

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA DE *Uncaria
tomentosa* Willd. ex Roem. & Schult. E *Uncaria guianensis* Gmell DE
POPULAÇÕES NATURAIS LOCALIZADAS NA AMAZÔNIA.**

ISABELA CRISTINA GOMES HONÓRIO

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia
(Horticultura).

BOTUCATU – SP
MARÇO, 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA DE *Uncaria
tomentosa* Willd. ex Roem. & Schult. E *Uncaria guianensis* Gmel DE
POPULAÇÕES NATURAIS LOCALIZADAS NA AMAZÔNIA.**

ISABELA CRISTINA GOMES HONÓRIO

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira

Coorientadora: Profa. Dra. Bianca Waléria Bertoni

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia
(Horticultura).

BOTUCATU – SP
MARÇO, 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

H774e Honório, Isabela Cristina Gomes, 1988-
Estudo da diversidade genética e química de *Uncaria tomentosa* willd. ex Roem. & Schult. e *Uncaria guianensis* Gmel de populações naturais localizadas na Amazônia / Isabela Cristina Gomes Honório. - Botucatu : [s.n.], 2016
xiii, 86 f. : fots. color., grafs. color., ils. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016
Orientador: Ana Maria Soares Pereira
Coorientador: Bianca Waléria Bertoni
Inclui bibliografia

1. Plantas medicinais - Uso terapêutico. 2. Plantas medicinais - Conservação. 3. Alcaloides. 4. Polimorfismo (Genético). I. Pereira, Ana Maria Soares. II. Bertoni, Bianca Waléria. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA DE *Uncaria tomentosa* Willd. Ex Roem. & Schult. E *Uncaria guianensis* Gmel DE POPULAÇÕES NATURAIS LOCALIZADAS NA AMAZÔNIA”

AUTORA: ISABELA CRISTINA GOMES HONÓRIO

ORIENTADORA: ANA MARIA SOARES PEREIRA

CO-ORIENTADORA: BIANCA WALERIA BERTONI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:



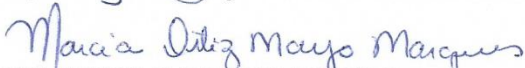
PROFA. DRA. ANA MARIA SOARES PEREIRA
Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais / UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO



Prof. Dr. FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM
Dep de Horticultura / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu



Profa. Dra. SONIA MARLI ZINGARETTI
Departamento de Biologia Molecular / UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO



DRA. MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos / INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS



Profa. Dra. JULIANA DA SILVA COPPEPE
Depto de Biotecnologia Vegetal / UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO

Botucatu, 11 de março de 2016.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Isabela Cristina Gomes Honório, nascida no dia 24 de Março de 1988, em Belo Horizonte, Minas Gerais. Graduada em Engenharia Agrônômica, pela Universidade Federal de Minas Gerais em janeiro de 2011. Iniciou o Mestrado em Fitotecnia pela Universidade Federal de Viçosa em março de 2011, obtendo o título de mestre em Fitotecnia em fevereiro de 2013. Deu início ao Doutorado em Agronomia – Horticultura, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” em março de 2013.

Dedico...

À minha família, por todo o auxílio durante todos os anos de estudo.

OFEREÇO...

À minha mãe Heloisa, meu pai João e meu irmão Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

À UNESP e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia-Horticultura, pela oportunidade de concluir meus estudos com a realização do Doutorado;

À CAPES, pelo fornecimento da bolsa de Doutorado;

Ao CNPq, pelo financiamento para a execução do Projeto;

À natureza, pela fonte de recursos para a realização das coletas e lindas experiências;

À UNAERP, por abrir suas portas para que fosse possível desenvolver o trabalho;

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira, pela oportunidade de trabalho, confiança, conselhos, orientação, amor e amizade;

À Prof^a. Dr^a. Bianca Waléria Bertoni, pelos ensinamentos e convivência;

Ao Prof. Dr. Filipe Pereira Giardini Bonfim, pelos muitos anos de amizade, convivência, orientação e paciência;

À Dr^a. Juliana da Silva Coppede, pela amizade, carinho e auxílio durante todo o trabalho;

Aos Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida, Prof^a. Dr^a. Márcia Ortiz Mayo Marques e Prof^a. Dr^a. Sônia Marli Zingaretti por participar da qualificação e defesa e pelos comentários para melhoria do trabalho;

Aos amigos que conquistei na UNAERP pelos anos de convivência e aprendizado;

À amiga de trabalho Valéria Sieiro Conde Corrêa pela ajuda coletas e confecção das exsiccatas;

Às amigas Aline Fodra, Daniela Aparecida Teixeira e Jordany Aparecida de Oliveira Gomes, pela amizade, companheirismo e ajuda durante esses anos;

À minha família, Heloisa, João, Walter, Rodrigo, Ana Paula, Pietra e Pedro pelo amor e compreensão por ter ficado tantos anos longe de casa para alcançar meus objetivos;

E a todos os amigos, familiares e profissionais que de alguma forma se fizeram presentes, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1. O gênero <i>Uncaria</i>	7
2.2. <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i>	8
2.2.1. Descrição.....	8
2.2.2. Habitat	9
2.2.3. Distribuição geográfica	10
2.2.4. Etnofarmacologia e atividade farmacológica.....	11
2.2.5. Fitoquímica.....	12
2.2.6. Características relevantes das espécies alvo.....	13
2.2.7. Mercado e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.....	15
2.3. Conservação e Diversidade Genética	16
2.4. Marcadores Moleculares	19
2.4.1. SRAP (<i>Sequence-related Amplified polymorphism</i>).....	20
3. HIPÓTESES	23
4. JUSTIFICATIVA	24
5. OBJETIVOS.....	25
5.1. Geral.....	25
5.2. Específicos	25
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	26

6.1. Coleta.....	26
6.2. Caracterização dos ambientes de coleta.....	27
6.3. Condições gerais dos experimentos.....	27
6.4. Análise da variabilidade genética.....	27
6.4.1. Extração do DNA.....	28
6.4.2. Análise SRAP.....	28
6.5. Extração e quantificação dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos (AOP) mitrafilina e isomitrafilina.....	31
6.6. Análises Estatísticas.....	32
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
7.1. Coleta.....	36
7.2. Extração do DNA.....	37
7.3. Análise por meio do marcador SRAP.....	38
7.4. Extração e quantificação dos alcaloides mitrafilina e isomitrafilina.....	56
8. CONCLUSÕES.....	68
9. REFERÊNCIAS.....	69
10. APÊNDICE.....	84

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Extensão das áreas de Unidades de Conservação (UC) por Bioma.....	17
Tabela 2. <i>Primers Forward e Reverse</i> utilizados na técnica SRAP.....	21
Tabela 3. Sequência de combinações de <i>primers</i> testados para SRAP em <i>Uncaria tomentosa</i>	29
Tabela 4. Sequência de combinações de <i>primers</i> testados para SRAP em <i>Uncaria guianensis</i>	29
Tabela 5. Municípios, códigos dos acessos e coordenadas geográficas das coletas de <i>Uncaria tomentosa</i>	36
Tabela 6. Municípios, códigos dos acessos e coordenadas geográficas das coletas de <i>Uncaria guianensis</i>	37
Tabela 7. Combinações de <i>primers</i> selecionadas para a execução da técnica de SRAP em <i>Uncaria tomentosa</i>	38
Tabela 8. Combinações de <i>primers</i> selecionadas para a execução da técnica de SRAP em <i>Uncaria guianensis</i>	38
Tabela 9. Número de locus e polimorfismo obtidos em cada combinação de <i>primers</i> para a espécie <i>Uncaria tomentosa</i>	39
Tabela 10. Número de locus e polimorfismo obtidos em cada combinação de <i>primers</i> para a espécie <i>Uncaria guianensis</i>	40
Tabela 11. Parâmetros genéticos avaliados para a espécie <i>Uncaria tomentosa</i>	41
Tabela 12. Parâmetros genéticos avaliados para a espécie <i>Uncaria guianensis</i>	43
Tabela 13. Distância geográfica (Km) e genética da espécie <i>Uncaria tomentosa</i>	44
Tabela 14. Distância geográfica (Km) e genética da espécie <i>Uncaria guianensis</i>	45

Tabela 15. Resumo da AMOVA (Análise Molecular de Variância): Porcentagem da variação total observada entre e dentro das populações de <i>Uncaria tomentosa</i>	46
Tabela 16. Resumo da AMOVA (Análise Molecular de Variância): Porcentagem da variação total observada entre e dentro das populações de <i>Uncaria guianensis</i>	46
Tabela 17. Teste de Média dentro das populações de <i>Uncaria tomentosa</i> (mg.g ⁻¹ .PS dos AOP mitrafilina e isomitrafilina).....	58
Tabela 18. Teste de Média entre as populações de <i>Uncaria tomentosa</i> (mg.g ⁻¹ .PS dos AOP mitrafilina e isomitrafilina).....	59
Tabela 19. Teste de Média dentro das populações de <i>Uncaria guianensis</i> (mg.g ⁻¹ .PS dos AOP mitrafilina e isomitrafilina).....	63
Tabela 20. Teste de Média entre as populações de <i>Uncaria guianensis</i> (mg.g ⁻¹ .PS dos AOP mitrafilina e isomitrafilina).....	64

