

JACQUELINE SIQUEIRA GLASENAPP

ESTRUTURA GENÉTICA E FENÓIS TOTAIS DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
BARBATIMÃO (*Stryphnodendron adstringens*)

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2007

JACQUELINE SIQUEIRA GLASENAPP

ESTRUTURA GENÉTICA E FENÓIS TOTAIS DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
BARBATIMÃO (*Stryphnodendron adstringens*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 14 de fevereiro de 2007

Prof. Cosme Damião Cruz
(Co-Orientador)

Prof. Ernane Ronie Martins
(Co-Orientador)

Prof. Fernando Luiz Finger
(Co-Orientador)

Prof^a. Lourdes Silva de Figueiredo

Prof. Vicente Wagner Dias Casali
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais FAPEMIG, pelo apoio financeiro;

Ao estimado professor e orientador Vicente Wagner Dias Casali, pelo apoio e orientação;

Aos queridos professores e conselheiros Cosme Damião Cruz, Ernane R. Martins e Fernando L. Finger, pela assistência e sugestões;

Ao Técnico de laboratório Francisco Glicério Ribeiro, pela ajuda imprescindível nos procedimentos laboratoriais;

Ao Sr. Vicente do Grupo Entre-Folhas e ao Sr. Quim Quim das casas de vegetação, pela satisfação e prontidão em auxiliar os estudantes da pós-graduação;

Ao Núcleo de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, pela ajuda na realização dos trabalhos de campo;

Aos queridos colegas do Laboratório de Melhoramento de Hortaliças da UFV, pelo carinho e amizade;

Ao amigo e estudante de Engenharia Florestal (UFV) Leandro Gomide Neves, pelas fotos dos zimogramas;

Ao Museu de Ciências Naturais (MCN) da Fundação Zoobotânica do RS (FZB) onde fui bolsista durante a graduação, especialmente, aos biólogos Maria Inês G. Burger e Fernando Gertum Becker, que me além de orientadores foram grandes amigos e me auxiliaram nos primeiros passos na vida acadêmica.

BIOGRAFIA

Jacqueline Siqueira Glasenapp, filha de Marília de Souza do Prado Prestes e Antonio Barbosa Siqueira, nasceu no dia 14 de novembro de 1971 na cidade de Montes Claros, MG.

Em 2002 concluiu o curso de Ciências Biológicas pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Em 2005 iniciou o curso de mestrado do Programa de Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. CAPITULO 1: Estrutura Genética de Populações Naturais de <i>Stryphnodendron adstringens</i> nos municípios de Grão Mogol e Montes Claros.....	3
2.1. INTRODUÇÃO	3
2.2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.2.1 O gênero.....	5
2.2.2 O barbatimão.....	6
2.2.3 Descrição botânica.....	8
2.2.4 Uso geral.....	9
2.2.5 Uso medicinal.....	10
2.2.6 Outras propriedades.....	11
2.2.7 Aspectos ecológicos.....	12
2.2.8 Eletroforese de isoenzimas e o estudo de populações naturais de plantas.....	13
2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.3.1 Coleta das amostras.....	15
2.3.2 Análise eletroforética.....	18
2.3.2.1 Extração enzimática.....	18

2.3.2.2 Preparo do gel.....	19
2.3.2.3 Sistemas tampão gel/eletrodo.....	20
2.3.2.4 Condições eletroforéticas.....	20
2.3.2.5 Revelação de bandas.....	21
2.3.2.6 Secagem dos géis.....	21
2.3.2.7 Leitura das bandas	22
2.3.3 Variabilidade genética.....	22
2.3.4 Estrutura genética.....	23
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
2.4.1 Análise eletroforética.....	27
2.4.2 Interpretação genética dos zimograma.....	28
2.4.3.1 Variabilidade genética.....	35
2.4.3.2 Estrutura genética.....	38
2.5. CONCLUSÃO.....	47
3. CAPITULO 2: Teores de Fenóis Totais em Folhas, Cascas e Frutos de Três Populações de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville.....	49
3.1. INTRODUÇÃO.....	49
3.2. REVISÃO DE LITERATURA.....	51
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.3.1 Coleta das amostras.....	53
3.3.2 Preparo das amostras.....	53
3.3.3 Análise dos teores de fenóis totais e amostras de solo.....	54
3.4. RESULTADOS.....	55
3.5. DISCUSSÃO.....	59
3.6. CONCLUSÃO.....	61
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	62
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	63

RESUMO

GLASENAPP, Jacqueline Siqueira M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Estrutura genética e fenôis totais de populações naturais de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*)**. Orientador: Vicente Wagner Dias Casali. Co-Orientadores: Cosme Damião Cruz, Ernane Ronie Martins e Fernando Luiz Finger.

Foram estudadas quatro populações naturais de *Stryphnodendron adstringens* no cerrado *stricto sensu*, norte de Minas Gerais, três no município de Grão Mogol e uma no município de Montes Claros. Por meio da análise de 5 locos isoenzimáticos polimórficos foram obtidas estimativas das frequências alélicas de 276 indivíduos adultos. Com base nas heterozigosidades observadas e esperadas foram estimadas as estatísticas F de Wright (1951). Foi verificado excesso de heterozigotos dentro ($F_{IS} = -0.3866$) e no conjunto das populações ($F_{IT} = -0.3065$) e, baixa divergência genética entre populações ($F_{ST} = 0,0578$). Conforme a medida de diferenciação genética G_{ST} de Nei (1973), cerca de 94% da variabilidade genética está contida dentro das populações e cerca de 6% são atribuídos às diferenças entre populações. Estimativas de tamanho efetivo (N_e) foram superiores ao número de indivíduos amostrados indicando adequada representatividade genética nas amostras obtidas. Apesar da aparente distinção observada por meio da técnica de agrupamento UPGMA, entre as populações de Grão Mogol e Montes Claros, com base nos resultados da Análise Heterozigosidade de Weir (1996), não há divergência genética

significativa entre populações. Os valores de fluxo gênico (Nm) obtidos foram extremamente altos indicando grande potencial panmítico, o que pode explicar a baixa divergência genética entre populações e o fato da maior parte da variação total está contida dentro delas. Adicionalmente, foram quantificados os teores de fenóis totais e, verificadas médias de 18,58% nas cascas, 14,27% nos frutos e 9,35% nas folhas. De forma geral, as cascas são mais recomendadas na obtenção de matéria prima e, acredita-se que estratégias visando a conservação da diversidade genética de *S. adstringens* impliquem na manutenção de populações com grande número de indivíduos.

ABSTRACT

GLASENAPP, Jacqueline Siqueira M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February de 2007. **Genetic structure and total phenols of the natural populations of barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*)**. Adviser: Vicente Wagner Dias Casali. Co-Advisers: Cosme Damião Cruz, Ernane Ronie Martins and Fernando Luiz Finger.

Four natural populations of the *Stryphnodendron adstringens* in the cerrado *strictu sensu*, North region of Minas Gerais State were studied, three from the Grão Mogol district and one from the Montes Claros district. Through the analyzes of 5 isoenzymatic polymorphic locos, estimates of the allelic frequencies of 276 adult individuals were obtained. Based on the heterozygotes observed and expected the F Wright (1951) statistics were estimated. An excess of heterozygotes inside ($F_{is} = -0.3866$) and in the populations group ($F_{IT} = -0.3065$), and the low genetic diversion among the populations ($F_{st} = 0.0578$) were verified. According to the genetic differentiation method G_{st} of Nei (1973), about 94% of the genetic variability is enclosed among the populations, and about 6% are attributed to the differences among the populations. Estimates of effective size (N_e) were superior to the number of individuals shown in the samples obtained. In spite of the apparent distinction observed through the grouping technique UPGMA between the Grão Mogol and Montes Claros populations, based on the results of the Weir Heterozygotes Analyzes (1996), there are no significant genetic divergences between the populations. The genetic flux (Nm) values obtained were extremely high indicating the low genetic divergence between the

populations, and the fact that the greater part of the variety is contained within them. Furthermore, the total phenol values were quantified, and averages of 18,58% in the bark, 14,27% in the fruit and 9,35% in the leaves were verified. In an overall way, the barks are more recommended for the raw matter obtaining, and it is believed that the strategies aiming at the conservation of the genetic diversity of *S. adstringens* imply in maintenance of the population with a great number of individuals.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil em área sendo superado apenas pela Floresta Amazônica, ocupa cerca de 22% do território brasileiro (Sano & Almeida, 1998). Apesar de não figurado entre os grandes ecossistemas definidos pela constituição de 1988 como patrimônio nacional, este bioma é reconhecidamente fascinante pela diversidade biológica e fitofisionômica (da Silva Júnior et al., 1996).

A flora do Cerrado ainda é pouco conhecida. Nos resultados iniciais do projeto multiinstitucional *Biogeografia do Bioma Cerrado* foram registradas 6429 espécies, das quais, 6060 são angiospermas. A família Leguminosae foi a mais representativa, com 101 gêneros, 777 espécies 143 variedades ou subespécies. Estes resultados ainda são modestos, devido ao reduzido trabalho de coleta e amostragens em várias fitofisionomias e regiões do

bioma. O Cerrado é muito mais rico do que se previa e muitas das suas tipologias são endêmicas da América do Sul, e do Brasil (Sano & Almeida, 1998).

Em decorrência da expansão urbana, atividades agrícolas, consumo de carvão vegetal, entre outros, o Cerrado está passando por acelerado processo de fragmentação. A fragmentação populacional reduz a variabilidade genética tendo implicações no curso evolutivo das espécies. Os estudos deste bioma são incipientes no que se refere à conservação da diversidade genética. A importância intrínseca deste patrimônio merece mais reconhecimento, o Cerrado teve a cobertura original reduzida em 37% e o percentual de Áreas de Proteção Ambiental (1,1%) e de Preservação Permanente (2,5%) é muito pequeno (Felfili & Silva Júnior, 2001; Felfili et al., 2002).

Adicionalmente à vegetação de várias nuances com fisionomias que englobam formações florestais, savânicas, campestres e, à biodiversidade riquíssima, a flora do Cerrado possui grande potencial medicinal. No levantamento etnobotânico de plantas medicinais nas comunidades do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros e na cidade de Alto Paraíso (GO), 69% das espécies citadas pertencem à flora nativa. No elenco das dez plantas medicinais mais utilizadas *Stryphnodendron adstringens* foi coincidente na indicação de todos os entrevistados (de Souza & Felfili, 2006).

O *S. adstringens*, conhecido popularmente como barbatimão, é encontrado com frequência em fitofisionomias de cerrado típico (*stricto sensu*), campo-sujo e cerradão. Tem sido explorado tradicionalmente por suas propriedades medicinais e no aproveitamento de tanino. A prática tradicional da extração da casca vem colocando a espécie sob ameaça de extinção. A coleta é desordenada sem nenhum critério de escolha do indivíduo quanto ao porte. Constatou-se que apesar do grande potencial de exploração extrativista vegetal das espécies do Cerrado, estes recursos estão sendo utilizados de forma indiscriminada. (Felfili 2000; de Souza & Felfili, 2006).

Como o *Stryphnodendron adstringens* vem sofrendo forte pressão extrativista, é desconhecido geneticamente e possui grande importância medicinal e econômica como fonte de fenóis, principalmente taninos, este trabalho objetivou a verificação da estrutura genética e quantificação dos teores de fenóis totais em populações naturais dos municípios de Montes Claros e Grão Mogol, norte de Minas Gerais.

2. CAPITULO 1

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Stryphnodendron adstringens* NOS MUNICÍPIOS DE GRÃO MOGOL E MONTES CLAROS

2.1 INTRODUÇÃO

As populações de determinada espécie encontram-se espalhadas por sua área de distribuição geográfica. Por população entende-se a coleção de indivíduos pertencentes à mesma espécie que convivem em área de dimensão restrita o suficientemente para que qualquer indivíduo tenha a chance de cruzar com qualquer outro do sexo oposto (Silvertown & Doust, 1993). A estrutura populacional de uma espécie é constituída pela a estrutura demográfica, a qual é determinada por processos como nascimento, morte, dispersão, sistema de cruzamento, história de vida e, pela estrutura genética que refere-se a organização da variabilidade genética dentro e entre populações (Slatkin, 1994).

No estudo da estrutura genética são analisados os genótipos dos indivíduos nas populações. O padrão de variação da distribuição dos genótipos e o grau de fixação gênica

dentro e entre populações, são utilizados na inferência da extensão das forças evolutivas atuantes (Slatkin, 1994).

Marcadores moleculares têm sido utilizados em diversos trabalhos com o objetivo de estimar, de forma rápida, padrões de distribuição da variabilidade genética visando a tomada de decisões na conservação de recursos genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Entre as classes de marcadores moleculares existentes, os marcadores baseados em Sequências Simples Repetidas (SSR) ou microssatélites são considerados os que mais se aproximam dos marcadores ideais nos estudos de genética de populações, entretanto, requerem estudo prévio do genoma (Zucchi, 2002). Marcadores isoenzimáticos não requerem estudo prévio do genoma e, são particularmente úteis porque podem ser usados em praticamente qualquer espécie. Geralmente são co-dominantes possibilitando identificar todas as classes genotípicas, além disso, permitem a análise rápida de grande número de amostras (Robinson, 1998, 2006).

Devido ao amplo uso no estudo da diversidade genética de populações naturais, marcadores isoenzimáticos foram utilizados no presente trabalho. O objetivo principal foi caracterizar a estrutura genética de populações de *Stryphnodendron adstringens* localizadas nos municípios de Grão Mogol e Montes Claros, norte do Estado de Minas Gerais, e contribuir na tomada de decisões quanto a estratégias de manejo da espécie.

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2.1 O gênero

O gênero *Stryphnodendron* tem distribuição neotropical com limites norte na Nicarágua e sul, no Estado do Paraná no Brasil. Dos 36 táxons cerca de 89% são encontrados no Brasil e aproximadamente 50% são exclusivos do território brasileiro (Scalon & Souza, 2006). Ocorrem em diversos tipos de vegetação, principalmente no Cerrado e na Amazônia. No gênero são encontradas desde espécies anãs prostadas com cerca de 50 cm de altura, características do Brasil Central, a grandes árvores com 35 a 40 m como as que ocorrem na Floresta Amazônica (Occhioni, 1990). O centro de diversidade de gênero, bem como altíssimo polimorfismo dos grãos de pólen é geograficamente centrado na Amazônia Brasileira e nas formações da Caatinga e Cerrado (Guinet & Caccavari, 1992).

Guinet & Caccavari (1992) realizaram estudo palinológico com 27 espécies do gênero *Stryphnodendron* e, observaram que *S. adstringens* tem a morfologia do grão de pólen menos evoluída, sendo por isso, interpretado como o tipo mais primitivo. Possui políades constituídas por 16 pequenos grãos de pólen, teto com pequenas verrugas circulares e, sem colpo subsidiário; a maioria destas características é comum na tribo Mimoseae. No grupo de *S. adstringens* foram incluídas mais 11 espécies, que se assemelham nas características vegetativas e do grão de pólen, elas são: *S. duckeanum*, *S.*

polyphyllum-villosum, *S. obovatum*, *S. rotundifolium*, *S. goyazense*, *S. heringeri*, *S. humile*, *S. polyphyllum*, *S. pulcherrimum*, *S. guaianense*, *S. foreroi*.

Baseado nas formas de vida dos taxa Rizzini & Heringer (1987) dividiram o gênero *Stryphnodendron* em duas seções. Seção *Stryphnodendron*, englobando todos os taxa arbustivos e arbóreos com caule simples. Seção *Elenae* compreendendo taxa de porte subarbustivo, por vezes prostados, conhecidos como “plantas-anãs”. Entretanto, reconheceram que algumas espécies da Seção *Elenae* mostram afinidade com as espécies arborescentes da Seção *Stryphnodendron*. Considerando somente as características do grão de pólen, as duas seções não são reconhecíveis, não há co-variação entre o número de grãos por políade, o volume da unidade do pólen e o hábito ou, dimensão da planta (Guinet & Caccavari, 1992).

Occhioni Martins (1981) e Occhioni Martins et al. (1972), embora não tenham formalmente descrito subgêneros, foram consensuais na importância de divisão do gênero segundo os tipos de inflorescência. Guinet e Caccavari (1992) analisando variações nas características do grão de pólen, também, concordam que as espécies com inflorescências agrupadas em grandes panículas ou em racimos de espiga são claramente distintas. Essas características são por sua vez correlacionadas com a superfície e número de folíolos e, também, com o conteúdo de pólen no estame.

