geométrica. Holos.
- OLIVEIRA, J.A.B., CORTEZ, J.S.A., 2015: Herbivoria em *Dalbergia ecastophyllum* em área de restinga do Norte. *Natureza on line*. 1, 151–154.
- PALMER, C.M., BUSH, M.S., MALOOF, J.N., 2012: Phenotypic and Developmental Plasticity in Plants. *Plant Sci*. 1–9.
- PIRES, M.F., PEREIRA, M.P., CASTRO, E.M., BARBOSA, S., PEREIRA, F.J., 2015: Micromorfometria foliar de *Schinus molle* L. (anarcadiaceae) em diferentes alturas na copa. *Cerne*, 21,17-25.
- REYS, O.; CANTILLO, F.A., 2003: Fitocenosis presentes em las áreas costeras Del sur de La Sierra Maestra, Cuba. I. comunidades com influência marina. *Foresta Veracruzana*, 5, 1-7.
- ROHLF FJ (2010) tpsDig, digitize landmarks and outlines, ver. 2.16. State University of New York, Stony Brook.
- SAVRIAMA, Y., GÓMEZ, J.M., PERFECTTI, F., KLINGENBERG, C.P., 2012: Geometric morphometrics of corolla shape: Dissecting components of

- symmetric and asymmetric variation in *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae). *New Phytol.* 196, 945–954.
- SILVA, M.F.S., ANDRADE, I.M., MAYO, S.J., 2012: Geometric morphometrics of leaf blade shape in *Montrichardia linifera* (Araceae) populations from the Rio Parnaíba Delta, north-east Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 170, 554-572.
- STRELIN, M.M., COSACOV, A., DILLER, M., SÉRSIC, A.N., 2013. Study of the polymorphism of the Patagonian *Calceolaria polyrhiza* Cav. using decision tree and sequential covering rule induction. *Bot. J. Linn. Soc.* manuscript, 173, 487–500.
- TSUKAYA, H., 2005: Leaf shape: genetic control and environmental factors. *Int J Dev Biol.* 49, 547–555.
- VIEIRA, M., MAYO, S. J., ANDRADE, I. M., 2014: Geometric morphometrics of leaves of *Anacardium microcarpum* Ducke and *A. occidentale* L. (Anacardiaceae) from the coastal region of Piauí, Brazil. 1–29.
- VISCOSI, V., 2015: Geometric morphometrics and leaf phenotypic plasticity: assessing fluctuating asymmetry and allometry in European white oaks (*Quercus*). 179, 335–348.
- WALTER A., SCHURR, U., 2005. Dynamics of leaf and root growth: endogenous control versus environmental impact. *Annals of botany*, 95, 891–900.
- WEBSTER, M.A.R.K., SHEETS, H.D., 2010: A practical introduction to landmark-based geometric morphometrics. *Quantitative Methods in Paleobiology*, 16, 168-188.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo abordou as características da morfometria foliar e as atividades antioxidante, fotoprotetora e inibição da tirosinase da *Dalbergia ecastaphyllum* do estado da Bahia. Os resultados contidos nessa investigação são relevantes para o conhecimento das características física e propriedades química e biológica da espécie, visto que na literatura são escassos os registros que apresentem uma discussão mais aprofundada sobre esta.

Os compostos hidrofílicos que foram identificados nas amostras apresentaram constituição variável, assim como os compostos lipofílicos, isso confirma a premissa de que o ambiente de origem exerce uma grande influência na composição química do material vegetal.

A ausência de correlação da atividade antioxidante pelo método de inibição de descoloração do β -caroteno com flavonoides indica que outros constituintes químicos existentes na planta podem estar relacionados a essa atividade, e que certamente não foram avaliados nesse estudo.

O fator de proteção solar (FPS) encontrado evidencia a ação fotoprotetora da *D. ecastaphyllum*. Assim, as concentrações dos extratos analisadas servem como base para a criação de formulações fotoprotetoras na indústria cosmética.

O estudo da morfometria foliar desta espécie confirma a variação observada em campo e a importância do uso da morfometria geométrica como uma ferramenta nos estudos botânicos.

Os resultados obtidos nessa investigação sublinham a importância da *D. ecastaphyllum* que embora considerada a origem botânica da própolis vermelha, apresenta limitações de informações a seu respeito. Além disso, sugere o potencial uso da espécie na alternativa terapêutica de doenças causadas pela oxidação de radicais livres.

É necessário realizar estudos posteriores sobre outros constituintes químicos presentes nessa espécie que são responsáveis pelas suas propriedades biológicas e elucidar os mecanismos de atividade na célula, bem como a sua interação.