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i>	10
Figura 2. a) Exsicata de <i>Uncaria tomentosa</i> contendo as inflorescências. b) Exsicata de <i>Uncaria guianensis</i>	27
Figura 3. Estruturas dos alcaloides mitrafilina e isomitrafilina.....	31
Figura 4. Locais de coleta das populações de <i>Uncaria tomentosa</i> nos estados do Acre, Amapá e Pará.....	36
Figura 5. Locais de coleta das populações de <i>Uncaria guianensis</i> nos estados do Acre, Amapá, Amazonas e Pará.....	37
Figura 6. Extração de DNA analisada por meio de gel de agarose 1% de indivíduos do acesso de <i>Uncaria tomentosa</i> coletadas em Tarauacá-AC.....	38
Figura 7. Gel de poliacrilamida com a primeira combinação (em3+me3) de <i>primers</i> utilizados em populações de <i>Uncaria tomentosa</i> coletadas nos municípios de Tarauacá-AC (UTTA) e Feijó-AC (UTFJ).....	39
Figura 8. Gel de poliacrilamida com a primeira combinação (em1+me3) de <i>primers</i> utilizados em populações de <i>Uncaria guianensis</i> coletadas nos municípios de Rio Branco-AC (UGRB) e Boca do Acre-AM (UGBC).....	40
Figura 9. Imagem das populações de <i>Uncaria tomentosa</i> coletadas nos municípios de Mâncio Lima-AC (a) e Tarauacá-AC (b).....	42
Figura 10. Imagem das populações de <i>Uncaria guianensis</i> coletadas nos municípios de Mazagão-AP (a) e Assis Brasil-AC (b).....	43
Figura 11. Dendograma das populações de <i>Uncaria tomentosa</i> amostradas e o	

agrupamento	destas	em	dois	
grupos.....				49
Figura 12. Análise de dispersão em coordenadas principais (PCoA) obtido a partir da matriz de similaridade de Jaccard de <i>Uncaria tomentosa</i>				50
Figura 13. Agrupamento das populações da espécie <i>Uncaria tomentosa</i> através do			programa	
STRUCTURE.....				50
Figura 14. Proporção dos grupos gênicos de <i>Uncaria tomentosa</i>				51
Figura 15. Dendograma demonstrando as populações de <i>Uncaria guianensis</i> amostradas e o agrupamento destas em três				
grupos.....				52
Figura 16. Análise de dispersão em coordenadas principais (PCoA) obtido a partir da matriz de similaridade de Jaccard de <i>Uncaria guianensis</i>				52
Figura 17. Agrupamento das populações da espécie <i>Uncaria guianensis</i> através do			programa	
STRUCTURE.....				53
Figura 18. Proporção do grupo gênico das populações de <i>Uncaria guianensis</i>				54
Figura 19. Dendogramas obtidos para a produção dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos		em	<i>Uncaria</i>	
<i>tomentosa</i>				55
Figura 20. Dendogramas obtidos para o acúmulo de alcaloides oxindólicos pentacíclicos		em	<i>Uncaria</i>	
<i>guianensis</i>				55
Figura 21. Cromatograma de <i>Uncaria tomentosa</i> do indivíduo 16 da população coletada no município de Cruzeiro do Sul (UTCS).....				57

Figura 22. Cromatograma de <i>Uncaria guianensis</i> (indivíduo 17) da população coletada no município de Boca do Acre-AM (UGBC).....	62
Figura 23. Gráfico de correlação entre o alcaloide isomitrafalina e a distância geográfica das populações de <i>Uncaria tomentosa</i>	65
Figura 24. Gráfico de correlação entre o alcaloide isomitrafalina e a altitude das populações de <i>Uncaria tomentosa</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AMOVA	<i>Analysis of Molecular Variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOP	Alcaloides Oxindólicos Pentacíclicos
DAP	Diâmetro na Altura do Peito
DNA	<i>Desoxyribosenucleic Acid</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
F_{ST}	Índice de fixação de alelos
ha	Hectare
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
ISSR	<i>Inter-simple Sequence Repeat</i>
N_m	Fluxo gênico
PCoA	<i>Principal Coordinate Analysis</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
RAPD	<i>Random-amplified Polymorphic DNA</i>
RENAME	Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais do Governo Brasileiro
RFPL	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SRAP	<i>Sequence-related polymorphic DNA</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
UC	Unidades de Conservação
WHO	<i>World Health Organization</i>

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA DE *Uncaria tomentosa* Willd. ex Roem. & Schult. E *Uncaria guianensis* Gmell. DE POPULAÇÕES NATURAIS LOCALIZADAS NA AMAZÔNIA. Botucatu, 2016, 86p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autora: Isabela Cristina Gomes Honório

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira

Coorientadora: Profa. Dra. Bianca Waléria Bertoni

RESUMO

Uncaria tomentosa Willd. ex Roem. & Schult. e *Uncaria guianensis* Gmell. são plantas medicinais nativas da Amazônia, utilizadas na medicina tradicional com ação anti-inflamatória, sofrem pressão antrópica como o desmatamento e extrativismo predatório para uso e necessitam de cuidados em relação à conservação. *U. tomentosa* é uma das plantas medicinais que compõe a lista da relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME) disponibilizada pelo Ministério da Saúde para os municípios brasileiros, através do Sistema Único de Saúde (SUS) e a *U. guianensis* apesar de não estar nesta lista apresenta também alcaloides oxindólicos pentacíclicos, como marcadores químicos, sendo utilizada popularmente como anti-inflamatória e sua ocorrência na natureza é maior quando comparada à *U. tomentosa*. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a diversidade genética e química entre os indivíduos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* por marcador molecular SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*) e quantificar os alcaloides oxindólicos pentacíclicos mitrafilina e isomitrafalina em folhas por HPLC. A coleta do material foi feita nos estados do Acre, Amazonas, Amapá e Pará. Para ambas as espécies foram coletadas oito populações, em municípios distintos com 20 indivíduos cada. A genotipagem de *U. tomentosa* foi realizada utilizando três combinações de *primers* e os fragmentos submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida. A genotipagem de *U. guianensis* foi realizada usando quatro combinações de *primers* e os fragmentos analisados no equipamento 4300 DNA Analyser LI-COR®. A quantificação dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos mitrafilina e isomitrafalina foi realizada de acordo com método já descrito na literatura com algumas

modificações. Nas populações avaliadas de *U. tomentosa* a variabilidade genética foi maior dentro (75%) das populações do que entre elas (25%). O valor de F_{st} foi de 0,246, evidenciando que as populações estão estruturadas em Modelo de Ilhas. A maior porcentagem de locus polimórficos (95,68%) e a maior diversidade genética foram encontradas na população coletada no município de Mâncio Lima - AC. O fluxo gênico foi considerado restrito ($Nm=1,57$) e não houve correlação entre as distâncias geográfica e genética. Para a espécie *U. guianensis*, a variabilidade genética também foi maior dentro das populações (81%) do que entre elas (19%). O valor de F_{st} foi de 0,188, o que mostra que as populações estão se aproximando do Modelo de Ilhas. A maior porcentagem de locus polimórficos (90,21%) e a maior variabilidade genética foram verificadas na população coletada no município de Mazagão-AC. O fluxo gênico foi considerado baixo ($Nm = 2,57$) e houve fraca correlação entre as distâncias geográfica e genética, portanto considerada não significativa. A maior concentração dos alcaloides mitrafilina (11,17 mg.g⁻¹.PS) e isomitrafilina (2,99 mg.g⁻¹.PS) em *U. tomentosa* foram encontradas nos indivíduos da população de Tarauacá-AC e em *U. guianensis* foi de 1,09 mg.g⁻¹.PS de mitrafilina e 0,29 mg.g⁻¹.PS de isomitrafilina encontradas na população de Boca do Acre-AM. Além disso, para essa espécie, foi possível quantificar mitrafilina em apenas 24,8% dos indivíduos e a isomitrafilina em 20,4% dos indivíduos estudados. Conclui-se que a conservação de ambas as espécies deverá ser realizada com a coleta de um maior número de indivíduos nas populações com maiores variabilidades genética e química.

Palavras-Chaves: Unha-de-gato, conservação, SRAP, Plantas medicinais, alcaloides.

STUDY OF CHEMICAL AND GENETIC DIVERSITY OF *Uncaria tomentosa* Willd. ex Roem. & Schult. AND *Uncaria guianensis* Gmell. NATURAL POPULATIONS LOCATED IN THE AMAZON. Botucatu, 2016, 86p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Isabela Cristina Gomes Honório

Advisor: Prof. Dr. Ana Maria Soares Pereira

Co-advisor: Prof. Dr. Bianca Waléria Bertoni

SUMMARY

Uncaria tomentosa Willd. ex Roem. & Schult. and *Uncaria guianensis* Gmell. are medicinal plants natives from Amazonia state, used in the occidental medicine for its anti-inflammatory effect, which are suffering from the actions of mankind by deforestation and predatory extraction, requesting care for their conservation. *U. tomentosa* is one of the medicinal plants that make up the national ratio of the list of essential drugs (RENAME) made available by the Ministry of Health to the municipalities through the Unified Health System (SUS) and *U. guianensis* although this is not list also features pentacyclic oxindole alkaloids, as markers, being popularly used as anti-inflammatory and its occurrence in nature is higher compared to *U. tomentosa*. The objectives of the present study were to evaluate the chemical and genetical diversity between individuals of *U. tomentosa* and *U. guianensis* by molecular marker SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*) and quantify pentacyclic oxindolic alkaloides mitraphylline and isomitraphylline in leaves via HPLC. Samples were collected in the states of Acre, Amazonas, Amapá and Pará. For both species, 20 samples were collected from each of the eight populations coming from different locations. The genotyping of *U. tomentosa* was realized by using the combination of three *primers* and the fractions submitted to an electrophoresis in acrylamide gel. The genotyping of *U. guianensis* was realized by using the combination of four *primers* and the fractions analyzed with a 4300 DNA Analyser LICOR®. The quantification of pentacyclic oxindole alkaloides mitraphylline and isomitraphylline were realized by using the existing method with some modifications. The *U. tomentosa* populations showed higher genetic variability inside the same population

(75%) than between different populations (25%). The value of F_{st} was 0,246, showing that the populations are following the Island Model. The highest percentage of polymorphic locus (95,68%) and the highest genetic diversity were found in the population from Mâncio Lima - AC. The gene traffic was considered restrictive ($Nm=1,57$) and there was no correlation between geographic and genetic distances. For *U. guianensis*, the genetic variability was higher inside same populations (81%) than between different populations (19%). The value of F_{st} was 0,188, showing that the populations are coming close to the Island Model (modelo de ilhas). A higher percentage of polymorphic locus (90,21%) and a higher genetic variability were confirmed in the population collected in Mazagão - AC. The gene traffic was considered low ($Nm = 2,57$) and as having a weak correlation between geographic and genetic distances and, therefore, considered not significant. The highest alkaloid concentrations of mitraphylline (11,17 mg.g⁻¹.PS) and isomitraphylline (2,99 mg.g⁻¹.PS) in *U. tomentosa* were found in samples of the population from Tarauacá - AC and in *U. guianensis* samples showed alkaloid concentrations of 1,09 mg.g⁻¹.PS of Mitraphylline and 0,29 mg.g⁻¹.PS of Isomitraphylline in the population from Boca do Acre - AM. Besides that, to this species, it was possible to quantify mitraphylline in only 24.8% of individuals isomitraphylline and 20.4% of subjects studied. It's concluded that the conservation of both species should be done with the collection of a greater number of individuals in populations with higher genetic and chemical variability.