2.2.2 O barbatimão

Barbatimão é, também, nome comum as seguintes espécies do gênero *Stryphnodendron*: *S. angustum* (Amazonas), *S. Coriaceum* (Bahia e Minas Gerais), *S. floribundum* (Amazonas até Bahia), *S. guyanensis* (Guiana e Amazonia). *S. microstachyum* (Amazonas), *S. polyphyllum* (Amazonas, Rio de Janeiro, Minas Gerais), *S. rotundifolium* (Piauí até Bahia). A árvore conhecida como barbatimão-verdadeiro, e apontada como espécie principal, é *Stryphnodendron adstringens* (Pio Corrêa, 1926; Bukkart, 1952), classificada na divisão Angiospermae, classe Magnoliopsidae, ordem Fabales, família

Leguminosae, sub-família Mimosoideae, gênero *Stryphnodendron*. Segundo Penna (1946) “é uma das mais belas árvores indígenas” e, segundo Lorenzi (1992), bastante ornamental pela forma da copa e delicadeza da folhagem.

Os segredos medicinais de *S. adstringens* foram descobertos pelos povos indígenas que o chamavam de *Iba timó*, que significa árvore que aperta, ou seja, adstringente. A casca já foi levada a Europa sob o nome de “casca brasileira adstringente” e estudada por Merrem em 1828. Como mencionado por Penna (1946), devido ao efeito de contração da mucosa vaginal, “é a casca-da-virgindade ou da mocidade, como a chamavam outrora, muito procurada pelas mulheres gastas pelos prazeres”.

A espécie foi descrita, inicialmente, na “Flora Fluminensis” (Vellozo, 1790) como *Mimosa barba de timan*. Está incluída na FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 2ª edição, como *Stryphnodendron barbadetiman*, Martius. Esta combinação foi modificada por Coville (Index, 1958) para *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville. Occhioni Martins em 1990, fazendo nova revisão nomenclatural estabeleceu como sinônimia *Acácia adstringens* Mart., *Mimosa barbadetiman* Vell., *S. barbatimão* Mart., *S. barbadetiman* Mart., *Mimosa virginalis* Koster.

O *S. adstringens* tem ocorrência típica no campo-cerrado e cerrado *stricto sensu*, neste último tem densidade variando de 5,6 a 36 indivíduos por hectare. É observado tanto em formações primárias como secundárias. Populações não perturbadas possuem grande potencial de regeneração. Tem nítida preferência por solos arenosos e de drenagem rápida. Ocorre no Pará, Tocantins, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e norte do Paraná (Felfili & Borges Filho, 2004; Lorenzi, 1992; Almeida, et al. 1998; Pio Corrêa, 1926).

2.2.3 Descrição botânica

A espécie é perenifólia com intensa brotação e desenvolvimento de folhas novas no início do período chuvoso (outubro a abril). A floração coincide com o período seco (maio a setembro). A maturação dos frutos ocorre no final da estação seca (agosto/setembro), aumentando a probabilidade de germinação e crescimento de plântulas devido ao início da estação chuvosa (Felfili & Borges Filho, 2004).

A árvore tem porte entre 2 a 8 metros de altura, caule e ramos tortuosos, casca rugosa, áspera e fissurada. Folhas alternas, paripinadas, com 5 a 8 pares de pinas. Folíolos alternos com 6 a 8 pares por pina, de forma arredondada a oval. Flores com cerca de 6 mm de comprimento dispostas em inflorescências do tipo racimo de espiga, corola creme-esverdeada com pétalas livres. Numerosos estames, pólen em políades, anteras com glândula apical que parece ser relacionada com o fraco odor da flor, filetes com cerca do dobro do comprimento da corola. Ovário súpero, unilocular com muitos óvulos parietais (Felfili & Borges Filho 2004; Ortiz et al., 2003; Almeida et al., 1998; Lorenzi, 1992; Pio Correa, 1926).

A espécie é andromonóica, flores hermafroditas e flores masculinas ocorreram ao longo de toda a inflorescência mas, as hermafroditas são mais comuns na parte central. A maioria dos racimos (cerca de 86%) produz flores masculinas e femininas, porém, alguns (cerca de 10%) produzem somente flores masculinas, enquanto outros (cerca de 4%) são exclusivamente hermafroditas. Flores masculinas são menores e com maior número de políades por antera que as hermafroditas. A maior parte das flores (80%) é desprovida de nectário, entretanto flores hermafroditas secretaram, em média, mais néctar do que flores masculinas. O fato de somente pequena parte das flores na inflorescência produzirem néctar (20%) pode ser estratégia de economia enquanto mantêm o atrativo aos polinizadores. Cada racimo porta grande número de minúsculas flores que funcionam como unidade floral. A maior produção de pólen é comum em flores masculinas, porém, não de forma tão acentuada quanto em *S. adstringens* (Ortiz et al., 2003).

Os frutos são vagens lenhosas linear-oblongas, carnosas de cor marrom quando maduras, endocarpo macio e fibroso. As sementes são castanho-avermelhadas, de elipsóides a oblongóides, ligeiramente compressas (Lorenzi, 1992; Felfili & Borges Filho 2004). Ortiz et al. (2003), ao verificarem o sistema de reprodução de *S. adstringens* constataram que a espécie é não endogâmica e a produção de frutos muito baixa. A porcentagem de frutos obtidos por autofecundação (2,82%) foi consideravelmente menor do que os obtidos por polinização cruzada (35,48%).

2.2.4 Uso geral

O *S. adstringens* pode ser empregado com sucesso no paisagismo, principalmente na arborização de ruas estreitas. Também, recomendado nos plantios mistos em áreas degradadas de preservação permanente. Possui madeira bastante durável em condições adversas, própria para construção civil, obras expostas, marcenaria e torno (Almeida et al., 1998; Lorenzi, 1992; Pio Corrêa, 1926). Da cinza da madeira extrai-se a dicoada, substância escura que substitui a soda cáustica no fabrico de sabão caseiro. A casca é fonte de tanino utilizada no curtume de couro (Rizzini & Mors, 1976; Penna, 1946; Pio Corrêa, 1926). É forrageira importante na dieta bovina do Pantanal (Pott, 1988). Por decocção da casca produz matéria corante vermelha, empregada artesanalmente na tintura de algodão e na produção tinta de escrever (Mirandola & Mirandola, 1991; Pio Corrêa, 1926).

2.2. 5 Uso medicinal

Na medicina popular *S. adstringens* é utilizado no tratamento de diversas doenças, a garrafada da casca do caule (macerada) combate úlceras, inflamações e hemorróidas (Barros, 1982). Em decocção a casca é anti-séptica sendo usada no tratamento gastrite e dor de garganta (Hirschmann & Arias, 1990). A casca é, também, usada no combate de afecções escorbuticas, leucorréias, hérnias, diarreias, hemorragias, impigem e oftalmias (Almeida et al., 1998; Penna, 1946). As folhas são tônicas e as sementes passam por venenosas (Penna, 1946). Inúmeros trabalhos tem sido realizados de forma a testar as propriedades medicinais de *S. adstringens* e, identificar os princípios ativos responsáveis. Acredita-se que as propriedades medicinais estejam relacionadas aos altos teores de taninos (Santos et al., 2002; Alves et al., 2000; Panizza et al., 1988; Penna, 1946; Pio Corrêa, 1926).

As propriedades cicatrizantes do extrato da casca de *S. adstringens* foram verificadas mesmo em concentrações tão baixas quanto 1% (Panizza et al., 1988). Um dos possíveis meios de ação antiinflamatória é pela inibição da formação ou ação de mediadores químicos. Análises fitoquímicas de *S. adstringens* mostram, além de taninos, substâncias como chalconas, compostos triterpenóides, os quais também possuem ação antiinflamatória (Lima et al., 1998).

No trabalho realizado no Posto de Saúde e da Santa Casa da cidade de Arealva (SP), o uso de *S. adstringens* em lesões como a quelite solar ou herpes tem sido de grande valia. Nas queimaduras solares mais intensas o eritema diminui e a dor é aliviada rapidamente. Nas lesões por queimaduras domésticas, a associação *Calendula officinalis* e *S. adstringens* produz cicatrização mais rápida. Alguns pacientes com lesões rebeldes, como a úlcera varicosa, já haviam sido tratados com métodos convencionais sem sucesso. A maioria dos casos era de evolução crônica de vários anos, o tratamento com *C. officinalis* mais *S. adstringens* levou a cura na maioria dos pacientes e a algumas melhoras. Sendo assim, *S. adstringens* ficou estabelecido como tratamento alternativo de lesões rebeldes (Neto et al., 1996).

A melanogênese é o processo fisiológico resultante da síntese do pigmento melanina pela enzima tirosinase nos melanócitos. Alterações na melanogênese são responsáveis pelo câncer conhecido como melanoma. Baurin et al. (2002), verificaram que os extratos das sementes e das cascas de *S. adstringens* inibem cerca 52% e 90% da enzima tirosinase, respectivamente. Investigações fitoquímicas em *S. adstringens* não revelaram a presença de componentes conhecidos de atividade anti-tirosinase, possivelmente, *S. adstringens* contém novo recurso de inibidores da tirosinase.

2.2.6 Outras propriedades

Em testes de toxicidade contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, extratos da casca e das folhas de *S. adstringens* foram altamente tóxicos (100 ppm) matando 100% dos moluscos (Bezerra et al., 2002; Mendes et al., 1984).

Alves et al. (2000), verificaram alta atividade do extrato das cascas de *S. adstringens* contra bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Holetz et al. (2005), observaram o efeito do extrato de barbatimão no crescimento de protozoários como *Herpetomonas samuelpessoai* pertencente à família Trypanosomatidae, a qual inclui as espécies *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi*. Foi observado que o extrato tem efeito inibitório dose-dependente no crescimento de *Herpetomonas samuelpessoai*. Protozoários cultivados em concentração média de inibição de 50% (IC₅₀) do extrato das cascas de *S. adstringens* tiveram aumento da mitocôndria e do número de cristas, vesiculação do complexo de Golgi e inibição da atividade da enzima succinato citocromo *c* redutase. A inibição desta enzima pode influenciar na sequência respiratória mudando o funcionamento da mitocôndria. Devido a esta observação foram sugeridas alterações na produção de adenosina-trifosfato (ATP), no transporte ativo de íons e moléculas bem como na síntese de macromoléculas. Acredita-se que a atividade de inibição foi devida a ação de compostos de alto peso molecular, como taninos condensados,

isolados durante o processo de purificação. No estudo de Maza et al. (2003), o extrato da casca de *S. adstringens* promoveu alterações estruturais como células biflageladas e binúcleadas nas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, fato que pode ser devido a interferência na divisão celular. Verificou-se, também, a ocorrência de membranas concêntricas no citoplasma, o que é característico de processos autofágicos.

2.2.7 Aspecto ecológico

Em estudos de caracterização da composição florística os parâmetros fitossociológicos comumente utilizados são: abundância relativa (AR), dominância relativa (DR), frequência relativa (FR) e o Índice de Valor de Importância (IVI), que é obtido pela soma dos parâmetros acima relacionados ($IVI = AR + DR + FR$).

O Índice de Valor de Importância (IVI) reflete o grau de importância ecológica da espécie em determinado local. Em muitos estudos fitossociológicos do cerrado *stricto sensu* a espécie *S. adstringens* foi apontada com IVIs relativamente altos. No estudo conduzido por Assunção & Felfili (2004), numa área de cerrado *sensu stricto* no Distrito Federal, a espécie com o maior Índice do Valor de Importância (IVI) foi *S. adstringens*. O *S. adstringens* ocorreu também entre as 12 espécies com maior IVI encontradas no levantamento fitossociológico realizado no cerrado *stricto sensu* na Fazenda Água Limpa (Felfili & Silva Júnior, 1992). Em outras áreas do DF foram observados valores médios entre 4,1 e 6,5 (Felfili et al., 1994). Na Estação Florestal de Experimentação de Paraopeba foram selecionadas 20 áreas no estudo da composição florística realizado por Silva Junior (1984). A família Leguminosae ficou na 3ª posição de dominância com 12,75% do número total de indivíduos, *S. adstringens* foi encontrado na metade das áreas estudadas com IVIs variando entre 3,14 e 23,81.

2.2.8 Eletroforese de isoenzimas e o estudo de populações naturais de plantas

O termo isoenzima ou isozima foi introduzido por Markert & Moller (1959) e designa formas moleculares de enzimas que catalisam a mesma reação na célula. Estas formas representam a consequência bioquímica da substituição, deleção ou adição de um ou mais aminoácidos no polipeptídeo (Robinson, 2006). Existem vários métodos bioquímicos que detectam, isolam e distinguem isoenzimas. Entretanto, a eletroforese é a mais poderosa técnica analítica disponível. Como meio de suporte amplamente utilizados na eletroforese estão os géis de amido ou poliacrilamida. O princípio básico da técnica reside na separação isoenzimática e identificação das distintas bandas no gel por meios histoquímicos (Borém & Caixeta, 2006). O conjunto de bandas coloridas que as isoenzimas formam no gel é chamado *zimograma* (Alfenas et al., 2006).

A propriedade mais expressiva das isoenzimas como marcadores genéticos é a herança mendeliana simples, não sendo detectados efeitos deletérios, epistáticos ou pleiotrópicos. Adicionalmente, o fatiamento dos géis de amido permite examinar vários locos enzimáticos na mesma corrida eletroforética (Borem & Caixeta, 2006).

Como marcadores co-dominantes, as isoenzimas permitem identificar diretamente os genótipos heterozigotos. Quando se deseja apenas distinguir indivíduos ou clones entre si, o conjunto de bandas representa algum fenótipo particular. Mas, quando se deseja examinar os processos evolutivos atuando nas populações naturais, os marcadores são os locos e os respectivos alelos identificados, neste caso é mais apropriado usar o termo aloenzimas (Robinson, 2006).

O estudo da estrutura genética de populações naturais envolve descrição dos níveis de variação genética dentro das populações e como esta se distribui entre as populações, as isoenzimas tem sido de grande utilidade nestes estudos (de Melo Júnior et al., 2004; de Campos Telles et al., 2003; Moraes & Derbyshire, 2002; Nassar et al., 2002; Moraes et al., 1999)

Como os habitats naturais são fragmentados pela intervenção humana, populações que em algum tempo eram grandes e inter-conectadas tornaram-se desconectadas e localmente raras. A fragmentação faz a migração crítica no restabelecimento de populações locais e na contenção de efeitos como depressão por endogamia. O fluxo gênico é o principal componente da estrutura populacional, pois determina a extensão na qual cada população local, de determinada espécie, se comporta como unidade evolutiva independente. Se há grande quantidade de fluxo gênico entre populações locais, estas evoluem juntas, se há pouca quantidade, cada população evolui quase independentemente. Quanto aos métodos de estimação de fluxo gênico, o mais comum é método indireto, baseado na estatística F de Wright (1951). Conforme o Modelo Ilhas de Wright o balanço é alcançado entre fluxo gênico e deriva genética. Se Nm (número de migrantes por geração) é muito maior do que 1, o fluxo gênico supera o efeito da deriva e previne a diferenciação local, se é muito menor do que 1, então, a deriva genética aleatória age quase independentemente em cada população (Slatkin, 1994)

A Teoria Neutra foi desenvolvida pelos esforços pioneiros de Motoo Kimura (1969, 1983) e King e Jukes (1969). A matemática teórica derivada a partir do pressuposto da deriva genética aleatória, permite predições específicas das taxas de mudanças nas frequências alélicas dentro e entre populações. As taxas de mudanças nas frequências alélicas sob o ponto de vista da neutralidade, são função de características populacionais como tamanho e estrutura populacional, isolamento, migração, bem como taxas de mutação (Slatkin, 1994).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Coleta das amostras

Foram estudadas quatro populações de *S. adstringens* no cerrado *stricto sensu*, norte de Minas Gerais, três no município de Grão Mogol, às margens da BR251 e, uma no município de Montes Claros, próxima ao Núcleo de Ciências Agrárias (NCA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os referidos municípios distam cerca de 130 Km.

No município de Grão Mogol as coletas foram realizadas em três localidades denominadas *Área Um*, *Queimada* e *Baixa do Tatu* (Figura 1). As amostras foram obtidas aleatoriamente por meio de transectos, respeitando-se o espaço amostral de cerca de 20 m. Na população Montes Claros o transecto foi realizado percorrendo-se a distância de 2 km, com espaço amostral de cerca de 30 m. As dimensões, altitudes em cada localidade e número de indivíduos amostrados estão na Tabela 1.

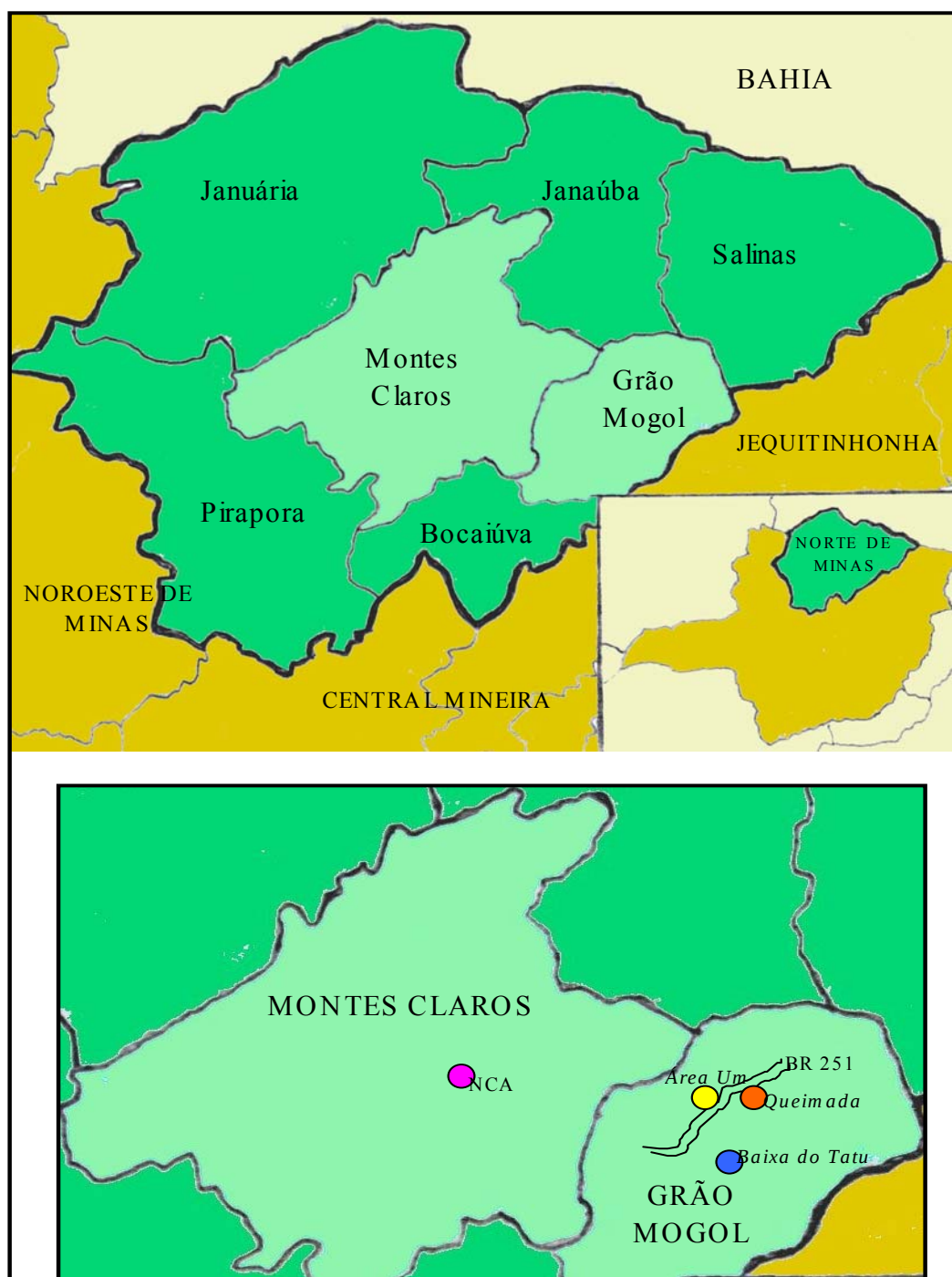


Figura 1: Mapa esquemático das localizações das 4 populações de *S. adstringens* amostradas no Norte de Minas Gerais

Tabela 1: Características dos locais de coletas das amostras de *S. adstringens* e número de indivíduos amostrados.

Município	Localidade	Dimensão	Altitudes	Amostragem
Grão Mogol	Área Um	8,02 ha	902 a 907 m	54 indivíduos
	Queimada	7,38 ha	885 a 898 m	108 indivíduos
	Baixa do Tatu	6,48 ha	831 a 840 m	54 indivíduos
Montes Claros	NCA	-	877 a 923 m	60 indivíduos

As distâncias aproximadas entre as áreas de coleta no município de Grão Mogol são 4,4 km entre a *Área Um* e *Queimada*; 7,6 Km entre *Queimada* e *Baixa do Tatu*; 8,1 Km entre *Área Um* e *Baixa do Tatu*. A *Área Um* e *Queimada* encontram-se moderadamente conservadas. A *Baixa do Tatu* e *NCA* estão, aparentemente, melhor conservadas possuindo árvores de grande porte tanto de *S. adstringens* quanto de outras espécies arbóreas. Porém, a população *NCA* está isolada de outras populações, situa-se em topo de morro cercada no entorno por vegetação de Mata Seca.

Com intuito de analisar a estrutura genética destas populações, foram coletadas, no mês de maio de 2006, folhas maduras de indivíduos adultos em cada população (Tabela 1). Na coleta, transporte e armazenamento foram mantidas, ao máximo, a integridade e turgescência das folhas. No ato da coleta as amostras foram embaladas em folhas de alumínio, devidamente etiquetadas e, logo em seguida, acondicionadas em nitrogênio líquido, onde permaneceram por aproximadamente 72 horas, até a chegada ao Laboratório de Melhoramento de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.3.2 Análise eletroforética

A identificação aloenzimática foi realizada por meio de técnica de eletroforese horizontal em gel de amido de milho. Foram testados onze sistemas enzimáticos: Fosfatase-ácida (ACP), Glutamato-oxaloacetato-transaminase (GOT), Leucina-aminopeptidase (LAP), Chiquimato-desidrogenase (SKDH), Álcool-desidrogenase (ADH), Esterase (EST), Peroxidase (PO), Fosfogluco-isomerase (PGI), Fosfoglucomutase (PGM), Malato-desidrogenase (MDH), Isocitrato-desidrogenase (IDH).

2.3.2.1 Extração enzimática

Na extração enzimática as amostras foram maceradas em almofariz de porcelana previamente congelado. Foi utilizado 1 grama de tecido foliar por 3 mL da solução extratora nº 1 (Tabela 2), recomendação Alfenas et al. (2006). O macerado foi absorvido por retângulos de papel medindo cerca de 0,8 x 0,4 cm. A concentração de PVP-40 foi ajustada de 2,56% para 12%. O pH foi ajustado para aproximadamente 8,5.

Tabela 2: Solução extratora empregada na extração de enzimas de tecidos foliares de *S. adstringens*.

Componentes	Quantidade
Fosfato de sódio bibásico	0,6 g
Sacarose	7 g
PVP-40	2,56 g
DTT	50 mg
L-ácido ascórbico	100 mg
de DIECA	100 mg
Bissulfito de sódio	50 mg
Borato de sódio (bórax)	50 mg
β -mercaptoetanol	0,2 mL
polietilenoglicol – 6000	1 g
Água desionizada	100mL

2.3.2.2 Preparo do gel

No preparo do gel foram utilizados 12 g de sacarose e 60 g de amido de milho por 500 mL de solução-tampão do gel. O composto foi cozido cerca de três minutos em forno microondas, logo após, vertido em cubas de eletroforese horizontal. Ao atingir a temperatura ambiente foi posto em geladeira até ser utilizado no dia seguinte.

Os géis foram retirados da geladeira e com bisturi foi feito um corte transversal a aproximadamente 4 cm da extremidade catodal. A parte menor do gel foi afastada e os retângulos de papel contendo as amostras foram aplicados em número de 9 em cada gel. Cada retângulo de papel correspondeu à amostra de um indivíduo. Nas extremidades do gel foram inseridos papelotes de azul-de-bromofenol que permitem visualizar a frente de migração e o término da corrida. Em seguida as duas partes do gel foram reunidas e seguiu-se a corrida eletroforética

2.3.2.3 Sistemas tampão gel/eletrodo

Foi utilizado o sistema tampão gel/eletrodo SOLTIS 6 recomendado por Soltis et al. (1983), (Tabela 3). A solução tampão do gel foi ajustada de maneira que cada litro foi constituído por 940 mL de solução-tampão do gel e 60 mL da solução-tampão do eletrodo, o pH foi ajustado para 7,8.

Tabela 3: Sistemas tampões gel e eletrodos usados no processo de eletroforese de isoenzimas de *S. adstringens*.

Tampão		Composição
Solução-tampão do gel	Tris	0,015 M
	Ácido Cítrico	0,004 M
Solução-tampão dos eletrodos	NaOH	0,1 M
	Ácido Bórico	0,3 M

2.3.2.4 Condições eletroforéticas

Cada cuba com o gel foi colocada entre duas outras cubas com os eletrodos e 100 mL de solução tampão. Na conexão do gel às cubas contendo os eletrodos, foi utilizado tecido dobrado tipo “perfex”. Inicialmente, foi procedida a pré-corrida durante 30 minutos (15 mA). Após este período os retângulos de papel contendo as mostras foram retirados e a corrida reiniciada (35 mA), por cerca de 5 horas ou, até a cor do azul-de-bromofenol atingir aproximadamente 9 cm no gel a partir da origem. As corridas eletroforéticas foram realizadas em geladeira a 4 °C.

2.3.2.5 Revelação de bandas

Após a corrida eletroforética mediante o uso de fio de cobre, o gel foi cortado horizontalmente em fatias de aproximadamente 2 mm de espessura, sendo a primeira e última fatia das extremidades descartadas. As laminas restantes foram incubadas em solução reveladora por período apropriado a cada sistema enzimático, conforme recomendado por Alfenas et al. (2006). Após a revelação das bandas os géis foram lavados em água corrente e mergulhados em solução aquosa de glicerina 10% por cerca de 24 horas.

2.3.2.6 Secagem dos géis

Cada lâmina do gel foi colocada sob uma folha de papel-celofane previamente estendida sob uma placa de vidro e, uma segunda folha de papel-celofane foi estendida sob o gel. As margens dos papéis-celofane foram dobradas no sentido da superfície inferior da placa vidro, permanecendo, desta forma, no balcão do laboratório até a secagem (Alfenas et al., 2006).

2.3.2.7 Leitura das bandas

Os géis foram examinados com auxílio de diafanoscópio. Na interpretação dos zimogramas foi considerada, previamente, a estrutura quaternária da enzima em questão (Alfenas et al., 2006). Na verificação dos padrões de bandas, maior atenção foi dada na identificação de locos e respectivos alelos. Pois, o estudo da estrutura genética das populações foi baseado nas frequências alélicas aloenzimáticas.

2.3.3 Variabilidade genética

A partir da interpretação dos zimogramas foram definidos os genótipos de cada indivíduo. Procederam-se as estimativas das frequências alélicas e foram calculadas as principais medidas de variabilidade genética, a saber: a) o número médio de alelos por loco, obtido a partir da média aritmética do número total de alelos na população pelo número total de locos, b) o número efetivo de alelos por locos polimórficos, obtido pela razão entre o número total de alelos por locos polimórficos e o número de locos polimórficos, c) a proporção de locos polimórficos por população, calculada pela divisão do número de locos polimórficos (frequência do alelo mais comum $< 0,95$) pelo número total de locos analisados, d) a heterozigose média observada e esperada no equilíbrio de Hardy & Weinberg.

2.3.4 Estrutura genética

A estatística utilizada para quantificar o grau de fixação gênica nas populações foi o coeficiente F de Wright (1951), definido como a correlação entre dois alelos que se unem na formação do zigoto. Considerando-se que a endogamia e a deriva genética aumentam a proporção de homozigotos na população, esses efeitos foram medidos em termos de desvios nas proporções esperadas de heterozigotos no equilíbrio de Hardy-Weinberg. No cálculo das estimativas F , definiu-se H_I como a média da frequência de indivíduos heterozigotos observados dentro das subpopulações. Este valor foi comparado com duas outras medidas H_S e H_T , que são, respectivamente, a média das frequências esperadas de heterozigotos dentro das subpopulações e a frequência esperada de heterozigotos na população total (Hartl & Clark 1989; Robinson, 2006). Foram obtidas estimativas dos seguintes coeficientes F , referentes aos locos polimórficos com base no número observado e esperado de heterozigotos:

$$F_{IS} = (H_S - H_I)/H_S$$

F_{IS} mede o nível de fixação gênica presente dentro da subpopulações;

$$F_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$$

F_{ST} mede o grau de diferenciação genética entre as subpopulações;

$$F_{IT} = (H_T - H_I)/H_T$$

F_{IT} mede o nível de fixação gênica presente na população total.

Como medida de distância genética entre as populações foi utilizada a estatística D de Nei (1972). A estatística D pressupõe a medida de identidade genética (I), expressa pela

probabilidade de certo alelo de algum loco, tomado ao acaso em duas populações, seja idêntico em relação à probabilidade de que dois alelos do mesmo loco, tomados também ao acaso em cada população, sejam idênticos. A probabilidade J_{PQ} de que dois alelos tomados ao acaso nas populações P e Q sejam idênticos é $J_{PQ} = \sum p_i q_i$. De modo análogo, J_P e J_Q são probabilidades de dois alelos tomados ao acaso dentro de cada uma das populações P e Q, respectivamente, sejam idênticos, nesse caso $J_P = \sum p_i^2$ e $J_Q = \sum q_i^2$ e, a identidade genética (I) é definida por (Dias, 2006):

$$I = J_{PQ} / \sqrt{J_P J_Q}$$

p_i e q_i são as frequências do alelo i nas populações P e Q

A distância genética (D) foi obtida pelo cologaritmo neperiano de I, calculada como:

$$D = - \ln (I)$$

Foram estimadas as medidas de diversidade genética propostas por Nei (1973, 1978), a saber: a heterozigosidade (H), a heterozigosidade referente a população total (H_T), a variabilidade genética dentro das subpopulações (H_S), o componente de variabilidade atribuível à diferenciação entre as subpopulações (D_{ST}) e, a proporção da variabilidade total devida a entre as subdivisões da populações (G_{ST}). A heterozigosidade (H) foi calculada por:

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

p_i a frequência do alelo i na população. Para locos múltiplos calcula-se a média aritmética dos valores de H sobre todos os locos;

O grau de diferenciação entre subpopulações foi estimado decompondo-se a heterozigosidade total H_T referente à população total em seus componentes:

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

H_S é o componente da diversidade dentro das subpopulações e corresponde a média ponderada dos valores da heterozigosidade calculados para as mesmas. O componente de variabilidade atribuível à diferenciação entre as populações (D_{ST}) foi calculado por:

$$D_{ST} = H_T - H_S$$

A variabilidade total explicada por diferenças genéticas entre as subdivisões da população foi obtida por:

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

Alguma migração é requerida de modo a prevenir a substancial divergência genética entre as subpopulações como resultado da deriva genética aleatória. Esse efeito pode ser quantificado considerando-se o modelo de deriva genética aleatória e a taxa de migração m segundo o Modelo Ilha no equilíbrio de Wright (Hartl & Clark, 1989):

$$F = 1/(4Nm + 1)$$

Este modelo implica que F diminui quando o número de migrantes aumenta. Estimativas indiretas do fluxo gênico foram obtidas a partir da relação entre F no equilíbrio e o número de migrantes por geração por (Slatkin, 1993):

$$Nm = 1/4(1/F_{ST} - 1)$$

Estimativas dos tamanhos efetivos (N_e) intrapopulacionais foram obtidas segundo Vencovsky (1997), por ser o método mais utilizado por conservacionistas. O Estimador N_e para indivíduos adultos de uma simples população (intrapopulacional) foi calculado como:

$$N_e = n/(1 + f)$$

n = número de indivíduos

f = coeficiente de endogamia médio da população;

Na análise de agrupamento foi utilizado o método hierárquico aglomerativo UPGMA. Esta técnica multivariada visa classificar n itens (populações, clones, indivíduos etc.) avaliados pelo conjunto de p caracteres ou variáveis, a partir de alguma medida de distância entre os itens. Inicialmente a matriz de distância é gerada a partir da amostra dos n itens, totalizando $n(n-1)/2$ pares de distâncias. A seguir é aplicado o algoritmo de agrupamento à matriz de distância de modo a conectar grupos homogêneos. Tais grupos são representados graficamente na forma de diagrama de árvore denominado “dendrograma”. Esse método se processa em séries sucessivas de fusões. Os n itens são classificados em $n-1$, $n-2$ etc., grupos que, por sua vez são igualmente fundidos até todos os itens serem agregados em um único grupo. A distância entre os itens é o critério aplicado que define os grupos. Esta técnica é exploratória e visa à geração de hipóteses a partir da análise de dados multivariados (Dias, 2006; Hartl & Clark 1989). No presente trabalho, foi aplicado à matriz de distância de Nei (1972), o algoritmo de agrupamento UPGMA, de modo alocar itens em grupos semelhantes, e conectar grupos homogêneos.