Keywords: Cat's clow, conservation, SRAP, medicinal plants, alkaloids.

1. INTRODUÇÃO

A humanidade sempre encontrou na natureza soluções para os seus problemas de saúde. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Durante milênios, plantas medicinais corresponderam a cerca de 90% dos remédios utilizados para o alívio e cura das doenças (CUNHA et al., 2003).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 80% da população mundial fizeram, em algum momento, uso de plantas medicinais na busca de alívio de algum sintoma desagradável, sendo que, pelo menos, 30% foram prescritos por médicos (MARTINS et al., 2003). A mesma Organização divulgou no início da década de 1990 que entre 65 a 80% da população nos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VOLPATO, 2005). Além disso, a OMS também reconhece que o conhecimento tradicional sobre produtos da biodiversidade é um importante instrumento no desenvolvimento de novos fármacos, os quais deverão ser úteis no combate de doenças que assolam as populações que habitam os países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Entre 1981 e 2010, 54% das novas drogas aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) provinham de fontes naturais. Desse percentual, 4% eram produtos naturais, 22% derivados de produtos naturais, 13% produzidos totalmente por síntese, mas o modelo do composto ativo era proveniente de um produto natural e 15% vêm de uma fonte biológica isolado de um organismo ou célula (NEWMAN e CRAGG, 2012).

O custo do desenvolvimento de novos fármacos é elevado, estima-se que em média para obter uma droga considerando o início da pesquisa até a sua comercialização é de mais de um bilhão de dólares, sem levar em conta os gastos com aprovações em órgãos competentes (MUNOS, 2009).

A opção de conduzir pesquisas a partir da indicação de plantas utilizadas por comunidades diminui o percurso do desenvolvimento de uma nova droga, já que os pesquisadores dispõem, antes mesmo de iniciarem os estudos científicos, uma indicação de qual atividade biológica determinada droga poderia apresentar.

As grandes fontes de biodiversidade são as florestas tropicais, localizadas em países em desenvolvimento como o Brasil, detendo aproximadamente um terço da flora mundial. Porém, são os países como EUA, Japão e alguns do continente Europeu os que mais lucraram com a comercialização de produtos naturais oriundos dessas florestas (KLEIN et al., 2009). O Brasil, por ser um país com amplo patrimônio genético, tem a possibilidade de realizar grandes estudos sobre a utilização da biodiversidade das espécies medicinais e seus compostos ativos em prol do avanço na saúde, priorizando a preservação e conservação desses recursos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Desde a década de 2000 há crescente interesse de grupos de pesquisa buscando comprovar e validar cientificamente o potencial terapêutico das espécies nativas. No entanto, o número de trabalhos biotecnológicos, agrônômicos, etnobotânicos e fitoquímicos ainda são reduzidos, quando comparados ao valioso conhecimento empírico de raizeiros e ao grande acervo genético vegetal encontrado nos biomas brasileiros. Cerca de 8% da flora nativa foram estudadas na busca de compostos bioativos e somente 1.110 espécies vegetais foram avaliadas de alguma forma quanto às propriedades medicinais (GUERRA e NODARI, 2001).

As florestas tropicais possuem a metade de cerca de 500.000 espécies de plantas que se estima existirem no mundo, das quais menos de 1% foram pesquisadas em relação às suas atividades farmacológicas (MARTINS et al., 2003).

A floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo e ocupa uma região de aproximadamente 6,7 milhões de km². Cerca de 60% da floresta, aproximadamente 4,1 milhões de km², se encontra em território brasileiro. O bioma Amazônia ocupa 49% do território nacional, com 1,5 milhão de espécies vegetais catalogadas (IBGE, 2015). A riqueza biológica desse bioma é tão grande que incorpora, total ou parcialmente, elementos de 49 das 200 ecorregiões mundiais (OLSON et al., 2000).

Os países amazônicos, com apoio de todo o mundo, têm uma responsabilidade imensa em conservar esse patrimônio mundial e garantir a proteção da biodiversidade e o fornecimento de serviços essenciais para a qualidade de vida e manutenção do clima do planeta em longo prazo (ARPA, 2010). Com isso torna-se necessário que haja trabalhos de conservação das espécies medicinais da Amazônia, visto que esse bioma está em constante mudança, pela ação do extrativismo

desenfreado, ocasionando perdas irreparáveis de material vegetal, que possivelmente ainda nem foram catalogados e devidamente estudados.

Atualmente, inúmeros estudos com plantas medicinais são associados à biotecnologia, podendo agregar valores nos produtos gerados. Técnicas de biologia molecular permitem a detecção da variabilidade genética entre indivíduos e/ou populações, contribuindo assim para a determinação de indivíduos a serem conservados (SOUZA, 2006). Neste contexto, a avaliação da diversidade genética de plantas medicinais é essencial, uma vez que é necessário relacionar variações genotípicas e fenotípicas com a variabilidade morfológica e química das espécies a serem estudadas como possíveis fitomedicamentos (FALK et al., 2001).

Dentre as técnicas moleculares para análise do DNA, o marcador do tipo SRAP (*Sequence-related amplified polymorphism*) vêm sendo bastante utilizado por combinar simplicidade, confiabilidade, reprodutibilidade e facilidade no sequenciamento das bandas selecionadas. Além disso, tem como alvo sequências de codificação no genoma (LI e QUIROS, 2001).

Como as técnicas biotecnológicas podem ser alternativas viáveis para programas de conservação, o objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética em diferentes populações de *Uncaria tomentosa* (Willdenow ex Roemer & Schultes) DC. e *Uncaria guianensis* (Alblet) J. F. Gmell por meio do marcador molecular SRAP, e a diversidade química com a quantificação dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos (AOP), mitrafilina e isomitrafilina em HPLC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O gênero *Uncaria*

A família Rubiaceae inclui 400 a 500 gêneros e 6000 a 7000 espécies (JOLY, 1979; CRONQUIST, 1981; GARCIA-KIRKBRIDE, 1982; BARROSO et al., 1986). Engloba espécies em todas as regiões climáticas do mundo, sendo que a maioria ocorre nas regiões tropicais (GARCIA-KIRKBRIDE, 1982), subtropicais e, também, de clima temperado (CRONQUIST, 1981). É encontrada em todas as altitudes e possui hábito variado, podendo ser classificada como árvore de grande, médio ou pequeno porte, arbusto, erva perene ou anual e ocasionalmente

trepadeira (DE CANDOLE, 1830; SCHUMANN, 1889; DWYER, 1980). O gênero *Uncaria* apresenta espécies de grande significância, que merecem destaque para a realização de estudos em diversas áreas.

A família Rubiaceae produz alcaloides pertencentes a mais de dez classes distintas, com destaque para os isoquilínicos, quinolínicos e os indólicos (CORDELL et al., 2001). Segundo Both (2005) 37 gêneros de Rubiaceae sintetizam alcaloides.

Dentre as plantas com expressivo potencial terapêutico e econômico que ocorrem nas florestas tropicais, em especial na Amazônia, estão as espécies pertencentes ao gênero *Uncaria*. Este gênero integra a tribo *Coptosapelteae* (LAUS, 2004), mais especificamente a subtribo *Mitragyninae* (KEPLINGER et al., 1999), a subfamília *Cinchonoideae* (MUR et al., 2002).

Ainda não existe consenso entre os botânicos em relação ao número de espécies que compõe o gênero *Uncaria*, enquanto Dwyer (1980), Shultes et al. (1990) e Soukup (1987) mencionam 60 espécies, Gentry (1993) relata existirem 50.

O gênero *Uncaria* reúne espécies com expressivo potencial medicinal a exemplo de *U. formosana*, *U. guianensis*, *U. macrophylla*, *U. rhynchophylla*, *U. sinensis* e *U. tomentosa* (FALKIEWICZ e LUKASIAK, 2001). Dentre estas espécies as mais comercializadas e utilizadas mundialmente são *U. guianensis* e *U. tomentosa*.

2.2. *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*

2.2.1. Descrição

Alguns autores consideram que a espécie *Uncaria tomentosa* é originária do Peru e Colômbia (MAC BRIDE, 1936), foi descrita pela primeira vez como *Nauclea aculeata* HBK e somente em 1830 foi denominada *Uncaria tomentosa*, como é conhecida atualmente. O termo “*tomentosa*” provém da observação de nervuras proeminentes na parte abaxial das folhas, que têm aparência de veias finas (VILCHES, 1997). É popularmente conhecida como unha de gato (DESMARCHELIER et al., 1997), denominação relacionada à morfologia da planta, que apresenta espinhos no caule que são semelhantes a unhas (CHENG et al., 2007), embora também apresente

outros nomes populares como, gabarato (DE FEO, 1992), vilcacora, samento (FALKIEWICZ e LUKASIAK, 2001), saventário (REINHARD, 1999), jupindá e espera-ai (PEREIRA e LOPES, 2006).

A espécie *Uncaria guianensis* foi descrita pela primeira vez em 1775 nas Guianas como *Ouroouparia guianensis* (Aublet) e depois de duas décadas, a nomenclatura foi modificada para *Uncaria guianensis* a qual permanece inalterada até os dias atuais (VILCHES, 1997). Popularmente é conhecida como uña de gato, uña de gavián, gabarato colorado, gabarato casha (ARELLANO, 1994), unganangui (RUTTER, 1990), tambor huasca, ancayacu (GENTRY, 1993), paraguayo e ancajsillo (VILCHES, 1997).

2.2.2. Habitat

U. tomentosa possui folhas perenes, as flores amarelo-esbranquiçadas e os espinhos são pontiagudos de consistência lenhosa, que facilitam a sua aderência às cascas e ramos das árvores (KEPLINGER et al., 1999; GANZERA et al., 2001). É uma trepadeira gigante cuja altura, da planta adulta, pode atingir entre 10 a 30 metros (MIRANDA et al., 2001). O diâmetro da base do cipó de plantas adultas, que já floresceram, varia de 5 a 40 cm (GUEVARA, 1995). Indivíduos com 5 a 8 cm de diâmetro de DAP (diâmetro na altura do peito) fornecem em média de 0,3 a 0,5 kg de casca seca. Como em geral, plantas com esses diâmetros apresentam entre 20 a 25 m de comprimento, rendem de 8 a 10 kg de cascas secas (MIRANDA et al., 2001; SILVA 2008). As cascas do cipó são utilizadas há pelo menos 2000 anos na medicina tradicional de algumas tribos peruanas, especialmente os *Asháninka* (PILARSKI et al., 2006), povo a quem também é atribuído o nome de Kampa (PIMENTA, 2005).

U. guianensis é uma trepadeira que atinge de 5 a 10 metros e apresenta diâmetro da base de 4 a 15 cm, o cipó é mais rasteiro do que trepador por apresentar espinhos em forma de gancho em cada axila foliar, o que dificulta a aderência em outras plantas (GUEVARA, 1995). Quando cresce isolado, fora da mata, forma uma pequena touceira de hastes mais ou menos verticais de até 5 m de altura. Suas folhas são simples, opostas, pecioladas, membranáceas, de 5-10 cm de comprimento. As Inflorescências são glomérulos axilares, pedunculadas, de forma globosa, com flores amarelo-esbranquiçadas (LORENZI e MATOS, 2008) (Figura 1).

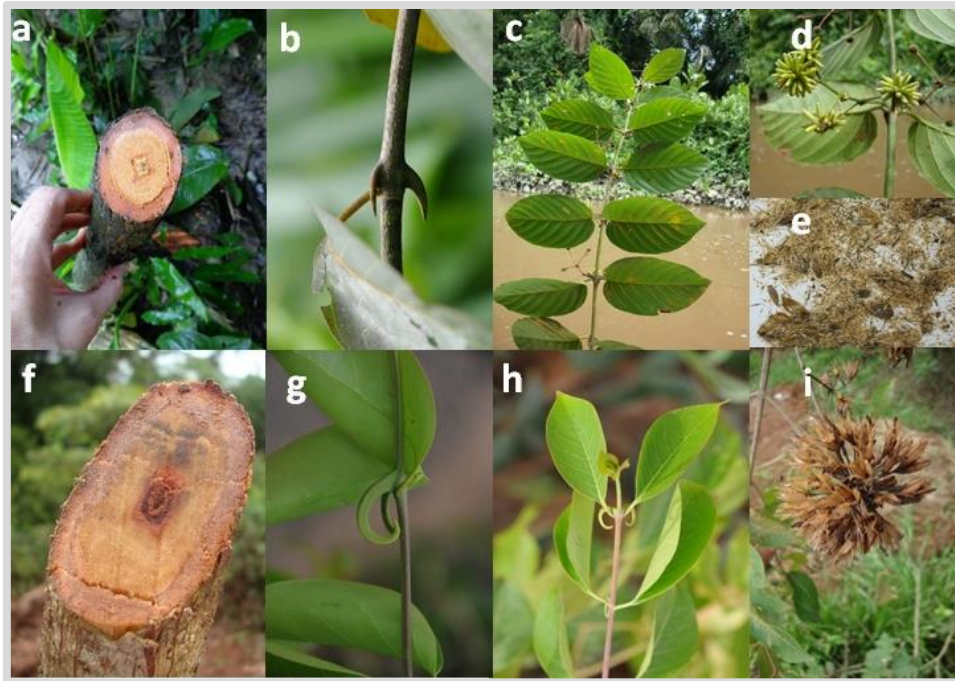


Figura 1. *Uncaria tomentosa*: a) Caule, b) Espinhos, c) Face abaxial das folhas, mostrando as nervuras com aparência de “veias finas” d) Inflorescência, e) Sementes. *Uncaria guianensis*: f) Caule, g) Espinhos, h) Folhas, i) Fruto. **Fonte: Ana Maria Soares Pereira.**

2.2.3. Distribuição geográfica

A espécie *U. guianensis* é encontrada entre 08°04'00"N-17°32'00"S e 44°56'00"E - 78°25'42"W, e em altitudes de 7 - 1.010 m sendo estas áreas localizadas na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela. Enquanto a distribuição de *U. tomentosa* está entre 15°30'00"N-13°36'00"S e 51°58'00"E - 89°00'00"W e em altitudes de 5 - 750 m em áreas que abrangem Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, Guiana, Guiana Francesa, Honduras, Nicarágua, Panamá, Peru e Venezuela (ZEVALLOS-POLLITO e TOMAZELLO FILHO, 2010). No Brasil a espécie *U. guianensis* é encontrada nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, enquanto *U. tomentosa* está predominantemente distribuída nos estados do Acre, Amapá, Amazonas e Pará (PEREIRA e LOPES, 2006).

2.2.4. Etnofarmacologia e atividade farmacológica

As duas espécies são utilizadas por povos tradicionais da Amazônia para o tratamento de várias doenças como, por exemplo, asma, artrite, dermatite, diabetes, gastrite, gonorreia, inflamação das vias genito-urinárias, irregularidades do ciclo menstrual, processos virais, tumores (benigno e maligno) e úlceras (VILCHES, 1997).

Estudos etnofarmacológicos realizados com a espécie *U. tomentosa* mostram que popularmente é usada para o tratamento de abscessos, asma, artrite, doenças da pele, doenças infecciosas, ferimentos profundos, gastrite, inflamação em geral, reumatismo, tumores malignos, úlceras gástricas, na recuperação pós-parto, na prevenção de doenças em geral, purificador dos rins e nas irregularidades do ciclo menstrual (AQUINO et al., 1991; DE FEO, 1992; AQUINO et al., 1997; SHENG et al., 1998; KEPLINGER et al., 1999; CUNHA et al., 2003; GARCIA PRADO et al., 2007; LORENZI e MATOS, 2008).

Em razão da tradicionalidade de uso, de pesquisas farmacológicas que comprovam sua eficácia terapêutica, bem como dos estudos fitoquímicos e analíticos que possibilitam o controle de qualidade de medicamentos produzidos a partir de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, o uso destas espécies tem sido estimulado por programas governamentais que visam o atendimento primário a saúde. Assim, a espécie *U. tomentosa* foi incluída no rol de plantas descritas nas monografias de plantas medicinais da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1997) e na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do governo brasileiro (RENAME, 2013) (BRASIL, 2013).

Estudos farmacológicos realizados com extratos de *U. guianensis* e *U. tomentosa* comprovaram os efeitos antioxidante, antidiabético, antimicrobiano, anti-inflamatório, imunoestimulante, anticâncer e anti doença de Parkinson (ZHANG et al., 2015).

Além dos dados etnofarmacológicos, vários ensaios farmacológicos realizados *in vitro* e *in vivo* com *U. tomentosa* comprovaram as atividades antioxidantes (DREIFUSS et al., 2013), anticâncer (PILARSKI et al., 2010), anti-inflamatória (ROJAS-DURAN et al., 2012), antimicrobiana (CCAHUANA-VASQUEZ et al., 2007), antiherpética (CAON et al., 2014), contraceptiva

(NOGUEIRA NETO et al., 2011), neuroprotetora (SHI et al., 2013) e antidiabética (DOMINGUES et al., 2011).

2.2.5. Fitoquímica

O mais importante grupo de metabólitos secundários encontrados nas espécies *U. guianensis* e *U. tomentosa* são os alcaloides, os quais estão divididos em tetracíclicos indólicos (corinanteína, diidrocorinanteína, hirsuteína e hirsutina), oxindólicos (rinchofilina, isorinchofilina, corinoxeína, isocorinoxeína, rotundifolina e isorotundifolina), os pentacíclicos indólicos (acuamigina, augustina, augustolina, isoamalicina, tetrahydroalstonina) e oxindólicos (especiofilina, mitrafilina, isomitrafilina, pteropodina, isopteropodina e uncarina F) e os glicoidindólicos (3 α -diidrocadambina e dolichantosina) (LAUS et al., 1997; FALKIEWICZ e LUKASIAK, 2001; LUNA-PALENCIA et al., 2013). O alcaloide mitrafilina é considerado o marcador químico dos medicamentos produzidos a partir de *U. tomentosa* e *U. guianensis*.

Além dos alcaloides, também se destacam os heterosídeos triterpênicos derivados do ácido quinóico, e os polifenólicos, em especial taninos (PAVEI et al., 2012; SHENG et al., 2005).

Ambas as espécies apresentam quimiotipos quanto à presença e ausência dos alcaloides pentacíclicos e tetracíclicos e esses variam também de acordo com a época do ano em que a planta é coletada (PEÑALOZA et al., 2015; REINHARD, 1999). Embora haja similaridade entre os metabólitos secundários presentes em *U. tomentosa* e *U. guianensis* existem algumas substâncias que são produzidas por uma e não pela outra, um exemplo é o flavonoide canferitrina presente nas folhas e ramos de *U. guianensis* que tem sido considerado um marcador químico para diferenciar estas espécies (VALENTE et al., 2009).