Realizou-se a análise de variância de heterozigosidade acordo com o modelo hierárquico desbalanceado proposto por WEIR, 1996. Todas as análises estatísticas procedidas neste trabalho foram realizadas pelo Programa GENES (Cruz. 2006).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Análise eletroforética

Foram conduzidos testes com os sistemas enzimáticos Fosfatase-ácida (ACP), Glutamato-oxaloacetato-transaminase (GOT), Leucina-aminopeptidase (LAP), Chiquimato-desidrogenase (SKDH), Álcool-desidrogenase (ADH), Esterase (EST), Peroxidase (PO), Fosfogluco-isomerase (PGI), Fosfoglucomutase (PGM), Malato-desidrogenase (MDH), Isocitrato-desidrogenase (IDH). Destes, somente os sistemas MDH, EST PGI e PO foram selecionados, pois, tiveram polimorfismo, boa resolução e constância de bandas.

No estudo da estrutura genética de populações naturais a variabilidade genética é quantificada e, sua distribuição dentro e entre populações descrita. Tendo como objetivo quantificar e descrever a variabilidade genética é necessário haver polimorfismo, por tanto, no presente trabalho foram considerados na análise dos dados apenas aloenzimas. O sistema IDH foi, aparentemente, polimórfico e teve boa resolução de bandas, porém, com alelo nulo, o que dificulta estimativas das frequências alélicas, sendo por isso, descartado na análise dos dados.

Uma das causas da ausência de bandas ou inexistência de atividade enzimática é a síntese de substâncias pela planta que visam protegê-la de herbívoros, como resinas, pectinas, e principalmente polifenóis, Kephart (1990). Compostos fenólicos reagem com proteínas e inativam enzimas ou alteram a mobilidade das moléculas de proteínas, o que resulta em artefatos no gel (Alfenas et al., 2006). Segundo Ardisson et al. (2002), a casca de

S. adstringens contém cerca de 30,8% de polifenóis totais. Provavelmente, devido às altas concentrações de compostos fenólicos nas folhas, na extração enzimática foi necessário adicionar à solução extratora 12% de PVP, concentrações menores resultaram em artefatos no gel.

2.4.2 Interpretação genética dos zimogramas

Na interpretação dos zimogramas foi usado com ponto de partida o conhecimento prévio da estrutura quaternária da enzima (Brune et al., 2006).

Peroxidase (PO)

Foram observadas duas regiões de atividade no gel, formadas por dois locos (Figura 2). Um monomórfico, fixado (*po-1*). O outro polimórfico (*po-2*) com três alelos, os quais foram denominados: *a* para o alelo de migração mais rápida, *b* para o alelo com migração intermediária e *c* para o alelo com migração mais lenta. Foram observadas bandas na região catodal, mas, estas foram inconstantes e tiveram resolução inadequada, não sendo submetidas à interpretação genética. A enzima foi considerada monomérica, pois não foram observadas bandas híbridas produzidas por indivíduos heterozigotos. O padrão de bandas depende do número de alelos presente no loco e da estrutura quaternária da enzima. Enzimas monoméricas são constituídas de uma única cadeia polipeptídica; isômeros monoméricos de um heterozigoto apareceram no zimograma como uma mistura de aloenzimas produzidas por dois homozigotos correspondentes. Esta observação está de acordo com Brune et al. (2006), que menciona a enzima Peroxidase como monomérica.

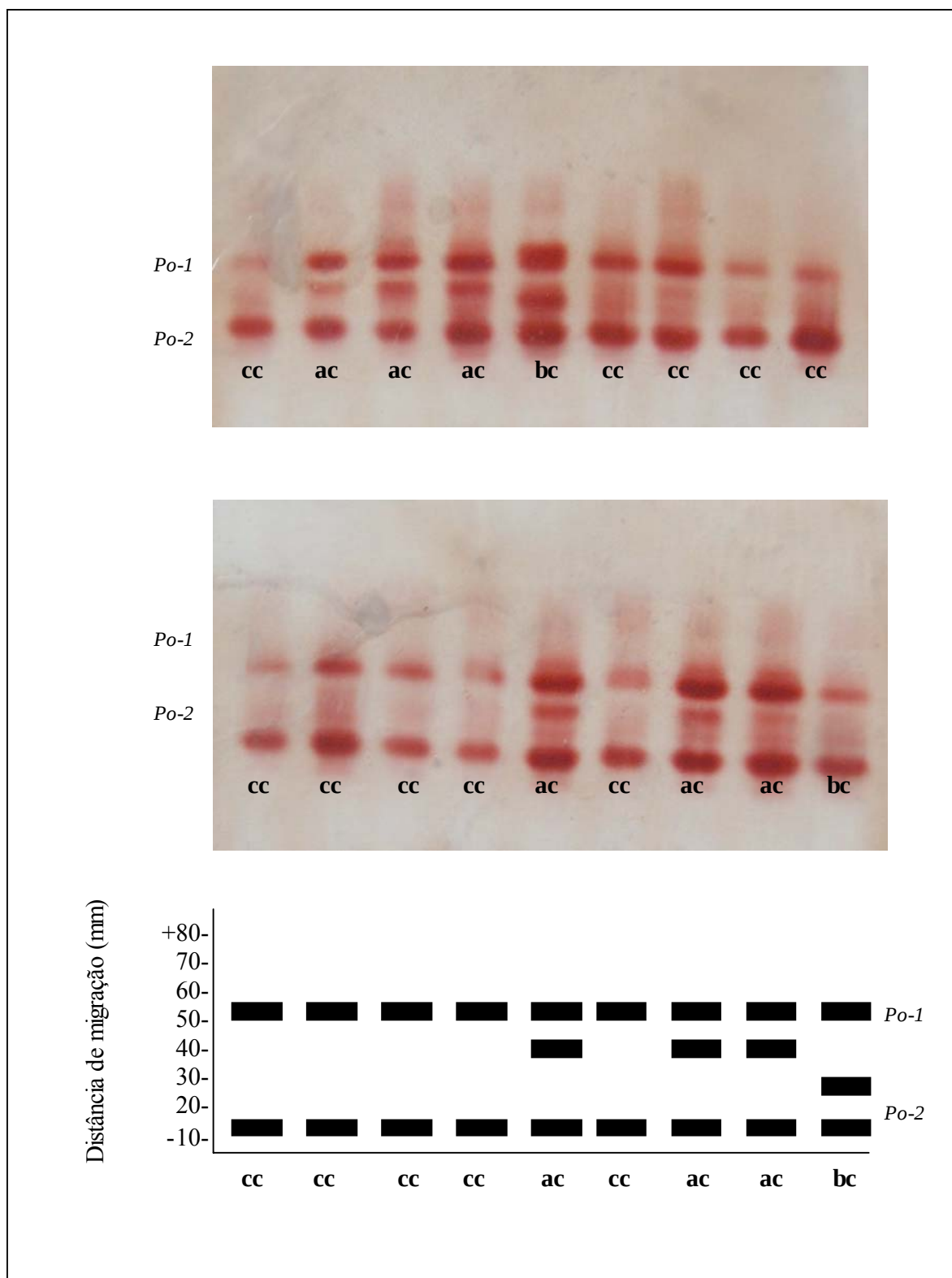


Figura 2. Gel e zimograma da enzima Peroxidase (PO) em tecidos foliares de *S. adstringens*.

Malato desidrogenase (MDH)

Foi observada apenas uma região de atividade nos géis, correspondendo a um loco com dois alelos denominados *a*, para o alelo de migração rápida e, *b* para o de migração lenta (Figura 3). Foram observadas bandas híbridas produzidas por indivíduos heterozigotos correspondentes ao padrão de enzima dimérica. Bandas híbridas não podem ocorrer exceto quando diferentes alelos, que codificam diferentes cadeias polipeptídicas de uma mesma enzima, estejam presentes no mesmo indivíduo (Alfenas et al., 2006). Esta observação está de acordo com Brune et al. (2006), que menciona ser a enzima MDH composta por 2 ou 4 subunidades.

Fosfoglucoisomerase (PGI)

Foram observadas duas regiões de atividade enzimática formadas por dois locos (Figura 4). Um monomórfico, fixado (*pgi-1*). O outro polimórfico (*pgi-2*) contendo dois alelos, denominados *a* e *b* de migração rápida e lenta, respectivamente. A enzima foi considerada dimérica devido ao padrão de bandas híbridas produzidas nos indivíduos heterozigotos, observadas no loco *pgi-2*. Esta verificação está de acordo com Brune et al. (2006), que menciona a enzima PGI como formada por duas cadeias polipeptídicas, ou seja, duas subunidades.

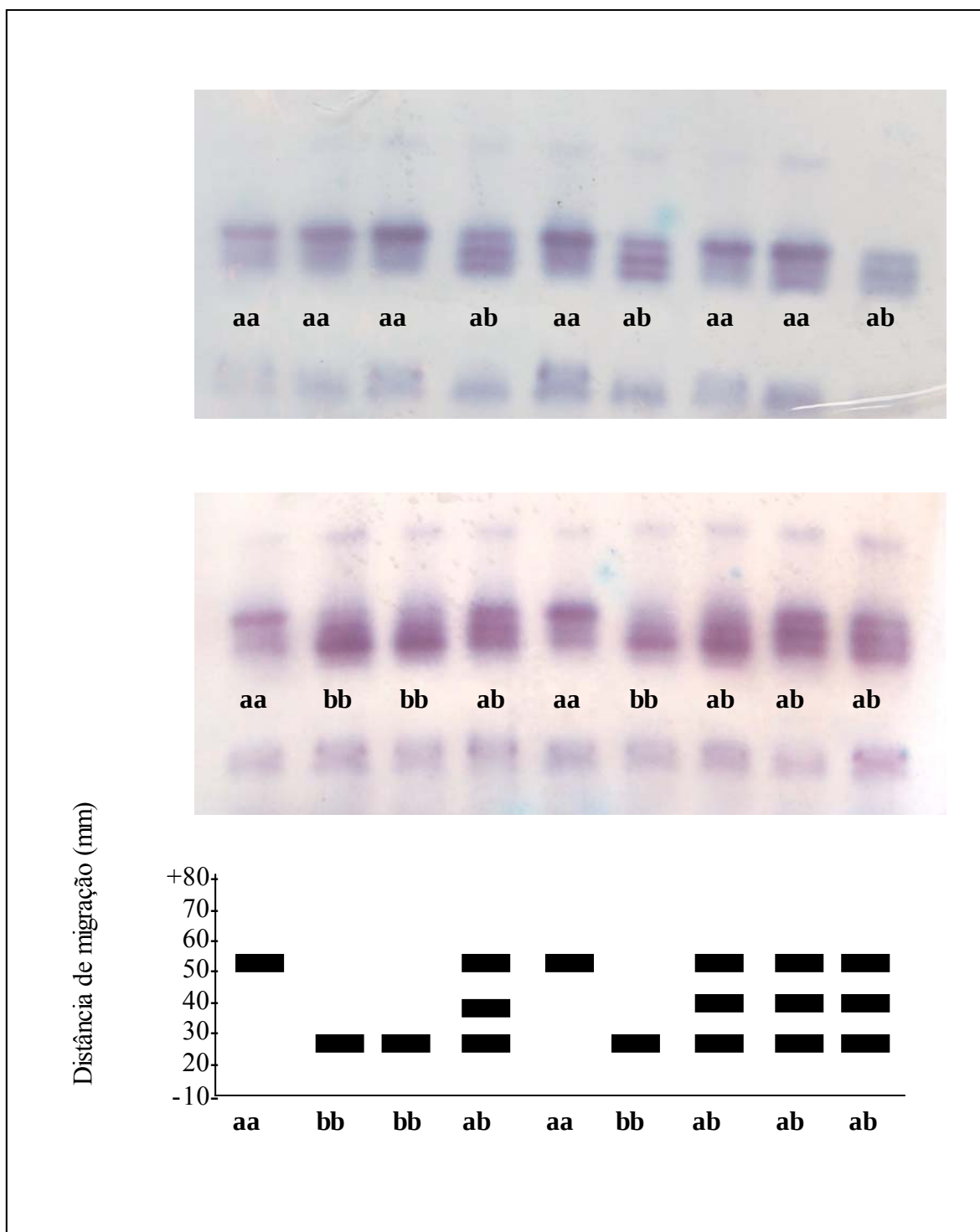


Figura 3. Gel e zimograma da enzima Malato-desidrogenase (MDH) em tecidos foliares de *S. adstringens*.

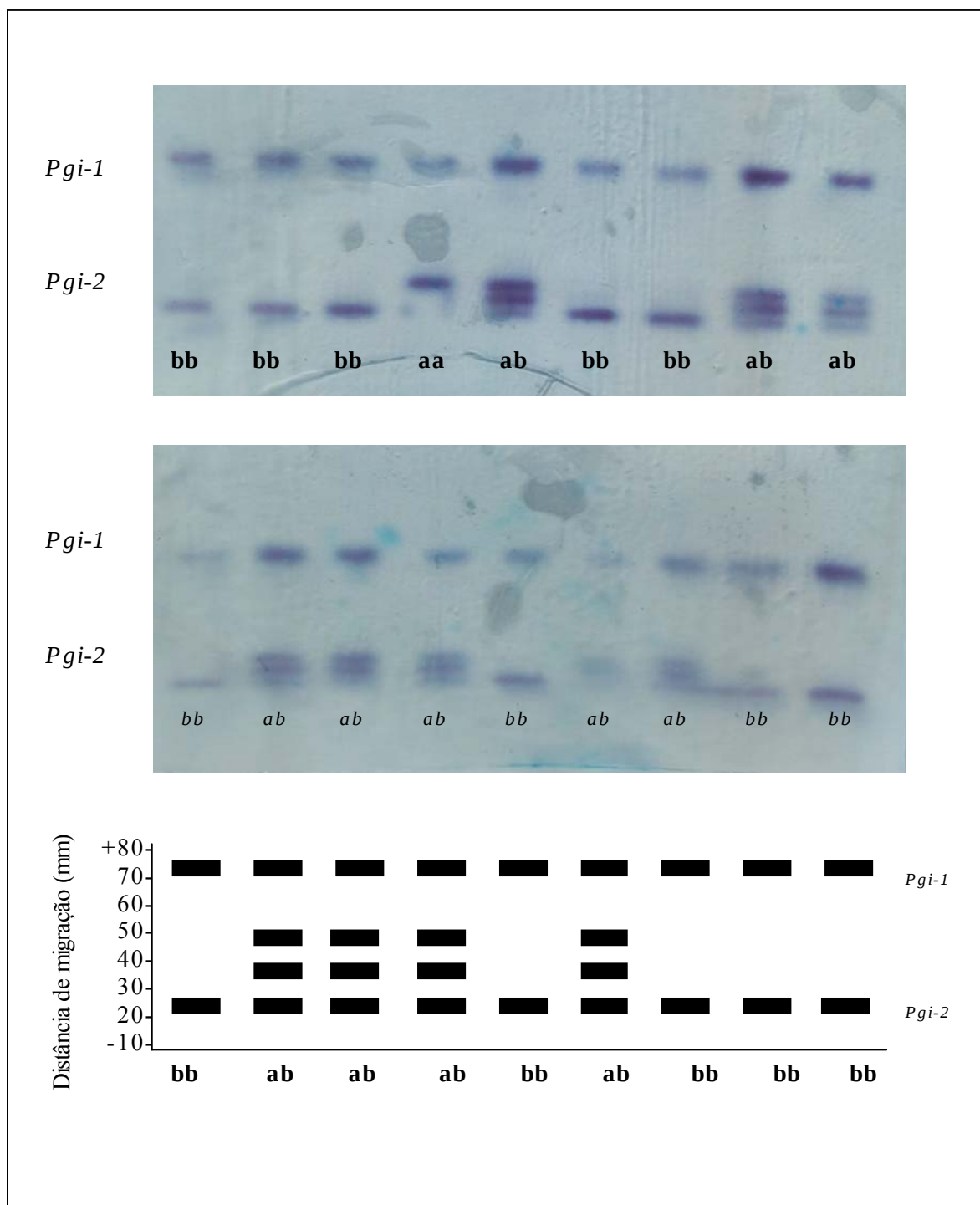


Figura 4. Gel e zimograma da enzima Fosfoglucoisomerase (PGI) em tecidos foliares de *S. adstringens*.