O teor de alcaloides totais em plantas micropropagadas de *U. tomentosa*, após aclimação varia de acordo com a idade, sendo que plantas com seis meses são mais produtoras do que plântulas com dois meses ou com dois anos. O teor de alcaloides tetracíclicos é maior em plântulas mais jovens enquanto os pentacíclicos são mais acumulados em plantas mais velhas (LUNA-PALENCIA et al., 2013).

2.2.6. Características relevantes das espécies alvo

Essas espécies são próprias de climas úmidos tropicais e subtropicais, necessitando para seu desenvolvimento de temperaturas e precipitações médias anuais de 17 a 25,7°C e 1200 a 6000 mm, respectivamente (ZEVALLA e ZEVALLOS, 1996). Desenvolvem-se em solos de origem aluvial de textura franco-arenosa ou franco-argilosa (SHUNKE, 1998), com pH variando de fortemente ácido a ligeiramente alcalino, com abundante matéria orgânica, em áreas de pouca drenagem ou alagadas (ZEVALLOS et al., 2000).

Ambas crescem em vários geoambientes, sendo que o número de indivíduos por hectare varia em média de 33 em várzea, 10,7 em capoeira e 1,7 em terra firme (MIRANDA et al., 2001). A espécie *U. tomentosa* ocorre em solo rico em matéria orgânica, em áreas de florestas primárias, restingas e às margens dos cursos de água, enquanto *U. guianensis* cresce em florestas secundárias, capoeiras, nas margens de rios e estradas. Apresenta elevada capacidade de colonizar áreas antropizadas e degradadas, é considerada invasora em áreas de pastagem abandonadas e no Brasil nas regiões de ocorrência natural é encontrada em maior abundância e frequência do que *U. tomentosa* (GUEVARA, 1995; MIRANDA et al., 2001).

Foi realizado levantamento de ocorrência de *U. tomentosa* na microrregião do vale do Juruá, no Acre, que abrange as comunidades de Alto Pentecostes em Cruzeiro do Sul, Seringal São Salvador em Mâncio Lima e Reserva Indígena *Asháninka* em Marechal Traumaturgo, nessas áreas foi estimada produção de 13 kg de casca seca por hectare, o diâmetro médio das plantas foi de 5,4 cm, sendo o número de indivíduos por hectare de 17 em várzea, 44 em capoeira e 1 em terra firme (MIRANDA et al., 2003). O mesmo estudo para *U. guianensis* mostrou estimativa de 199 kg/ha de casca seca, sendo este valor 15 vezes maior do que o estimado para *U. tomentosa*. O diâmetro médio das plantas foi de 2,8 cm, sendo o número de indivíduos por hectare em várzea de 62, em capoeira de 97 e em terra firme de 4,8 (MIRANDA et al., 2003).

Níveis de sombreamento interferem no desenvolvimento inicial da *U. tomentosa*. A condição de 55 a 60% de sombra favorece o desenvolvimento em altura e o acúmulo de biomassa (LUNZ et al., 2014). Apresenta fototropismo positivo, sendo a luminosidade mais necessária para o desenvolvimento de indivíduos mais jovens localizados em área de regeneração natural (CANALES-SPRINGETT et al.,

2013a). A regeneração natural de *U. guianensis* em áreas antropizadas é influenciada pela quantidade de luz que chega no sub bosque ou na vegetação rasteira, sendo esse fator especialmente significativo para as plantas mais altas, mas a porcentagem de iluminação não precisa ser excessiva e abundante (CANALES-SPRINGETT et al., 2013b).

O crescimento das plantas, em altura, não é influenciado por níveis de precipitação e altitude, mas principalmente pela fertilidade do solo que deve ser rico em matéria orgânica e nos elementos N, P, K, Ca e Mg e pH entre 5,3 a 6,1 (TOREJÓN e QUILIANO, 2007; MECHÁN et al., 2007).

A floração de *U. tomentosa* ocorre em torno do mês de setembro, a frutificação e maturação dos frutos entre outubro e novembro e a dispersão das sementes em janeiro e fevereiro. O principal agente polinizador são os insetos e após a polinização, o desenvolvimento dos frutos até o estágio de maturação ocorre de seis a oito semanas. A espécie é perenifólia e o ciclo para a produção de sementes é anual (FLORES, 1995; MIRANDA et al., 2001). Já o período de floração e frutificação de *U. guianensis*, na floresta Peruana, ocorre de fevereiro a maio e de abril a junho, respectivamente (FLORES, 1995; QUEVEDO, 1995) e no estado do Acre, no vale do Rio Juruá, a floração se dá de fevereiro a abril, a frutificação de maio a junho e a maturação do fruto, bem como a dispersão da semente de maio a agosto (MIRANDA et al., 2001).

A produção de mudas por sementes é viável para *U. tomentosa*, entretanto as plantas produzidas por propagação sexuada apresentam significativa variabilidade química. O tamanho das sementes varia de 2 a 4 mm e são fotoblásticas positivas. Podem ser conservadas em câmara fria a temperatura de 10°C e quando armazenadas em saco de papel, em ambiente seco e escuro, a temperaturas menores de 25°C perdem a viabilidade com o passar do tempo, variando de 65 a 84% com 10 dias de armazenamento para 47 a 58% com 120 dias (GUEVARA, 1995; INDACOCHEA e POLLITO, 1999). A propagação da *U. guianensis* também pode ser feita através de sementes, sendo a porcentagem de germinação variável entre 25 a 85% (GUEVARA, 1995; PEREIRA e LOPES, 2006) e quando as sementes são introduzidas *in vitro* apresentam germinação de 90% (PEREIRA et al., 2006). Há relato de que plantas advindas de sementes apresentam grande variabilidade quanto à morfologia e teor de metabólitos secundários (TORREJÓN, 1997).

Além da propagação por semente, a multiplicação também pode ser realizada pela técnica de micropropagação, que é apontada como promissora para obtenção de plantas em larga escala com interesse industrial. Nesse contexto, há várias descrições de introdução *in vitro* de *U. tomentosa*, entretanto não foi publicado até o momento um protocolo de micropropagação que mostre a viabilidade da produção em escala comercial, como por exemplo utilizando sistema de imersão temporária (biorreatores) (FERIA-ROMERO et al., 2005; PEREIRA et al., 2006; LUNA-PALENCIA et al., 2013).

A produção de clones por técnicas biotecnológicas é certamente a alternativa mais viável para garantir uma padronização de matéria prima das espécies de *Uncaria*. Além da variabilidade química encontrada nos indivíduos, há relato de três variedades de *U. tomentosa*, as quais diferem entre si apenas pela coloração do córtex, recém cortado, e pela coloração da raiz. Assim, estão classificadas como coloração do cerne cinza esbranquiçado, marrom amarelado e vermelho escuro (KEPLINGER, 1982). Outra diferença relevante entre essas espécies, do ponto de vista citogenético, é que *U. guianensis* apresenta cromossomos maiores e mais heterocromatina em seu núcleo (TEPPNER et al., 1984).

2.2.7. Mercado e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

A casca de *Uncaria* tem sido comercializada por preços muito variados. No Perú entre 1996 e 1998 foram exportadas em média 300 toneladas de casca seca, compradas das comunidades tradicionais por US\$ 0,90 o quilo e exportadas para os Estados Unidos a US\$ 3,90 e de acordo com o Ministério da Agricultura do Perú, no ano de 2000 a exportação de unha de gato foi de cerca de 135 toneladas (SPIEGELFELD, 2005; MIRANDA, 2005). No Brasil, no estado do Acre, a exportação de *U. tomentosa* foi intensificada a partir do ano 2000, sendo a coleta estimada em 20 toneladas da planta por ano (LIMA, 2005).

De modo geral, o lucro da comercialização de produtos advindos da floresta coletados de forma extrativista, por comunidades tradicionais, não chega às mãos destes grupos étnicos ficando concentrado nos agentes que encaminham a matéria prima para a indústria e/ou grandes centros de distribuição.

O Perú e EUA iniciaram na década de 80, a comercialização, os

estudos farmacológicos e o desenvolvimento de patentes com as espécies *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*, enquanto o Brasil apenas no ano 2000 começou a considerar a importância desses recursos genéticos, abundantes na floresta amazônica brasileira, iniciando então a exploração extrativista e inclusão dessas espécies em listas de plantas prioritárias em programas de fitoterapia do Ministério da Saúde.

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006) descreve, em suas diretrizes, a importância de se conhecer a cadeia produtiva das plantas medicinais. Entretanto, este tema ainda não foi bem desenvolvido para as espécies *U. guianensis* e *U. tomentosa*. Um estudo realizado por BLAS (1999) descreve, em parte, a cadeia produtiva de *U. tomentosa* em uma área de 10 ha na comunidade nativa de Bajo Naranjillo no Perú, que incluiu um inventário florestal e plano de manejo baseado na capacidade de rebrota da espécie. Foi estimada a retirada de 740 kg casca por hectare, em bosque natural, com um ciclo de poda de dez anos.

2.3. Conservação e Diversidade Genética

Estima-se que mil espécies vegetais sejam extintas por ano no planeta (SANDES e DI BLASI, 2000), e encontrar alternativas que permitam a conservação e a preservação dessas espécies vegetais e dos ecossistemas, tornam-se primordiais, de modo que assegure a existência e a disponibilidade dos recursos genéticos. De acordo com Nass (2001), a conservação da biodiversidade não deve se resumir à proteção da natureza frente ao desenvolvimento, mas procurar também, satisfazer a demanda humana por recursos biológicos e, simultaneamente, garantir a sustentabilidade em longo prazo da riqueza biótica do planeta.

O crescente desmatamento em biomas ricos em diversidade como a Amazônia, tem dado espaço à Agropecuária, e isso causa perdas irreparáveis ao ecossistema. Dessa forma, diversas áreas são utilizadas para a exploração de culturas economicamente importantes destruindo desta maneira os recursos genéticos, causando erosão desses.

Para a conservação de espécies vegetais, o estabelecimento de bancos de germoplasma, é uma garantia, pois permite o acesso ao material genético para caracterização, domesticação, desenvolvimento de novas variedades e prospecção de

genes, além de preservar a espécie e evitar os riscos de extinção, através da erosão genética (FRANKHAM et al., 2008).

O tema conservação gerou uma publicação no ano de 1968, intitulado *Clube de Roma*, resultante na obra *Limites do Crescimento* que concluiu que os maiores entraves para o desenvolvimento humano são os meios de produção, ocupação ilegal de encostas, poluição e escassez de recursos naturais. Essa obra teve um impacto muito grande e possibilitou que o assunto sobre meio ambiente fosse inserido na agenda internacional de inúmeros países que compõe a Organização das Nações Unidas (ONU) e discutida em diversas Conferências como em 1972 em Estocolmo, 1975 em Belgrado, 1992 no Rio de Janeiro, 1999 em Istambul, 2000 em Nova York, 2002 em Johannesburgo, 2005 nas Ilhas Maurício e em 2012 novamente no Rio de Janeiro (AMARAL et al., 2001, BRASIL, 2014).

Esses debates mudaram os propósitos de se conservar o meio ambiente, sendo visto agora como um importante tópico em relação ao aspecto genético, de forma que os indivíduos e populações naturais evoluam, sem deixar de servir ao homem.

Com o objetivo de se conservar o meio ambiente, surge em todo o mundo, o conceito de Unidades de Conservação (UC). No Brasil, a partir da década de 1970 e início da década de 1980 foi observado um aumento na quantidade de áreas estabelecidas e protegidas. O total da área protegida em cada bioma brasileiro a nível Federal e Estadual encontra-se na Tabela 1 (CADASTRO NACIONAL DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, 2015).

Tabela 1- Extensão das áreas de Unidades de Conservação (UC) por Bioma. Fonte: CNUC, 2015.

Bioma	Área protegida (ha)	% do Brasil
Amazônia	113.630.400	73,25
Caatinga	6.344.800	4,09
Cerrado	17.460.400	11,25
Marinho Costeiro	5.437.900	3,50
Mata Atlântica	11.064.900	7,13
Pampa	486.500	0,31
Pantanal	694.700	0,44
Total	155.119.600	100

Sob o panorama da conservação da diversidade existente, surge a genética da conservação, ciência proveniente da genética evolutiva e da teoria da

genética quantitativa, muito utilizada no melhoramento genético (FARWIG et al., 2007). A genética da conservação visa compreender o porquê de populações que apresentam cruzamentos ao acaso e maiores variabilidades de genes, geralmente, possuir uma maior vantagem metabólica, nutricional e de desempenho, e consequentemente diferentes taxas reprodutivas e de sobrevivência frente às pressões seletivas em detrimento de populações com menores números de indivíduos e reduzida variabilidade genética (HEYWOOD e IRIONDO, 2003).

Para a conservação de espécies medicinais e aromáticas, a existência e o reconhecimento de quimiotipos é muito importante. De acordo com Vieira (2000), é fundamental que a conservação de recursos genéticos dessas espécies, tenha como base uma coleta de germoplasma que amostrasse os diferentes quimiotipos existentes, permitindo obter maior variabilidade.

A utilização de plantas de interesse medicinal através do extrativismo torna-se grave quando partes essenciais para a sua reprodução (flores e sementes) são retiradas, ou até mesmo a planta inteira (SILVA et al., 2001). Nesse sentido, estudos que possibilitem aferir como essas plantas estão no tempo e no espaço são necessários.

A estrutura das populações é formada pela estrutura genética e demográfica, que apesar de serem relacionadas, são distintas. A estrutura demográfica está pautada aos processos associados com nascimento, morte, dispersão e sistemas de acasalamento. Já a estrutura genética é determinada pela estrutura de população bem como por processos genéticos tais como seleção, recombinação (migração ou fluxo gênico) e mutação (HAMRICK, 1992; SLATKIN, 1994).

A diversidade genética é caracterizada por diferenças em muitas características como, por exemplo, cor das flores e altura das plantas, e é geralmente descrita usando polimorfismo, heterozigosidade média e diversidade alélica. Esse fator é fundamental para a adaptação de espécies submetidas constantemente a pressões seletivas como variações dos níveis de precipitação e suprimento de alimentos, catástrofes ambientais como tornados, enchentes, períodos de longas estiagens, inverno severo, além dos impactos causados por deleções genéticas devido à endogamia ou acúmulo de mutações (FRANKHAM et al., 2008).

Populações de maior tamanho geralmente possuem grande diversidade genética, que pode ser manifestada nas variações morfológicas, de desempenho e fisiológicas, contrastando com populações pequenas ou populações que

sofreram gargalo populacional, que possuem pequena diversidade genética. Essa variação é composta tanto de influência ambiental, sobre os indivíduos, como por variações devidas às diferenças nos alelos e na heterozigosidade em muitos loci (FRANKHAM et al., 2008). Essas diferenças são fundamentais para a manutenção do valor adaptativo das espécies e são dependentes de fatores como mutação, inserção de novos genes na população através de cruzamentos entre indivíduos migrantes, além de um habitat não fragmentado que possibilite aos indivíduos o fluxo gênico.

Uma das principais preocupações dos programas de conservação, juntamente à preservação de habitats, é a manutenção de níveis adequados de diversidade genética. Com o contínuo processo de mudanças ambientais, a diversidade genética existente dentro de populações permite a continuidade da evolução da espécie e sua adaptação a essas novas condições. No entanto, a perda de diversidade pode interferir e levar a espécie a processos de endogamia e redução da reprodução e sobrevivência (FRANKHAM et al., 2006). O uso de ferramentas moleculares para a interpretação dos efeitos da fragmentação dos remanescentes sobre a estrutura genética da população apresenta grande importância.

2.4. Marcadores Moleculares

Nos últimos anos, houve significativo aumento de metodologias da genética molecular e suas aplicações para solucionar problemas e aumentar a eficiência dos programas de conservação e uso dos recursos genéticos vegetais (FALEIRO, 2007). Os marcadores moleculares permitem gerar grande quantidade de informações sobre identidade genética, diversidade, frequência gênica, relacionamentos filogenéticos, mapeamento genético, seleção assistida, entre outras. Essas informações são de muita utilidade em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético. Dessa forma, pode-se dizer que os marcadores moleculares são ferramentas poderosas na geração de informações úteis em diferentes etapas, desde a coleta, caracterização e uso dos recursos genéticos até atividades de pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento (FALEIRO et al., 2011).

Os marcadores moleculares avaliam os genótipos, sendo as bandas comuns a todos os indivíduos interpretadas como semelhanças genéticas e as bandas não comuns como diferenças. Os resultados são codificados, a fim de gerar uma

matriz de similaridade ou dissimilaridade, decodificada por meio de análise de agrupamento ou multivariada (LANZA et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2009).

Atualmente, há um grande número de marcadores moleculares e o uso de um ou outro vai depender, entre outros fatores, do objetivo do estudo, da infraestrutura disponível, dos recursos financeiros para o investimento, da disponibilidade de mão de obra com treinamento apropriado e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (FALEIRO et al., 2011).

Nas décadas de 1980 e 1990 os marcadores do tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) foram os mais utilizados, sendo responsáveis pelo desenvolvimento dos primeiros mapas genéticos de espécies cultivadas (GUIMARÃES et al., 2009). Além desses, atualmente também é utilizado o marcador do tipo SRAP (*Sequence-related Amplified polymorphism*).

2.4.1. SRAP (*Sequence-related Amplified polymorphism*)

O marcador SRAP (*Sequence-related Amplified polymorphism*) é uma técnica que combina simplicidade, confiabilidade, taxa de transferência moderada e facilidade de sequenciamento das bandas relacionadas, destinado para amplificação de bases de leitura aberta (região *Orf*) (LI e QUIROS, 2001).

O SRAP é um sistema de marcador baseado em PCR (Amplificação em Cadeia da Polimerase) com a amplificação de fragmentos a partir de dois *primers*, o *Forward* com 17 bases e o *Reverse* com 18 bases. As dez primeiras bases começando na extremidade 5' do *Forward* são sequências não específicas seguidas pela sequência CCGG e três nucleotídeos seletivos na extremidade 3'. O *primer Reverse* consiste nos mesmos componentes do *Forward* com a diferença da sequência AATT ao invés de CCGG e seguido dessa sequência, três bases seletivas são adicionadas na extremidade 3'. A única regra para a construção desses *primers* é que eles devem ser formados de pelo menos 40 a 50% de bases GC. Além disso, a sequência (com nenhuma constituição específica) deve ser diferente de cada uma por 10 ou 11 bases. Os exemplos de *primers Forward* e *Reverse*, descritos por Li e Quiros (2001), podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers Forward e Reverse* utilizados na técnica SRAP.

Forward (17pb)	Reverse (18 pb)
me1, 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	em1, 5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
me2, 5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	em2, 5'-GACTGCGTACGAATTTTCG-3'
me3, 5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	em3, 5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
me4, 5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	em4, 5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
me5, 5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	em5, 5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
	em6, 5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'

Robarts e Wolfe (2014) relatam que a técnica de SRAP pode ser aplicada em diversos tipos de estudos, como sistemática vegetal, biogeografia, conservação e ecologia, obtendo vantagens em relação a outras técnicas bastante utilizadas, visto que as demais possuem limitações como inconsistências na reprodutibilidade dos dados (RAPD), menor produção em termos de polimorfismos detectados por algumas combinações de *primers* (ISSR) e a necessidade de maior tempo de execução (AFLP).