Esterase (EST)

Segundo Bune et al. (2006), a enzima esterase pode ser monomérica ou dimérica. No presente trabalho foi considerada monomérica pois, não foram verificadas bandas híbridas nos indivíduos heterozigotos. Foram observadas duas regiões de atividade formadas por dois locos (*est-1* e *est-2*), ambos polimórficos (Figura 5). No loco *est-1* foram verificados dois alelos, denominou-se *a* o alelo de migração mais rápida e *b* o alelo com migração mais lenta. No loco *est-2* foram observados três alelos denominados *a*, *b* e *c*, com migrações rápida, intermediária e lenta, respectivamente.

Isocitrato desidrogenase (IDH)

Foi verificada na enzima IDH a presença de alelos nulos. De acordo com Brune et al. (2006), a enzima IDH é dimérica ou oligomérica. Alelos nulos controlam isoenzimas que não expressam atividade durante o processo de coloração. Podem representar enzimas defeituosas ou enzimas instáveis sob os processos utilizados na extração ou eletroforese (Robinson, 2006). O uso de marcadores co-dominantes é vantajoso pois permite distinguir genótipos heterozigotos e, aplicar modelos matemáticos mais elaborados que utilizam estimativas das frequências alélicas na análise dos dados. Alelos nulos podem dificultar e introduzir erros nas estimativas das frequências alélicas, portanto, a enzima IDH não foi considerada na análise da estrutura genética das populações amostradas, apesar da boa resolução de bandas.

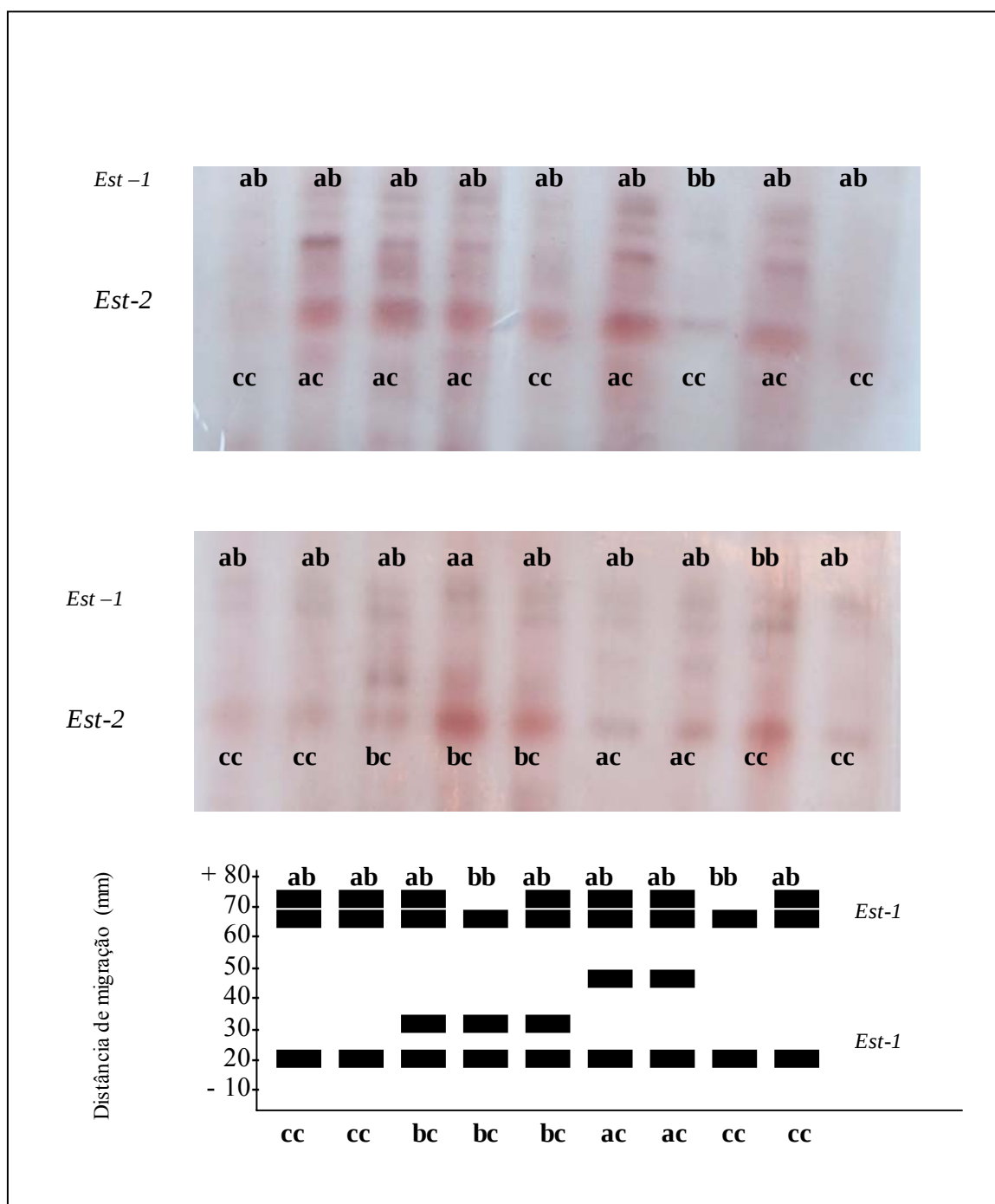


Figura 5. Gel e zimograma da enzima Esterase (EST) em tecidos foliares de *S. adstringens*.

2.4.3.1 Variabilidade genética

Obedecendo ao critério de polimorfismo em que o alelo mais comum de cada loco tem frequência inferior ou igual 95%, foi verificado 100% de polimorfismo nas populações *Área Um*, *Queimada* e *Baixa do Tatu* e, 60% na população *NCA*. Em outra espécie típica do cerrado *stricto sensu*, conhecido popularmente como pequi (*Caryocar brasiliense*), também, foi verificado 100% de locos polimórficos para maioria das populações estudadas (de Melo Júnior et al., 2004). No estudo de populações naturais de jacarandá-paulista (*Machaerium villosum*) o polimorfismo dos locos variou de 90% a 100% entre populações (Botrel & Carvalho, 2004).

Nas populações *Área Um* e *Queimada* foram observados maior número médio de alelos (2.40), bem como, maior número total (12) e efetivo (2.40) de alelos por locos polimórficos. Os menores valores foram verificados na população *NCA*, respectivamente 2.00, 10 e 2.33 (Tabela 4). No estudo de populações naturais de jacarandá-paulista, também, foi observada média de 2,4 alelos por loco (Botrel & Carvalho, 2004).

Tabela 4: Descrição da diversidade de alelos por locos polimórficos observada nas amostras populacionais de *S. adstringens*.

População	Locos polimórficos (%)	Número médio	Número total	Número efetivo
<i>Área 1</i>	100	2.40	12	2.40
<i>Queimada</i>	100	2.40	12	2.40
<i>Baixa do Tatu</i>	100	2.20	11	2.20
<i>NCA</i>	60	2.00	10	2.33

Foram verificados desvios significativos das proporções genóticas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg nos locos *esterase-1* e *esterase-2* nas populações *Área Um*, *Queimada* e *Baixa do Tatu*. No loco *malato-desidrogenase* o desequilíbrio foi verificado apenas na população do *NCA*, no loco *peroxidase-2* só foram observadas proporções de equilíbrio na população da *Área Um*. O loco *fosfoglucoisomerase-2* se encontra nas proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações (Tabela 5).

Observou-se a fixação dos alelos *PGI-1* e *PO-1* em todos os indivíduos analisados nas populações, e do alelo *PGI-2.2* na população do *NCA*. Não foi verificada a presença do alelo *EST-2.1* na população do *NCA* e, *PO-2.1* na população *Baixa do Tatu* (Tabela 5). Considerando-se as quatro populações e todos os locos analisados, incluindo os locos monomórficos *fosfoglucoisomerase-1* e *peroxidase-1*, em cerca de 64,29% foram observadas frequências genóticas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 5: Teste χ^2 dos desvios das proporções genotípicas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg para locos aloenzimáticos analisados nas amostras populacionais de *S. adstringens*.

Loco	Populações				
	Alelo	Área Um	Queimada	Baixa do Tatu	NCA
<i>Esterase 1</i>	<i>EST 1.1</i>	0.4537	0.4769	0.5	0.4833
	<i>EST 1.2</i>	0.5463	0.5231	0.5	0.5167
		**	**	**	ns
<i>Esterase 2</i>	<i>EST 2.1</i>	0.4815	0.2963	0.2685	0.0
	<i>EST 2.2</i>	0.0833	0.1343	0.1296	0.0083
	<i>EST 2.3</i>	0.4352	0.5694	0.6019	0.9917
		**	**	*	ns
<i>Fosfoglucoisomerase 1</i>	<i>PGI 1</i>	1	1	1	1
		ns	ns	ns	ns
<i>Fosfoglucoisomerase 2</i>	<i>PGI 2.1</i>	0.1481	0.1944	0.2222	0.0
	<i>PGI 2.2</i>	0.8519	0.8056	0.7778	1.0
		ns	ns	ns	ns
<i>Malato Desidrogenase</i>	<i>MDH 1.1</i>	0.8241	0.7870	0.8704	0.9167
	<i>MDH 1.2</i>	0.1759	0.2130	0.1296	0.0833
		ns	ns	ns	**
<i>Peroxidase 1</i>	<i>PO 1</i>	1	1	1	1
		ns	ns	ns	ns
<i>Peroxidase 2</i>	<i>PO 2.1</i>	0.1389	0.0370	0.0	0.35
	<i>PO 2.2</i>	0.0926	0.3148	0.3241	0.0833
	<i>PO 2.3</i>	0.7685	0.6481	0.6759	0.5667
		ns	**	**	**
Total (N)		54	108	54	60

n.s. não significativo;

** significativo ao nível de 1% de probabilidade;

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

2.4.3.2 Estrutura genética

As heterozigosidades observadas (H_O) nas populações variaram entre 0.2900 e 0.5926 e as esperadas (H_S) entre 0.2436 e 0.4394 (Tabela 6). As H_O foram maiores do que as H_S em todas as populações, conseqüentemente, os índices de fixação (F_{IS}) foram negativos indicando excesso de genótipos heterozigotos. A menor discrepância entre os valores de heterozigosidades observadas e esperadas foi verificada na população NCA. Estas estimativas podem consideradas altas se comparadas as da espécie arbórea *Cryptocaria aschersoniana* da Mata Atlântica em que foram observados índices de fixação positivos indicando deficiência de heterozigotos (Moraes & Derbyshire, 2002). Porém, estes valores são similares aos verificados na espécie florestal pioneira *Trema micrantha* e em *Cryocar brasiliense*, nos quais foram verificados índices de fixação negativos (de Melo Júnior et al., 2004; Ribas & Kageyama, 2004).

Tabela 6 – Heterozigosidades observadas e esperadas, índice de fixação de Wright (1951) e tamanhos efetivos das amostras populacionais de *S. adstringens*.

População	n	H_O	H_S	F_{IS}	Ne	Ne/n
Área 1	54	0.5333	0.3983	-0.3389	81.68	1.51
Queimada	108	0.5926	0.4394	-0.3486	165.79	1.54
Baixa do Tatu	54	0.5704	0.4117	-0.3855	87.88	1.63
NCA	60	0.2900	0.2436	-0.1905	74.12	1.24
Total	276					

n = total de indivíduos amostrados na população; H_O = heterozigosidade observada na população; H_S = heterozigosidade esperada na população; F_{IS} = índice de fixação intrapopulacional; Ne = tamanho efetivo intrapopulacional, Ne/n = representatividade da amostra populacional.

A avaliação da representatividade genética das amostras pode ser feita por meio do tamanho efetivo populacional (N_e), parâmetro crucial no julgamento do impacto da deriva sobre a estrutura genética de populações (Moraes & Derbyshire, 2002). Nas quatro populações analisadas as estimativas de N_e foram superiores ao número de indivíduos amostrados. Sob o contexto intrapopulacional os 54 indivíduos adultos amostrados na *Área Um* correspondem a N_e de 81,68 indivíduos. De forma semelhante os tamanhos efetivos encontrados foram 165,79, 87,88 e 74,12 para os 108, 54 e 60 indivíduos amostrados, respectivamente, na *Queimada*, *Baixa do Tatu* e *NCA*. Tais resultados indicam que houve adequada representatividade genética nas amostras obtidas. A partir da fórmula $N_e = n/(1+f)$ observa-se que a endogamia reduz o tamanho efetivo populacional. Os valores negativos de f nas quatro populações levaram a estimativas N_e maiores que o número de indivíduos amostrados. N_e , neste contexto, representa o número de indivíduos em uma população teórica ideal, que teria a mesma magnitude de deriva genética aleatória que a população atual (Hartl, & Clark, 1989).

Tabela 7: Heterozigosidades observadas e esperadas e, índices de fixação por locos analisados nas amostras populacionais de *S. adstringens*.

Loco	H_O	H_S	H_T	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
<i>EST 1</i>	0.8440	0.4997	0.4994	-0.6888	0.0	-0.6901
<i>EST 1</i>	0.4833	0.3715	0.4558	-0.3011	0.1850	-0.0604
<i>PGI 2</i>	0.2593	0.2294	0.2429	-0.1301	0.0556	-0.0672
<i>MDH 1</i>	0.2259	0.2531	0.2562	0.1074	0.0121	0.1182
<i>PO-2</i>	0.6704	0.4369	0.4461	-0.5345	0.0206	-0.5028
Média	0.4966	0.3581	0.3801	-0.3866	0.0578	-.3065

H_O = heterozigosidade observada; H_S = heterozigosidade esperada nas populações; H_T = heterozigosidade esperada na população total; F_{IS} = índice de fixação intrapopulacional; F_{ST} = diferenciação genética entre as populações; F_{IT} = índice de fixação metapopulacional.

Na Tabela 7 são apresentadas as estimativas de heterozigosidades e dos índices de fixação (F) por locos isoenzimáticos. A heterozigosidade média observada foi 0.4966, as heterozigosidades médias esperada nas populações (H_S) e na população total (H_T) foram, respectivamente, 0.3581 e 0.3801. As estimativas das estatísticas F indicam ausência de endogamia e excesso de heterozigotos dentro ($F_{IS} = -0.3866$) e, no conjunto das populações ($F_{IT} = -0.3065$). Resultados similares foram observados em *Caryocar brasiliense* onde, também, foi verificado excesso de heterozigotos dentro das populações e, no conjunto das mesmas ($f = 0,449$ e $F = -0,420$) (de Melo Júnior et al., 2004). Nas populações de *Eugenia dysenterica*, estudadas por Campos Telles et al. (2003), foi verificado certo grau de endogamia ($f = 0,243$ e $F = 0,442$). Em *Cryptocarya moschata* (Moraes et al., 1999), apesar de haver deficiência de heterozigotos, a maioria dos locos dentro das populações está nas proporções genotípicas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($f = -0,0207$ e $F = 0,0963$). Em *Machaerium villosum* foi observado excesso de heterozigotos no conjunto das populações $F = -0.121$ (Brotel & Carvalho, 2004).

Observou-se maior quantidade de heterozigotos no loco *EST-1* (0.8440) e menor no loco *MDH-1* (0.2259). Na maioria dos locos analisados nas populações de *Cryptocarya moschata* e *Cryptocarya aschersoniana* foi verificado déficit de heterozigotos (de Moraes et al., 1999, 2002). Em *Eugenia dysenterica* houve deficiência de heterozigotos em todos os locos analisados (Campos Telles et al., 2003). Em *Caryocar brasiliense* foi verificado excesso de heterozigotos na maioria dos locos (de Melo Júnior et al., 2004).

A divergência populacional (F_{ST}) não foi igualmente observada entre os locos. Maior diferença nas frequências alélicas entre as populações foi devida ao loco *EST-2* ($F_{ST} = 0,1850$), enquanto o loco *EST-1* não contribuiu na divergência populacional ($F_{ST} = 0$). Considerando-se as quatro populações $F_{ST} = 0,0578$, este valor é maior do que o observado em *Caryocar brasiliense* ($F_{ST} = \theta_P = 0,0200$) e, menor do que em *Eugenia dysenterica* ($F_{ST} = \theta_P = 0,1540$), ambas espécies típicas do cerrado *stricto sensu*. Em jacarandá-paulista $F_{ST} = \theta_P$ foi 0.061, em *Cryptocarya aschersoniana* 0,1146 e, em *Trema micrantha* 0,039.

A estatística F mede a correlação entre os gametas se unindo. A endogamia e a deriva genética são fenômenos que se sobrepõem, pois, a deriva resulta no aumento da

probabilidade de reunir genes oriundos de um ancestral devido à perda de variabilidade genética. O coeficiente de endogamia é a probabilidade de um indivíduo ser autozigoto nos alelos de determinado gene autossômico. A chance de que certo alelo “sorteado” em certo indivíduo seja idêntico por descendência a outro alelo “sorteado” em outro indivíduo é o coeficiente de coancestria. O coeficiente de endogamia é igual ao coeficiente de coancestria dos pais do indivíduo em questão (Hartl & Clark, 1989).

O coeficiente de endogamia ou índice de fixação total do indivíduo (F_{IT}) inclui contribuições devidas ao acasalamento não aleatório dentro das subpopulações (F_{IS}) e devidas à própria subdivisão (F_{ST}). O valor F_{IT} quantifica a redução de heterozigosidade do indivíduo em relação a população total, F_{IT} é a correlação entre os gametas se unindo em relação a gametas “sorteados” aleatoriamente a partir da população total. F_{IS} mede a redução de heterozigosidade do indivíduo em relação a subpopulação, F_{IS} é a correlação entre os gametas se unindo em relação a gametas “sorteados” aleatoriamente dentro da subpopulação (ou a média das subpopulações). F_{ST} é a correlação entre os gametas “sorteados” aleatoriamente dentro das subpopulações em relação a gametas “sorteados” aleatoriamente a partir da população total. F_{ST} refere-se a outros efeitos que não endogamia e indica se há diferenças entre as frequências alélicas das subpopulações (Hartl & Clark 1989).

Tabela 8: Estimativas de diversidade genética G_{ST} (Nei, 1973, 1978) das amostras populacionais de *S. adstringens*.

Loco	Populações						
	Alelo	A1	Q	BT	NCA	MP	*H _T
<i>Esterase 1</i>	EST 1.1	0.4537	0.4769	0.5	0.4833	0.4783	
	<i>EST 1.2</i>	0.5463	0.5231	0.5	0.5167	0.5217	
H		0.4957	0.4989	0.5	0.4994		0.4990
<i>Esterase 2</i>	<i>EST 2.1</i>	0.4815	0.2963	0.2685	0.0	0.2627	
	<i>EST 2.2</i>	0.0833	0.1343	0.1296	0.0083	0.0960	
	<i>EST 2.3</i>	0.4352	0.5694	0.6019	0.9917	0.6413	
H		0.5718	0.5699	0.5489	0.165		0.5105
<i>Fosfoglucoisomerase</i>	<i>PGI 1.1</i>	0.1481	0.1944	0.2222	0.0	0.1485	
	<i>PGI 1.2</i>	0.8519	0.8056	0.7778	1.0	0.8515	
H		0.2524	0.3133	0.3457	0.0		0.2529
<i>Malato Desidrogenase 2</i>	<i>MDH 2.1</i>	0.8241	0.7870	0.8704	0.9167	0.8388	
	<i>MDH 2.2</i>	0.1759	0.2130	0.1296	0.0833	0.1612	
H		0.2900	0.3352	0.2257	0.1528		0.2704
<i>Peroxidase 2</i>	<i>PO 2.1</i>	0.1389	0.0370	0.0	0.35	0.1177	
	<i>PO 2.2</i>	0.0926	0.3148	0.3241	0.0833	0.2228	
	<i>PO 2.3</i>	0.7685	0.6481	0.6759	0.5667	0.6595	
H		0.3815	0.4794	0.4381	0.5494		0.5016
* H _S		0.3983	0.4393	0.117	0.2436		
** H _S 0.3833		D _{ST} 0.0236	G _{ST} 0.0579	** H _T 0.4069			

A1 = Área 1; Q = Queimada; BT = Baixa do Tatu; NCA = população perto da pedreira; MP = média ponderada das frequências alélicas; H = frequência esperada de heterozigotos; *H_T = heterozigosidade total esperada por loco para todas as populações; **H_T = heterozigosidade total esperada para todos os locos em todas as populações; *H_s = heterozigosidade esperada para todos os locos em cada população, **H_s = heterozigosidade média esperada nas populações; D_{ST} = diferenciação entre populações; G_{ST} = variabilidade total devida às diferenças genéticas.

Conforme a medida de diferenciação genética G_{ST} (Nei, 1973, 1978) a heterozigosidade média esperada nas populações foi $H_S = 0.3833$ e, a heterozigosidade média esperada na população total $H_T = 0.4069$ (Tabela 8). A variabilidade atribuída às diferenças genéticas entre as populações (D_{ST}) foi de 0.0236 e, a razão entre D_{ST} e H_T , a qual expressa a proporção da variabilidade total explicada por diferenças genéticas entre as subdivisões da população (G_{ST}) foi 0.0579. Isso significa que, cerca de 94% da variabilidade genética nesta amostra está contida dentro das subpopulações e cerca de 6% são atribuídos às diferenças entre as subpopulações. Em jacarandá-paulista, foram observados 6,1% de variabilidade genética entre as populações analisadas e 93,9% dentro das populações. Em *Caryocar brasiliense* foram verificados 2% entre as populações e 98% dentro de populações.

O valor G_{ST} (0.0579) foi muito próximo ao valor F_{ST} (0.0578), anteriormente exposto na Tabela 7. De fato, G_{ST} é numericamente equivalente a F_{ST} mas, as duas medidas diferem conceitualmente. F_{ST} mede a fixação gênica, enquanto G_{ST} é independente da distribuição dos genótipos. G_{ST} pode ser considerado estimativa de F_{ST} quando se assume estarem as subpopulações em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($F_{IS}=0$) (Robinson, 2006). Segundo Hartl & Clark (1989) no contexto de locos multialélicos F_{ST} é denotado G_{ST} .

Tabela 9: Estimativas de divergência genética (G_{ST} e F_{ST}) e estimativas indiretas de fluxo gênico (Nm), para pares de amostras populacionais de *S. adstringens*.

Populações	G_{ST}	Nm	F_{ST} (sc)	F_{ST} (cc)	Nm
Área Um e Queimada	0.0141	17.48	0.0091	0.0060	41.42
Área Um e B. Tatu	0.0213	11.49	0.0118	0.0077	32.32
Área Um e NCA	0.0986	2.28	0.1114	0.1074	2.08
Queimada e B. Tatu	0.0021	118,79	0.0025	0.0006	416.42
Queimada e NCA	0.0639	3.66	0.0686	0.0656	3.56
B. Tatu e NCA	0.0721	3.22	0.0641	0.0601	3.91

(sc) = sem correção para o tamanho da amostra; (cc) = com correção para o tamanho da amostra; Nm = número de migrantes.

A migração “age” de forma potente contra a divergência resultante da deriva genética aleatória. Estimativas de Nm (número de migrantes) iguais ou maiores que 1, indicam que o fluxo gênico entre populações é suficiente para impedir a divergência por deriva genética aleatória nas mesmas (Slatkin, 1993). No presente estudo as estimativas de fluxo gênico foram obtidas a partir dos valores G_{ST} e F_{ST} (corrigido).

Os valores Nm obtidos a partir dos estimadores G_{ST} e F_{ST} indicam que as populações possuem grande potencial panmítico. Os valores Nm , extremamente altos, verificados entre as populações *Queimada* e *Baixa do Tatu* possibilitam sugerir tratar-se de uma única população. Observando a fórmula do modelo de deriva genética aleatória em equilíbrio com a taxa de migração m , segundo o modelo Ilha de Wright $F = 1/(4Nm + 1)$, verifica-se que F diminui quando o número de migrantes (m) aumenta. De fato o decréscimo de F com o aumento de Nm é extremamente rápido (Hartl & Clarck, 1989).

Tabela 10: Medidas de distância genética (D) de Nei (1972) obtidas a partir das amostras populacionais de *S. adstringens*.

Populações	Distância Genética
Área 1 e Queimada	0.0139
Área 1 e B. Tatu	0.0179
Área 1 e NCA	0.0640
Queimada e B. Tatu	0.0020
Queimada e NCA	0.0490
B. Tatu e NCA	0.0481

Nas estimativas de distância genética de Nei (1972), foram considerados locos monomórficos conforme discutido por Dias (2006). O valor D , de Nei, é proporcional ao tempo decorrido da divergência e à taxa de substituição gênica por locos e por geração, assumindo taxa constante com o tempo. Maior distância genética foi verificada entre as populações *Área Um* e *NCA*, $D = 0.064$, isso significa que cerca de 6.4 substituições alélicas foram detectadas por eletroforese em cada 100 locos, desde o período em que as populações divergiram a partir da população ancestral. Entre a *Área Um* e a *Queimada*

houve aproximadamente 1,4% de substituições alélicas, possivelmente, esta divergência teve início na época que a população foi dividida pelo asfaltamento da BR 251, cerca de 15 ou 20. Menor distância genética foi observada entre as populações *Queimada* e *Baixa do Tatu*, não atingindo 1%, o que reafirma a unicidade destas populações (Tabela 10).

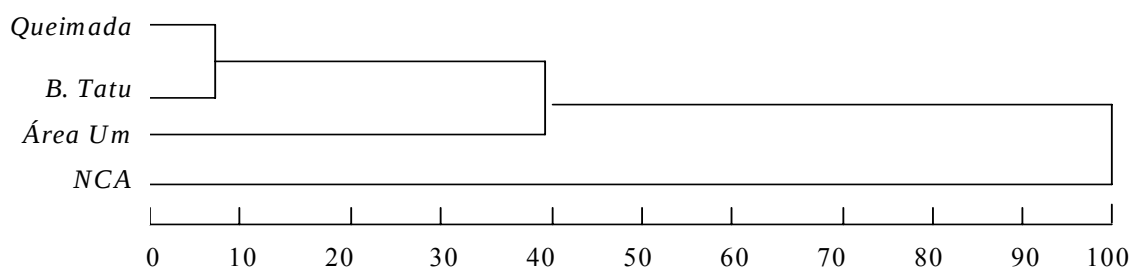


Figura 6: Divergência entre as amostras populacionais de *S. adstringens* segundo o método de agrupamento hierárquico aglomerativo (UPGMA)

De acordo com os resultados obtidos por meio da técnica de agrupamento UPGMA, estas populações podem ser divididas em dois grupos (Figura 6). O primeiro grupo formado pelas populações *Queimada*, *Baixa do Tatu* e *Área Um*, o segundo pela *NCA*. Dentro do primeiro grupo há maior semelhança entre *Queimada* e *Baixa do Tatu*. A *Área Um* parece ter posição intermediária, embora, mais próxima às *Baixa do Tatu* e *Queimada* do que *NCA*. Apesar desta distinção aparente entre as populações, com base nos resultados da análise heterozigosidade Weir (1996), não há divergência genética significativa entre populações (Tabela 11).

Tabela 11: Análise de variância das heterozigosidades observadas nas amostras populacionais de *S. adstringens*.

FV	GL	SQ	QM	F	Significância
<i>Populações</i>	3	55,8606	18,6202	1,5088	0,3881
<i>Indiv./Pop.</i>	428	131,4352	0,3071	2,3576	0,0
<i>Locos</i>	4	48,4815	12,1204	9,0234	0,0013
<i>Locos x Pop</i>	12	16,1186	1,3432	10,3120	0,0
<i>Locos x I/P</i>	1712	222,9999	0,1303		
Total	2159	474.8958			

2.5 CONCLUSÃO

1. De forma geral as frequências alélicas foram similares entre populações, e a maior parte da variação total verificada dentro delas. A baixa divergência genética entre as populações pode ser explicada pelos altos níveis de fluxo gênico. Contudo, deve-se levar em conta que a fragmentação da população total é, relativamente, recente. Talvez não tenha decorrido o tempo necessário para que a divergência genética fosse verificada estatisticamente.

2. As populações *Área Um*, *Queimada* e *Baixa do tatu* são mais semelhantes entre si e divergentes da população *NCA*. Considerando-se apenas as populações de Grão Mogol, a *Queimada* e a *Baixa do Tatu* são mais semelhantes, apesar de terem praticamente a mesma distância da população *Área Um*. Aparentemente, a construção da BR 251 prejudicou o fluxo dos pequenos polinizadores, geralmente abelhas, entre a *Área Um* e as populações *Queimada* e *Baixa do Tatu*.

3. Nas análises por população, considerando-se todos os locos, foram verificados índices de fixação negativos em todas elas, o que, é indicativo de ausência de endogamia e alto potencial panmítico.

4. Nas análises por loco, considerando-se todas as populações, devido aos altos índices de diversidade verificados pode-se sugerir que haja seleção a favor de genótipos heterozigotos nos locos *EST-1*, *EST-2* e *PO-2*. Porém, essa hipótese só pode ser confirmada pela análise de progênies.

5. Foram observadas proporções genótípicas de equilíbrio no loco *MDH* em todas as populações, exceto na população *NCA*. Talvez, haja tendência de perda alélica já que a frequência do alelo *MDH-1* na população *NCA* foi muito baixa e, verificada alta deficiência de genótipos heterozigotos.

6. Deve-se considerar que a população *NCA* teve mais alelos fixados e encontra-se isolada de outras populações, portanto, mais propensa à endogamia. Conforme mencionado, a endogamia reduz consideravelmente a produção de frutos nesta espécie.

7. As estimativas de N_e foram superiores ao número de indivíduos amostrados, indicando adequada representatividade genética nas amostras obtidas.

8. Devido à alta variabilidade genética contida nas populações, aos altos índices de fluxo gênico e, tamanhos efetivos verificados, acredita-se que estratégias visando a conservação da diversidade genética de *S. adstringens* implicam na manutenção de populações com grande número de indivíduos.

3. CAPITULO 2

TEORES DE FENÓIS TOTAIS EM FOLHAS, CASCAS E FRUTOS DE TRES POPULAÇÕES DE *Stryphnodendron adstringens*

3.1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais com finalidades medicamentosas é milenar e a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998) estima que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados da saúde.

Devido à atividade metabólica secundária, os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias com os mais diversos fins. Os compostos fenólicos estão entre as mais difundidas classes de metabólitos secundários. Servem como pigmento das flores, agem na proteção contra pragas e doenças, funcionam como moléculas sinais, atuam como alelopáticos, são componentes estruturais e funcionais da matéria orgânica do solo

(Siqueira et al., 1991). O fenol é o membro mais simples desta classe de compostos e, muitos dos seus derivados, tem atividades anti-sépticas, desinfetantes e anestésicas, sendo encontrado em vários produtos comerciais como sabão, desodorante, desinfetante, solução de gargarejo e cremes contra dores musculares (Barbosa, 1994). Os taninos são substâncias fenólicas mais complexas, em geral polifenóis. São empregados na curtição de peles e de couros. Possuem atividade anti-séptica, antimicrobiana, anti-hemorragica, antidiarréica, cicatrizante e antiinflamatória (Felfili e Borges Filho, 2004).

Várias espécies florestais brasileiras são produtoras de tanino. No gênero *Stryphnodendron*, além de *S. adstringens*, destacam-se *S. pulcherrimum*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum* sendo consideradas medicinais/taníferas, com importância restrita ou local (Rizzini & Mors, 1976; Pio Corrêa, 1926). No entanto, são exploradas comercialmente, apenas o angico e o barbatimão (Teixeira et al., 1990). A intensificação da coleta da cascas de *S. adstringens* está colocando a espécie sob ameaça (Felfili et al., 2004). Apenas com estudos detalhados será possível a obtenções de matéria prima de forma a trazer renda sem desequilíbrio dos ecossistemas.