Como outros marcadores dominantes, o SRAP tem demonstrado a capacidade de elucidar a variação genética em vários níveis taxonômicos, com as vantagens de ser uma técnica mais simples, barata e eficaz, por utilizar apenas uma reação de PCR para a produção de fragmentos do genoma com alta reprodutibilidade e versatilidade (LI e QUIROS, 2001).

Existem alguns estudos que utilizaram esse marcador em diversas culturas como *Prunus persica* L. (AHMAD et al., 2004), *Buchloe dactyloides* (BUDAK et al., 2004), *Curcubita moschata* (FERRIOL et al., 2004),); híbrido de *Gossipum barbodense* X *Gossipum hirsutum* (LIN et al., 2004), *Tropaeolum tuberosum* (ORTEGA et al., 2007), *Celosia argenta* (FENG et al., 2009), Cereais (ZAEFIZADEH e GOLEIV, 2009), plantas da família das Cucurbitaceae (YEBOAH et al., 2007; ZHANG et al., 2012), *Dendrobium officinale* e *Dendrobium hercoglossum* (XUE et al., 2010), *Saraitia grosvenorii* (LIU et al., 2011), *Hibiscus cannabinus* L. (CHEN et al., 2011); *Dendranthema morifolium* (ZHANG et al., 2011b), *Brassica oleracea* (ZHANG et al., 2011a), *Musa* spp. (YOUSSEF et al., 2011), *Oriza sativa* (DAI et al., 2012), *Vitis vinifera* e variedades selvagens de *Vitis* (GUO et al., 2012), *Galega officinalis* L. (WANG et al., 2012) *Brassica napus* e *Brassica rapa* (LI et al., 2013), *Diospyros* L. (JING et al., 2013), *Vicia amoena* (LIU et al., 2013), *Cynodon arcuatus* (HUANG et al.,

2013), *Phaseolus vulgaris* L. (CEYLAN et al., 2014), *Pleurotus pulmonarius* (YIN et al., 2014), *Salvia miltiorrhiza* (PENG et al., 2014), *Crocus sativus* (BABAEI et al., 2014) e acessos selvagens e cultivados do gênero *Zanthoxylum* (FENG et al., 2015).

3. HIPÓTESES

Populações naturais de *Uncaria tomentosa* e *U. guianensis* apresentam ampla diversidade genética e não se encontram ameaçadas de extinção.

A presença de quimiotipos em populações naturais de *Uncaria tomentosa* e *U. guianensis*, permite a seleção de genótipos mais produtores em mitrafilina para a viabilização de fitoterápicos de qualidade.

4. JUSTIFICATIVA

Uncaria tomentosa e *Uncaria guianensis* são plantas medicinais submetidas à ação antrópica que ocorrem no bioma Amazônia, e necessitam de cuidados em relação à conservação, visto que principalmente a *U. tomentosa* que já se encontra na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do governo brasileiro (RENAME). A espécie possui atividade anti-inflamatória atribuída à presença de alcaloides do tipo oxindólicos pentacíclicos, especialmente mitrafilina e isomitrafilina. A espécie *U. guianensis* não está listada entre as plantas medicinais que serão oferecidas pelo SUS, no entanto, os estudos farmacológicos mostraram que ambas as espécies apresentam a mesma atividade, e, além disso a *U. guianensis* ocorre na natureza em maior frequência em relação a *U. tomentosa*.

Apesar da importância terapêutica dessas espécies, não há estudos agronômicos e de diversidade química e genética que possam viabilizar estratégias de conservação e produção que assegure o seu uso sustentável.

5. OBJETIVOS

5.1. Geral

Avaliar a diversidade genética e química entre os indivíduos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* por marcador molecular SRAP e quantificar os alcaloides oxindólicos pentacíclicos mitrafilina e isomitrafilina em folhas por HPLC.

5.2. Específicos

- Coletar e georreferenciar amostras de indivíduos das espécies alvo nos estados do Acre, Amapá, Amazonas e Pará;
- Caracterizar os ambientes onde os indivíduos foram coletados;
- Identificar combinações polimórficas para o estudo de variabilidade genética;
- Estimar as frequências alélicas e parâmetros genéticos básicos;
- Avaliar a estrutura genética populacional;
- Determinar a divergência genética e padrões espaciais;
- Quantificar os alcaloides mitrafilina e isomitrafilina entre e dentro das populações naturais;
- Propor estratégias de conservação para as espécies alvo.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Coleta

As coletas dos indivíduos da espécie *U. tomentosa* foram realizadas nos municípios de Cruzeiro do Sul, Feijó, Mâncio Lima e Tarauacá, no estado do Acre; Macapá, Mazagão e Santana, no estado do Amapá; e Afuá, no estado do Pará. Já os indivíduos de *U. guianensis* foram coletados nos municípios de Assis Brasil, Cruzeiro do Sul, Feijó, Rio Branco e Xapuri, no estado do Acre; Boca do Acre, no estado do Amazonas; e Mazagão e Oiapoque, no estado do Amapá.

A amostragem dos indivíduos das populações foi realizada considerando a disponibilidade das plantas e facilidade de acesso no local. As informações sobre topografia, características do habitat, data da coleta, frequência dos indivíduos e características morfológicas das plantas foram anotadas em cadernetas de campo. Foram tomados os dados de localização geográfica (altitude, latitude e longitude) por meio do Sistema de Posicionamento Global (GPS) para indicação exata da localidade. Foram coletados 160 indivíduos para a *U. tomentosa* e 157 para *U. guianensis*, totalizando para ambas, oito populações.

Para a análise de diversidade genética, foram coletadas folhas jovens e sadias de cada indivíduo, acondicionadas em tubos de fundo cônico, devidamente identificados contendo sílica gel e posteriormente estocados em freezer a -20°C até o momento da extração.

Para os estudos fitoquímicos foram coletadas folhas de todos os indivíduos e acondicionados em sacos de papel, devidamente identificados para serem secos em estufas de circulação forçada de ar a 45°C.

Foi realizada a confecção de exsiccatas de todos os indivíduos coletados e depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (HMP-UNAERP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) sob os números HPMU-2904 a 3066 (*U. tomentosa*) e HPMU-2844 a 2926 (*U. guianensis*) (Figura 2).

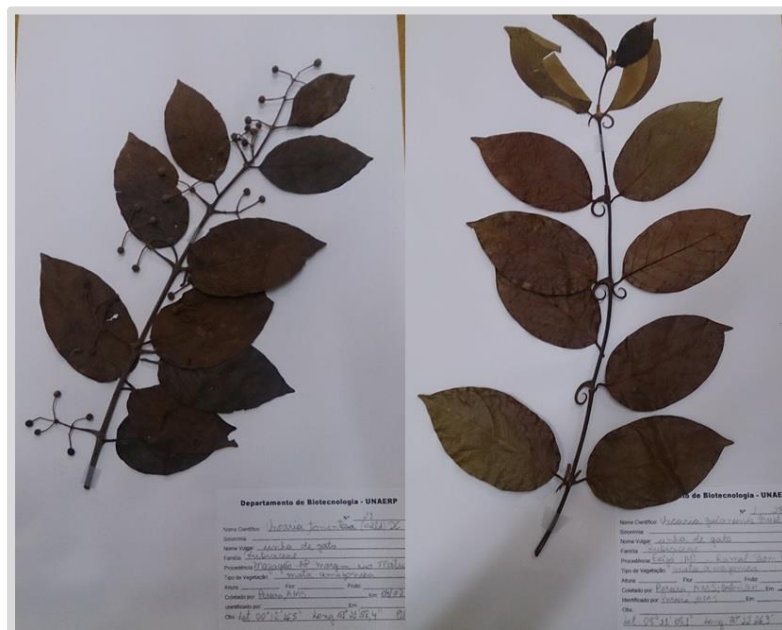


Figura 2. a) Exsicata de *Uncaria tomentosa* contendo as inflorescências. b) Exsicata de *Uncaria guianensis*.

6.2. Caracterização dos ambientes de coleta

Foi observado o grau de antropização dos ambientes de coleta visualmente e por imagens coletadas no Google Earth, dados de pluviometria obtidos no site Agritempo (<https://www.agritempo.gov.br/agritempo/index.jsp>) e dados de altitude obtidos por GPS.

6.3. Condições gerais dos experimentos

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Fitoquímica e Biologia Molecular do Departamento de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

6.4. Análise da variabilidade genética

6.4.1. Extração do DNA

Folhas jovens foram selecionadas para a extração do DNA genômico pelo método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987) com algumas modificações. Cem miligramas de folha de cada indivíduo foram maceradas em nitrogênio líquido para realizar a quebra da parede celular, homogeneizada a 4°C e adicionados 1200µL do tampão de extração para a lise das membranas celulares, em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 30 min. Posteriormente, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente e, adicionada a ela 200µL de clorofil (clorofórmio + álcool isoamílico 24:1) para promover a extração dos lipídeos, proteínas e polissacarídeos.

Após agitação, o material foi centrifugado a 14000 g/5min. A fase aquosa foi removida para outro tubo, à qual foi adicionado 600µL de isopropanol para a precipitação dos ácidos nucleicos, misturando-se bem. Após centrifugação a 14000 g/10min, foi adicionado ao sedimento 1 mL de tampão de lavagem (etanol 70% v/v e acetato de amônio 10mM), que permaneceu à temperatura ambiente por 20 min. A centrifugação foi repetida a 14000 g/5min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento (DNA) foi lavado duas vezes em etanol 70%, seguido de centrifugação a 14000 g por 5 min. Após uma hora de secagem, à temperatura ambiente, o “pellet” foi ressuscitado em 50µL de água ultrapura (Milli-Q). O DNA foi tratado com a enzima RNase para a retirada de RNA, que poderiam interferir nas análises posteriores. A qualidade do material genético de cada indivíduo foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% com tampão de corrida TEB 1X e a quantidade avaliada através do espectrofotômetro *NanoDrop* (NANOPHOTOMETER IMPLN P 360).