Considerando a importância de *S. adstringens* como recurso terapêutico e econômico, com o objetivo de fornecer subsídios destinados à coleta sustentável de matéria prima, foram quantificados teores de fenóis totais nas cascas, folhas e frutos de três populações de *S. adstringens*. Como a concentração dos metabólitos secundários depende do controle genético e de estímulos proporcionados pelo meio, adicionalmente, amostras de solo foram coletadas.

3.2 REVISÃO DE LITERATURA

Com importantes exceções a função da maioria dos compostos fenólicos nas plantas, ainda, é obscura. A maior parte parece ser subproduto do metabolismo, porém este ponto de vista reflete o pouco conhecimento da bioquímica ecológica (Salisbury & Ross, 1991, Siqueira et al., 1991).

A exata identidade dos princípios ativos de *S. adstringens* não é conhecida até o momento (Rebecca, et al. 2003; Rebecca, et al. 2002). Entretanto, os taninos exercem diversas atividades biológicas como anti-séptica, antimicrobiana, anti-hemorrágica, antidiarréica, cicatrizante e antiinflamatória e, têm sido apontados, por diversos autores, como responsáveis pelas propriedades medicinais de *S. adstringens* (Rebecca et al., 2003; Rebecca et al., 2002; Santos et al., 2002; Alves et al., 2000).

Os taninos são polifenóis de alto peso molecular solúveis em água, classificados em dois grupos hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis são facilmente hidrolisados por ácidos ou enzimas, liberando o açúcar e o ácido carboxílico fenólico correspondente. Os taninos condensados são polifenóis com peso molecular variado, consistindo de unidades flavonóidicas com vários graus de condensação (Felfili et al., 2004; Mori et al., 1992).

Em 1926 Pio Corrêa relatou que a casca do barbatimão pode conter até 50% de taninos mas, geralmente, este valor não excede 28% e, que a casca de indivíduos crescidos em lugares altos e secos parece mais rica nestes metabólitos. Segundo Rizzini & Mors (1976) e Panizza et al. (1988), a casca contém de 20 a 30% de matéria tanante. Teixeira et al. (1990) coletaram cascas de *S. adstringens* em 10 locais de MG e verificaram que o diâmetro das árvores não interfere na produção de taninos; o teor na casca variou de 10,5% a 27,4% entre as localidades. Os locais de origem, foram responsáveis por 50% da variação total. Ardisson et al. (2002), constataram 30,8% e 29,9% polifenóis totais e taninos em *S. adstringens*, respectivamente.

O grau de polimerização dos taninos é importante fator de atividade biológica. A afinidade de ligação por proteínas ricas em prolina, a atividade anti-radical e antiviral são aumentadas pela polimerização. Santos et al. (2002), observaram alto grau de polimerização nos taninos do gênero *Stryphnodendron* e, que os mesmos são formados por unidades de prodelfinidinas. Observaram, também, a liberação de ácido gálico após hidrólise. Verificaram níveis mais altos de fenóis totais, de ácido gálico e precipitação de proteínas no extrato das cascas de *S. polyphyllum* em relação ao das cascas de *S. adstringens*, a despeito de ambos os estratos mostraram índices similares de taninos condensados. O extrato das folhas de *S. polyphyllum* não diferiu do das folhas de *S. adstringens* (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração de fenóis totais e taninos em mg/g de matéria seca de espécies de barbatimão.

Espécies	Amostra vegetal	Fenóis totais	Taninos condensados	Ácido Gálico	Precipitação de proteínas
<i>S. adstringens</i>	casca	158,7	914,6	72,3	140,4
	folha	138,9	535,5	70,5	114,5
<i>S. polyphyllum</i>	casca	254,3	901,5	117,6	224,6
	folha	133,5	612,7	79,6	137,5

Fonte: Santos et al., 2002.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Coleta das amostras

Foram amostrados, aleatoriamente, 16 indivíduos nas três localidades do município de Grão Mogol, *Área Um*, *Queimada* e *Baixa do Tatu*. De cada indivíduo foram coletados frutos, cascas e folhas maduras. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel e posteriormente secas em estufa durante três dias. Em cada localidade foram, também, tomadas amostras do solo a cerca de 20 cm de profundidade.

3.3.2 Preparo das amostras

Após a secagem, as amostras foram trituradas em moinho de grãos. Foram preparados extratos com 400 mg do pó de cada parte vegetal e 4 mL de metanol 80%.

Estocou-se essa solução à temperatura ambiente por 24 horas, procedendo-se em seguida a filtração.

As análises de fenóis totais dos extratos filtrados foram realizadas pelo método Folin-Ciocalteu (Folin & Ciocalteu, 1927). Sendo adicionado em cubeta 0,020 mL de cada extrato e 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu (solução aquosa 10%) e 0,8 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). A solução foi agitada e ficou em repouso por 30 minutos, após esse período a absorbância foi lida a 760 nm. A curva-padrão foi feita com ácido tânico nas concentrações de 0,02 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,1 mg/mL.

3.3.3 Análise dos teores de fenóis totais e amostras de solo

Na avaliação dos teores de fenóis totais entre tecidos vegetais e entre áreas, utilizou-se o teste Tukey empregando-se o programa Genes (Cruz, 2006). A análise das amostras de solo foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solos do Núcleo de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.4 RESULTADOS

As quantidades médias de fenóis totais difeririam significativamente entre tecidos (Tabela 2). Portanto, foi realizado o teste Tukey a 5% de probabilidade entre folhas, cascas e frutos (Tabela 3). Nas cascas foram observados as maiores concentrações com valores máximos de 28,65% (g/100g de matéria seca) e mínimos de 8,36%. Os frutos tiveram concentrações intermediárias com máximos de 20,50% e mínimos de 8,04%. As folhas tiveram as menores concentrações com máximos de 12,30% e mínimos de 6,41%. Adicionalmente, foi realizado teste de média Tukey entre indivíduos dentro de tecidos, as maiores diferenças entre as quantidades médias de fenóis totais foram observadas nas cascas (Tabela 4).

Nas amostras de solos foram analisados os níveis de P, Ca e Mg e, considerados entre baixos a muitos baixos. Observou-se alta saturação do solo com Al (m) atingindo 84% na *Queimada* e 69% na *Baixa do Tatu*. A CTC foi pequena na *Área Um* e, média na *Queimada* e *Baixa do Tatu*. A saturação por bases (V) nos três ambientes foi muito pequena e, o teor de matéria orgânica pequeno. A *Área Um* e *Queimada* tem solos com textura média, na *Baixa do Tatu* o solo é argiloso (Tabela 5). Tais resultados significam que, de forma geral, os solos dos três ambientes são pobres em nutrientes e ricos em alumínio.

Tabela 2: Quadro da análise de variância entre tecidos amostrados de *S. adstringens*.

FV	GL	S.Q.	Q.M.	F	P
Indivíduos	15	2473,5417	164,9028	1,4960	0,1691
Tecidos	2	5298,1910	2649,0955	24,0331	0
Ind/Tec	30	3306,8141	110,2271	16,9338	0
Resíduo	48	312,4453	6,5093		
TOTAL	95	11390,9921			
MÉDIA		27,8727			
CV		9,1535			

Tabela 3: Médias de fenóis totais entre folhas, cascas e frutos de indivíduos de *S. adstringens*.

Local	Indivíduos	*Folha	*Fruto	*Casca
Área Um	1	7,81 c	11,27 b	16,69 a
	2	12,30 c	15,46 b	20,35 a
	3	10,11 b	20,09 a	18,78 a
	4	10,50 b	12,71 b	28,65 a
Queimada	5	7,25 b	11,14 a	11,51 a
	6	9,40 b	15,49 a	16,93 a
	7	10,23 ab	8,04 b	13,14 a
	8	12,27 b	20,50 a	20,70 a
	9	9,59 b	9,89 b	16,50 a
	10	7,40 c	12,69 b	24,89 a
	11	9,98 a	9,39 a	8,36 a
	12	11,37 b	18,23 a	14,29 b
Baixa do Tatu	13	9,51 c	15,01 b	19,40 a
	14	6,41 c	14,51 b	28,63 a
	15	7,44 c	11,92 b	21,59 a
	16	10,17 c	13,59 b	16,80 a

*Concentração em g/100g de matéria seca.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Tabela 4: Teste de médias de fenóis totais entre indivíduos dentro de tecidos de *S. adstringens*.

Local	Indivíduos	*Folha	*Fruto	*Casca
<i>Área Um</i>	1	7,81 ABC	11,27 DEF	16,69 DEF
	2	12,30 A	15,46 CD	20,35 BCD
	3	10,11 ABC	20,09 AB	18,78 CDE
	4	10,50 ABC	12,71 DE	28,65 A
<i>Queimada</i>	5	7,25 ABC	11,14 DEF	11,51 GH
	6	9,40 ABC	15,49 BCD	16,93 DEF
	7	10,23 ABC	8,04 F	13,14 FG
	8	12,27 A	20,50 A	20,70 BCD
	9	9,59 ABC	9,89 EF	16,50 DEF
	10	7,40 BC	12,69 DE	24,89 AB
	11	9,98 ABC	9,39 EF	8,36 H
	12	11,37 AB	18,23 ABC	14,29 EFG
<i>Baixa do Tatu</i>	13	9,51 ABC	15,01 CD	19,40 CD
	14	6,41 C	14,51 CD	28,63 A
	15	7,44 BC	11,92 DEF	21,59 BC
	16	10,17 ABC	13,59 DE	16,80 DEF
MÁDIAS		9,35	14,27	18,58

*Concentração em g/100g de matéria seca.

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Tabela 5. Resultados das análises química e física (textura) das amostras de solo cerrado *stricto sensu*.

Atributos do solo	Área Um	Nível	Qm	Nível	BT	Nível
pH em água	4,6	Bx	4,8	Bx	4,9	Bx
P-Mehlich 1 (mg dm ⁻³)	3,5	MBx	1,4	MBx	1,4	MBx
K (mg dm ⁻³)	29	Bx	48	M	40	Bx
Ca (cmol _c dm ⁻³)	0,30	MBx	0,20	MBx	0,60	Bx
Mg (cmol _c dm ⁻³)	0,20	Bx	0,10	MBx	0,10	MBx
Al (cmol _c dm ⁻³)	2,20	MA	2,20	MA	1,80	A
H+AL (cmol _c dm ⁻³)	9,30	MA	7,70	A	7,6	A
SB (cmol _c dm ⁻³)	0,57	MBx	0,42	MBx	0,80	Bx
m (%)	79	MA	84	MA	69	A
CTC	9,87	B	8,12	M	8,42	M
V (%)	6	MBx	5	MBx	10	MBx
M.O.	5,38	B	6,22	B	4,79	B
Areia grossa (dag kg ⁻¹)	16		18		19	
Areia fina (dag kg ⁻¹)	40		36		31	
Silte (dag kg ⁻¹)	16		16		14	
Argila (dag kg ⁻¹)	28	Tme	30	Tme	36	Arg

QM = Queimada; BT = Baixa do Tatu; MBx = muito baixo; Bx = baixo; B = bom; M = médio, A = ato; MB = muito bom; MA = muito alto, Are = arenoso; Tme = textura média; Arg = argiloso.

3.5 DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos estão entre as classes mais difundidas de metabólitos secundários sendo conhecidos pela grande importância no sistema solo-planta (Siqueira et al., 1991). Gartlan et al. (1980), verificaram diferenças significativas no conteúdo de fenóis em folhas de árvores crescendo em solo arenoso infértil, quando, comparado ao de solos mais férteis. Em geral, solos de baixa fertilidade proporcionam maiores níveis de fenóis totais e taninos em *S. adstringens* e *S. polyphyllum* (Jacobson et al., 2005).

No presente estudo, as propriedades físico-químicas dos solos analisados foram muito semelhantes e, não houve diferença significativa dos teores de fenóis totais entre as localidades. Isto pode ser devido ao fato dos solos dos três ambientes possuírem mesmas características, pobres, ácidos, altamente saturados com Al, argilosos ou textura média.

No estudo de Jacobson et al. (2005), a porcentagem de taninos encontrados dentro do grupo de fenóis totais de *S. adstringens* foi 76% na época seca e, 88% na época chuvosa. No estudo de Ardisson et al. (2002), o teor de fenóis totais foi cerca de 30,8% e o de taninos 29,9%. Sendo assim, grande parte dos compostos fenólicos encontrados em *S. adstringens* corresponde a taninos. No presente estudo, os teores de fenóis totais nas cascas variaram entre 28,65% e 8,36%, com o conteúdo médio de 18,58%, sendo portanto, menor

que o observado por Ardisson et al. (2002). Esta variação pode ser devida ao fato da concentração de metabólitos secundários estar relacionada a fatores genéticos e estímulos ambientais (Brow Júnior, 1988). A biossíntese de compostos fenólicos pode ser influenciada por fatores climáticos, edáficos, nutrientes, exposições a microorganismos, insetos, herbívoros, poluentes, entre outros (Martins, et al. 2003).

Os taninos não são definidos propriamente pela composição química, que é muito variável, mas pelas propriedades dos compostos fenólicos, sendo a adstringência a principal. Os flavonóides são derivados fenólicos mistos (originados do acetato e chiquimato), a polimerização de flavan-diol produz taninos condensados (Costa, 1975). Os taninos podem estar presentes em várias partes das plantas sendo encontrados em maiores concentrações no cerne e nas cascas (Pizzi & Mittal, 1994). Nas cascas os taninos estão, geralmente, nas células corticais (Brown, 1952) e tem forte atividade germicida (Farmer, 1967). Nas folhas os taninos encontram-se, principalmente, separados das proteínas e enzimas do citoplasma, dentro de vacúolos. Quando os herbívoros se alimentam das folhas, os tecidos são danificados e os taninos reagem com as proteínas tornando-as menos acessíveis ao suco digestivo dos animais (Costa, 1975; Lewis et al., 1968), seu acúmulo nas folhas e frutos torna-os não palatáveis (Brow Júnior, 1988).

As ligninas, juntamente com os taninos, são os polímeros fenólicos mais abundantes e amplamente distribuídos em plantas superiores (Lewis & Starkey, 1968). Os fenilpropanóides (ArC_3) são fenóis glicosilados sendo, os mais comuns metabólitos derivados da via do ácido chiquímico e grande proporção destes compostos é incorporado nas ligninas (Friedrich, 1976). O acúmulo de fenóis na parede celular teria a finalidade de fortalecimento da parede celular e funções adicionais na sobrevivência da célula submetida a condições de estresse (Matern & Grimmig, 1994; Kurup et al., 1994). Como observado no estudo, esperava-se que tecidos mais lignificados, como as cascas, possuísem maior quantidade de fenóis totais e os tecidos menos lignificados, como as folhas, menores quantidades.

3.6 CONCLUSÃO

1. De forma geral, as cascas possuem maiores teores de fenóis totais, na obtenção de matéria prima, são mais recomendadas as cascas. Porém, aparentemente, as quantidades médias de fenóis totais entre indivíduos variam menos nas folhas e mais nas cascas.

2. Provavelmente, um dos fatos que contribuíram na não diferenciação da produção fenóis totais entre localidades foi a semelhança nas propriedades físico química dos solos.

3. Se a utilização da casca implicar no corte e remoção das plantas deverá se ter cautela quanto a preservação da espécie, tendo em vista a estrutura genética da população evidenciada pela manutenção de alta heterozigosidade e sistema reprodutivo preferencialmente de alogamia.

4 CONCLUSÕES GERAIS

1. Devido à alta variabilidade genética contida nas populações, aos altos índices de fluxo gênico e, tamanhos efetivos verificados, acredita-se que estratégias visando a conservação da diversidade genética de *S. adstringens* implicam na manutenção de populações com grande número de indivíduos.

2. Se a obtenção de matéria prima, implicar no corte e remoção das plantas deverá se ter cautela quanto à preservação da espécie, tendo em vista a estrutura genética da população evidenciada pela manutenção de alta heterozigosidade e sistema reprodutivo preferencialmente de alogamia.

3. Apesar de não ter sido constatada divergência genética significativa entre populações, deve-se levar em conta que a fragmentação da população total é, relativamente, recente. Dentre as quatro populações, aparentemente, a população *NCA* encontra-se mais venerável à endogamia, pois, tem mais alelos fixados e encontra-se isolada de outras populações.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; DUSI, A.; ZERBINI JÚNIOR, F.M.; ROBINSON, I.P.; MICALES, J.A.; de OLIVEIRA, J.R.; DIAS, L.A.S.; SCORTICHINI, M; PEREIRA, M.C.B.; BONDE, R.B.; de ALONSO, S.K.; JUNGHANS, T.G.; BRUNE, W. (*in memoriam*). Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006 627p.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.

ALVES, T.M. de ALMEIDA; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA E. de FÁTIMA A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memoriam Instituto Oswaldo Cruz*, v.95, n.3, p.367-373, 2000.

ARDISSON, L.; GODOY, K.S.; FERREIRA, L.A.M.; STEHMANN, J.R. Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, n.1, p.27-34, 2002.

ASSUNÇÃO, S.L. & FELFILI, J.M. Fitossociologia de um fragmento de cerrado *sensu stricto* na APA do Paranoá, DF, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, v.18, n.4, 2004.

BARBOSA, L.C.A. Química orgânica: uma introdução para as ciências agrárias. Viçosa: UFV, 1994. 30p. (Mimeografado).

BARROS, M.A.G. Flora medicinal do Distrito Federal. *Brasil Florestal*, v.12, n.50, p.35-45, 1982.

BAURIN, N.; ARNOUL, E.; SCIOR, T.; BERNARD, Q.T.P. Preliminary screening of some tropical plants for ant-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.82, p.155-158, 2002.

BEZERRA, J.C.B.; SILVA, I.A. FERREIRA, H.D.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*, v.73, p.428-430, 2002.

BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. (eds.) Marcadores moleculares. Viçosa-MG. 2006.

BOTREL, M.C.G & de CARVALHO, D. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.), *Revista Brasileira de Botânica*, v.27, n.4, 2004.

BROW JÚNIOR, K.S. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. *Acta Amazônica*, v. 18, n. 1, p. 291-303, 1988.

BROWN, H.P.; PANSHIN, A.J.; FORSAITH, G.C. Textbook of wood technology. New York: Me Graw-Hill, 1952. v.2, 744p.

BRUNE, W.; ALFENAS, A.C.; JUNGHANS, T.G. Identificações específicas de enzimas em géis. In: ALFENAS, A.C. (Ed). Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV. 2006, p. 202-328.

BUKKART, A. Las leguminosas argentinas, silvestres e cultivadas. 2 ed. Buenos Aires: Acme Agnecy, 1952. p.148.

de CAMPOS TELLES, M.P.; COELHO, A.S.G.; LÁZARO, J.C.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; VALVA F. D'AYALA. Genetic diversity and population of *Eugenia dysenterica* DC. ("cagaita" – Myrtaceae) in Central Brazil: Spatial analysis and implications for conservation and management. *Conservation Genetics*, v.4, p.685-695, 2003.

COSTA, A.F. Farmacognosia. 3.ed. Lisboa, Fundação Calouste GulbenKian, 1975. v.1, 1031p.

CRUZ, C.D. Programa GENES -versão windows (2006). Editora UFV. Viçosa, MG.

DIAS, L.A. dos SANTOS. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. (Ed). Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV. 2006, p. 406-475

FARMER, R.H. Chemistry in the utilization of wood. Oxford: Pergamon, 1967, v.9, 132p.

FELFILI, J.M. & SILVA JÚNIOR, M.C. Floristic composition, phytosociology and comparison of cerrado and gallery forests at Fazenda Água Limpa, Federal District, Brazil. In. P.A. Furley; J.A. Ratter. *Nature and dynamics of forest-savanna boundaries*. London, Chapman & Hall. 1992, Pp. 393-415.

FELFILI, J.M.; FILGUEIRAS, T.S.; HARIDASAN, M.; SILVA JÚNIOR, M.C.; MENDONÇA, R.; REZENDE, AV. (eds.) Projeto biogeografia do bioma cerrado: Vegetação e solos. *Caderno de Geociências do IBGE*, v. 12., p.75-166, 1994.

FELFILI, J.M. Perda da Diversidade. In. UNESCO. Vegetação no Distrito Federal: tempo e espaço. Brasília. p. 33-34. 2000.

FELFILI, J.M. & SILVA JÚNIOR, M.C. (orgs.) *Biogeografia do Bioma Cerrado*: estudo fitofisionômico da Chapada do Espigão Mestre do São Francisco, 2001.

FELFILI, J.M. & SILVA JÚNIOR, M.C. Diversidade Alfa e Beta no cerrado *sensu stricto* da Chapada Pratinha, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, v.15, n.2, p.243-254, 2001.

FELFILI, J.M.; NOGUEIRA, P.E.; SILVA JÚNIOR, M.C.; MARION, B.S.; DELITTI, W.B.C. Composição florística e fitossociológica do cerrado sentido restrito no município de Água Boa, MT. *Acta Botânica Brasílica*, v.16, n.1, p.103-112, 2002

FELFILI, J.M. & BORGES FILHO, H.C. Extrativismo Racional da Casca de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. Universidade de Brasília, Departamento de Engenharia Florestal, 2004. 32p.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN, 1995. 220p.

FOLIN, O. & CIOCALTEAU, V. O tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal of Biology and Chemistry*, v.73, p. 424-427, 1927.

FRIEDRICH, H., Phenylpropanoid constituents of essential oil. *Lloydia*, v. 39, n. 1, p. 1-7, 1976.

GARTLAN, J.S.; McKEY, D.B.; WATERMAN, P.G.; MBI, C.N.; STRUTSAKE, T.T. A comparative study of the phytochemistry of two African Rain Forest. *Biochem. Syst. Ecol.* v.8, p. 401-422, 1980.

GUINET, P.H. & CACCAVARI, M.A. Pollen morphology of the genus *Stryphnodendron* (Leguminosae, Mimosoideae) in relation to its taxonomy. *Grana*, v.31, p.101-112, 1992.

HARTL, D.L. & CLARK, A.G. Principles of population genetics. 2º edição. Sianuer Associates, inc. Publishers. 1989. 682p.

HIRSCHMANN, G.S. & ARIAS, A.R. A survey of medicinal plantes of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, v.29, p.159-172, 1990.

HOLETZ, F.B.; NAKAMURA, T.U.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; de TOLEDO, C.E.M.; NAKAMURA, C.V. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.100, n.4, p.397-401, 2005.

INDEX Kewensis Plantarum Phanerogamarum (1931-5), London, Oxford Univ. suppl. 9, 1958. p.270

JACOBSON, T.K.B.; GARCIA, J.; da COSTA SANTOS, S.; DUARTE, J.B.; FARIAS, J.G.; KLIEMANN, H.J. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.35, n.3, p.163-169, 2005.

KEPHART, S.R. Starch gel eletrophoresis of plant isozymes: a comparative of techniques. *Amer. J. Bot.* v.77, n.5, p.693-712, 1990.

KIMURA, M. The rate of molecular evolution considered from the stand-point of population genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.63, p.1181-1188, 1969.

KIMURA, M. The natural allele theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. 1983.

KING, J.L. & JUKER, T.H. Non-Darwinian evolution. *Science*, v.164, p.788-798, 1969.

KURUP, S.S.; NALWADI, U.G.; BASARKAR, P.W. Phenolic biosynthesis in relation to moisture stress in marigold (*Tagetes erecta* L.). *Acta Horticulture*, n. 381, p. 488-493, 1994

LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O.; de SOUZA JR., P.T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytotherapy Research*, v.12, p.218-220, 1998.

LEWIS, J.L. & STARKEY, R.L. Vegetable tannins, their decomposition and effects on decomposition of some organic compounds. *Soil Science*, v. 106, n. 4, p. 241-247, 1968.

LORENZI, H. Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: ed. Plantarum, 1992. p.189.

MARKERT, C. L. & MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: issue, ontogenetic and species specific patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.45, p.753-763, 1959.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas medicinais. Ed. UVF. Viçosa, MG. 2003.

MATERN, U. & GRIMMIG, B. Natural phenols as stress metabolites. *Acta Horticulture*, n. 381, p. 448-462, 1994.

MAZA, P.K.; TIUMAN, T.S.; UEDA NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; NAKAMURA, C.V. Effects of *Stryphnodendron adstringens* on ultrastructures of promastigote forms of *Leishmania amazonensis*. XIX Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis. *Acta Microscopica*, v.12, sup.b. 2003.

de MELLO JÚNIOR, A.F.; de CARVALHO, D.; PÓVOA, J.S.R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar barsiliense* Camb.). *Scientia Forestalis*, n.66, p.56-65, 2004.

MENDES, N.M.; PEREIRA, J.P.; SOUZA, C.P.; OLIVEIRA, M.L.L. Ensaios preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. *Revista Saúde Publica*. V.18, p.348-354, 1984.

MIRANDOLA FILHO, A. & MIRANDOLA, N.S.A. Vegetais tintoriais do Brasil Central. Goiânia: Editora Líder, 1991. 143p.

de MORAES, P.L.R.; MONTEIRO, R.; VENCOSKY, R. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Ness (Laureceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica*. v.22, p.237-248, 1999.

de MORAES, P.L.R. & DERBYSHIRE, M.T.V. de CARVALHO. Estrutura genética de populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. *Biota Neotropica*. v.2, n.2, 2002.

MORI, F.A.; de OLIVEIRA MORI, C.L.S.; MENDES, L.M.; da SILVA, J.R.M.; de MELO, V.M. Influência do sulfito e hidróxido de sódio na quantificação em taninos da casca de barbatimão (*Strphnodendron adstringens*). *Floresta e Ambiente*, v.10, n.1, p.86, 1992.

NASSAR, J.M.; HAMRICK, J.L.; FLEMING, T.H. Allozyme diversity and genetic structure of the leafy cactus (*Pereskia guamacho* [Cactaceae]). *The American Genetic Association*, v.93, p.193-200, 2002.

NEI, M. Genetic distance between populations. *Amer. Nat.*, v.106, p.283-292, 1972.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.60, p.3321-3323, 1973.

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

NETO, J.J.; FRACASSO, J.F.; NEVES, M.C.L.C.; dos SANTOS, L.E.; BANUTH, V.L. Tratamento de úlcera varicosa e lesões de pele com *Calendula officinalis* L. e/ou com *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius. *Revista de Ciência Farmacêutica*, v.17, p.181-186, 1996.

OCCHIONI MARTINS, E.M.; GUEDES, A.; MARTINS, J. *Stryphnodendron* Mart. (Leg. Mim.) as espécies da Amazônia Brasileira. *Leandra*, v.2, p.11-40. 1972.

OCCHIONI, E.M. *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae Momosoideae) com especial referência aos taxa amazônicos. *Leandra*. 10-11: 3-100, 1981.

OCCHIONI, E.M. de LAMARE. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae – Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. *Acta Botânica Brasília*. v.4, n.2, p.153-158, 1990.

ORTIZ, P.L.; ARISTA, M.; OLIVEIRA, P.E.; TALAVERA, S. Patterna of flower and fuit production in *Stryphnodendron adstringens*, an andromonoeciou legum tree of Central. *Brazil. Plant Biology*, v.5, p.592-599, 2003.

PANIZZA, S.; ROCHA, A.B.; GECCHI, R.; de SOUZA e SILVA, R.A.P. *Stryphnodendron barbadetiman* (Velloso) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. *Rev. Ciênc. Farm.*, v.10, p.101-106, 1988.

PENNA, M. Dicionário brasileiro de plantas medicinais. 3 ed. Rio de Janeiro, Kosmos, 1946. 409p.

PIO CORRÊA, M. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Imprensa Oficial, 1926. v.1. 1474p.

PIZZI, A. & MITTAL, K.L. Handbook of adhesive technology. New York: Marcell Dekker, 1994. 680p.

POTT, A. Forrageiras não-gramineas dos Cerrados e campos do Pantanal Matogrossense. In: Simpósio Sobre o Cerrado, 6., 1982, Brasília, DF. Savanas: alimento e energia. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1988. p.381-388.

REBECCA, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; GRESPAN, R.; CUMAN, R.K.N.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; de MELLO, J.C.P.; BERSANI-AMADO, C.A. Toxicological studies on *Striphnodendron adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*. v.83, p.101-104, 2002.

REBECCA, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; KELMER-BRACHT A.N.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; CUMAN, R.K.N.; PAGADIGORRIA, C.L.S.; de MELLO, J.C.P.; BRACHT, A.; BERSANI-AMADO, C.A. Effect of *Striphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. *Toxicology Letters*, v.143, p.55-63, 2003.

RIBAS, L.A. & KAGEYAMA, P.Y. Genetic structure in a population of *Trema micrantha* (L.) B. For different life stages. *Scientia Forestalis*, n.65, p.167-187, 2004.

RIZZINI, C.T. & MORS, W.B. Botânica Econômica Brasileira. EDUSP. Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 1976. 227p.

RIZZINI, C.T. & HERINGER, E.P. As espécies anãs de *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae). *Revista Brasileira de Biologia*. v.47, p.447-454, 1987.

ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. (Ed). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicação em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV. 1998, p. 115-148

ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. (Ed). Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV. 2006, p. 329-380

SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. *Plant Physiology*. California: Wadsworth Publishing Company, 1991. 682p.

SANO, S.M. & ALMEIDA, S.P. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. xii + 556p.

SANTOS, C.S.; COSTA, W.F.; RIBEIRO, J.P. GUIMARÃES, D.O.; FERRI, P.H.; FERREIRA, H.D. SERAPHIN, J.C. Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia*. v.73, p.292-299, 2002

SCALON, V.R. & SOUZA, V.C. Revisão Taxonômica do gênero *Stryphnodendron* [Mart. (Leguminosae, Mimosidae)]. In. 57º Congresso Nacional de Botânica, Gramado, 6 a 10 de novembro, 2006.

da SILVA JUNIOR, M.C. da. Composição florística, estrutura e parâmetros fitossociológicos de cerrado e sua relação com o solo na Estação Florestal de Experimentação de Paraopeba, MG. Viçosa: UFV, 1984. 130p. Tese Mestrado.

da SILVA JÚNIOR, M.C. & FELFILI, J.M. A Vegetação da Estação Ecológica de águas Emendadas. Governo do Distrito Federal. Secretaria de Meio Ambiente Ciência e Tecnologia do Distrito Federal. Instituto de ecologia e Meio Ambiente do Distrito Federal. Brasília, 1996, p.3-17.

SILVERTOOWN, J.W. & DOUST, J.L. Introduction to plant population biology. Oxford, Blackwell Scientific, 1993, 210 p.

SIQUEIRA, J.O.; NAIR, M.G.; HAMMESRSCHIMIDT, R.; SAFIR, G.R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 10, p. 63-121, 1991.

SLATIKIN, M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium population. *Evolution*, v.47, p.264-279, 1993.

SLATKIN, M. Gene flow and population structure. In: REAL, L.A. (ed.) Ecological Genetics. Princeton University Press, New Jersey, 1994, p.3-17.

SOLTIS, D.E.; HAUFLER, C.H.; DARROW, D.C.; GASTONY, G.J., Starch gel electrophoresis of fern: a compilation of gdung buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *American Ferns Journal*, v.73, n.1, p.9-27, 1983.

de SOUZA, C.D. & FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, v.20, n.1, p.135-142, 2006.

TEIXEIRA, M.L.; SOARES, A.R.; SCOLFORO, J.R.S. Variação do teor de tanino da casaca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em 10 locais de Minas Gerais. *Ciências e Prática*. Lavras, v.14, n.2, p.229-232, 1990.

VELLOZO, J.M.C. Flora fluminensis. Rio de Janeiro, s.c.p., 1970, v.11., t.7.

VENCOVSKY, R.. Biometrical aproaches for molecular markers: estiamtion of effective population size. In International Workshop on Agricultural Biotechnology, 1997. Proceedigns. ESALQ-USP, Piracicaba, Cook Colege – New Jersey Agricultural Experiment Station, The State University of New Jersey, Rutgers. 1997.

WEIR, B.S. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets. 1996.

World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review. Geneva: WHO, 1998. 45p.

ZUCCHI, M.I. Análise da estrutura genética de *Eugenia desynterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Vegetal), ESALQ, Piracicaba-SP, 130p. 2002.