Após a ressuspensão do DNA extraído e quantificado, cada indivíduo foi diluído para uma concentração de 5 ng.µL⁻¹ e foram selecionados dois indivíduos de cada população para realizar o teste com as combinações de *primers*.

6.4.2. Análise SRAP

A análise SRAP foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Li e Quiros (2001). Foram testadas cinco combinações de *primers* para *U. tomentosa* (Tabela 3) para a escolha das três melhores e seis combinações de *primers* para *U. guianensis*, para a escolha das quatro melhores combinações (Tabela 4).

As reações de amplificação foram efetuadas contendo 1 μL de 10X tampão de reação, 0,8 μL de MgCl_2 (25mM), 1 μL de mix de dNTP (2,5mM), 0,4 μL primer *Forward* (me) (5 μM) e 0,4 μL primer *Reverse* (em) (5 μM), 0,2 μL *Taq* DNA polimerase (5U/ μL), 1 μL de DNA (5ng. μL^{-1}) (com exceção de uma população – UTAF (Afuá-PA), que foi utilizada a concentração de 10 ng. μL^{-1} de DNA) e água deionizada para completar o volume de 10,0 μL .

Esta reação foi submetida a cinco ciclos a 94°C, 1 min, 35°C, 1 min, e 72°C, 1 min. Em seguida, a 35 ciclos a 94°C, 1min; 50°C, 1 min, 72°C, 1min; e para finalizar 7 minutos a uma temperatura de 72°C para a extensão da fita de DNA. Antes da aplicação das amostras no gel foi feita a desnaturação das fitas em termociclador a 95°C por 5 minutos.

Tabela 3. Sequência de combinações de *primers* testados para SRAP em *Uncaria tomentosa*.

<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
me1, 5'-TGA GTC CAA ACC GG ATA-3'	em3, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GAC-3'
me1, 5'-TGA GTC CAA ACC GG ATA-3'	em6, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GCA-3'
me3, 5-TGA GTC CAA ACC GG AAT-3'	em3, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GAC-3'
me4, 5'-TGA GTC CAA ACC GG ACC-3'	em2, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT TCG-3'
me5, 5'-TGA GTC CAA ACC GG AAG-3'	em3, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GAC-3'

Tabela 4. Sequência de combinações de *primers* testados para SRAP em *Uncaria guianensis*.

<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
me1, 5'-TGA GTC CAA ACC GG ATA-3'	em3, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GAC-3'
me1, 5'-TGA GTC CAA ACC GG ATA-3'	em6, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GCA-3'
me2, 5'-TGA GTC CAA ACC GG AGC-3'	em5, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT AAC-3'
me3, 5-TGA GTC CAA ACC GG AAT-3'	em3, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GAC-3'
me4, 5'-TGA GTC CAA ACC GG ACC-3'	em2, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT TCG-3'
me2, 5'-TGA GTC CAA ACC GG AGC-3'	em1, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT AAT-3'

6.4.2.1. *Uncaria tomentosa*

Os fragmentos resultantes do processo de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% com tampão TEB 1X. Após a

polimerização da matriz foi realizada a pré-corrida sob condições controladas por 1 hora. A corrida foi realizada em voltagem constante de 80W e temperatura máxima de 50°C por duas horas e trinta minutos. Foram aplicados no gel 14 µL de amostra (4µL de *loading buffer* + 10µL da amostra) e 1µL do marcador de peso molecular de 100 pb. A visualização do gel foi feita corando-o com solução de Nitrato de Prata e revelando em Carbonato de Sódio seguindo o protocolo descrito por CRESTE et al. (2001).

Após a placa ter sido corada foi feita a contagem manual das bandas para a geração de uma matriz binária (presença e ausência de bandas) para posterior análise dos dados.

6.4.2.2. *Uncaria guianensis*

Os fragmentos resultantes da PCR para a *U. guianensis* foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (20mL de Matriz de poliacrilamida 6,5% (KB^{Plus}), 150µL de solução APS 10%, 150µL de TEMED) em placa de 25X25 cm montada com espaçadores de 0,25 mm e pente de 48 poços (formato dente de tubarão) de espessura de 0,25mm.

Após a polimerização da matriz, foi realizada a pré-corrida sob condições controladas de 1500V, 40W, 40mA, 45°C por 25 minutos.

Foram aplicados 0,6 µL para cada amostra e 0,8µL para o marcador de peso molecular de 50 a 700 pb. As condições da corrida foram: 1500V, 40W, 40mA, 45°C por 2 horas e 30 minutos. A visualização do gel aconteceu em tempo real e a leitura da placa foi realizada no programa LI-COR SAGA^{MX} Automated Analysis v.3.3., que gerou uma matriz de dados a partir da presença e ausência de bandas.

A adição das bases arbitrárias podem compor primers sintetizados com marcação específica, por exemplo, a substância fosforamidita, que emite um sinal na presença de luz infravermelha, denominados IRDye 700 e IRDye 800. Foram marcados um primer IRDye 700 e um primer IRDye 800 para a utilização na técnica.

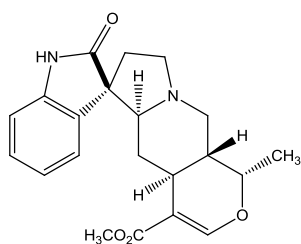
6.5. Extração e quantificação dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos (AOP) mitrafilina e isomitrafilina.

Para a extração e quantificação dos alcaloides foi utilizada a mesma metodologia para ambas as espécies estudadas.

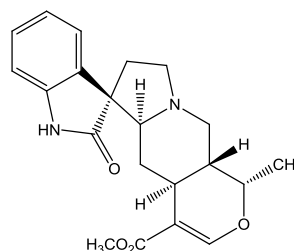
Folhas secas foram submetidas à moagem, em moinho de facas até granulometria de 40 mesh (MARCONI MA048) obtendo a droga vegetal de cada indivíduo separadamente. O método utilizado para a extração e quantificação da mitrafilina e isomitrafilina foi baseado no protocolo de BERTOL (2010) com algumas modificações.

O extrato de cada indivíduo foi obtido utilizando-se 100mg de droga vegetal em 1mL de metanol 100% (Synth®) em maceração estática em frasco âmbar a temperatura ambiente ($22\pm 1^\circ\text{C}$) por 24 horas. Este procedimento foi realizado em triplicata. Os extratos foram filtrados e secos em capela.

Para a “limpeza” das amostras, que foram analisadas via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), 15mg de extrato foram solubilizados em um mililitro de metanol (JT BAKER – CAS 67-56-1): H₂O (Milli-Q) (80:20) e aplicados em cartucho de C18 (Supelco® - LC18 reorder 57054), previamente ativado com 1mL de metanol, seguido de 1mL de metanol:H₂O nas mesmas condições de preparo das amostras (80:20). Posteriormente foram adicionados 3mL da solução metanol : H₂O (80 : 20) para a eluição dos compostos de interesse. Os analitos em solução (5 mg.mL^{-1}) foram submetidos à injeção para posterior análise dos alcaloides mitrafilina e isomitrafilina cuja estruturas estão apresentadas na figura 3, de *U. tomentosa* e *U. guianensis*.



Mitrafilina



Isomitrafilina

Figura 3. Estruturas dos alcaloides mitrafilina e isomitrafilina. **FONTE:** Adriana Aparecida Lopes.

As condições cromatográficas utilizadas foram: HPLC Shimadzu (LC-10 AD vp), acoplado a detector de arranjo diodo (SPD-M10A), coluna Zorbax XDB (150 x 4.6mm i.d., 5µm) (Agilent, USA) protegida por uma coluna guarda Eclipse XDB-C18 (4.6 x 12.5 mm i.d., 5µm). A fase móvel utilizada foi acetonitrila (JT BAKER – CAS 75-05-8) (solvente A) e acetato de amônio (Neon – CAS 631-61-8) 10 mM (ajustado para pH 6.9 com trietanolamina) (solvente B) em um gradiente linear programado: 35 % B (0.01 – 18.00 min); 50 % B (18.01 – 25.00 min); 35 - 100 % B (25.01 - 40 min); 35 % B (40.01 – 45 min); e *stop* (45.01 min). As análises foram conduzidas em temperatura ambiente (22 ± 1 °C) por 45 minutos com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ e detecção no comprimento de onda de 245 nm. Sendo o volume de injeção de 20 µL. Todos os dados foram processados pelo software LC-Solution Multi-PDA (BERTOL, 2010).

6.6. Análises Estatísticas

A genotipagem dos indivíduos foi realizada através dos dados binários, presença (1) ou ausência (0) de bandas. Os parâmetros de variabilidade genética através do índice de Nei e a porcentagem de locos polimórficos, que conjuntamente com a distância geográfica, possibilitou a análise da correlação entre distância genética e geográfica pelo teste de Mantel (DINIZ-FILHO, 2000) utilizando os softwares Popgene32 e Genes v. 2009.7.0 com 1000 simulações, de acordo com o modelo proposto por Wright (1951) que através do valor do F_{st} (Índice de fixação de alelos) mede a quantidade de indivíduos migrantes por geração e diferenciação genética entre as populações. A construção dos dendogramas foi realizada na plataforma R (CORE TEAM, 2015).

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{st}} - 1 \right)$$

Em que:

m = taxa de migração;

N = tamanho populacional;

Nm = número de migrantes/geração.

O Índice de Nei propõe um método que possibilita obter a probabilidade de identidade e não identidade gênica de dois genes escolhidos por acaso,

dados por: $J_i = \sum_k p_{ijk}^2$ e $H_i = \sum_k p_{ijk}^2$, respectivamente, sendo esta a identidade genética dentro da população. A probabilidade de não identidade, H, assim, é igual ao complemento aritmético da identidade gênica, o que é normalmente denominado de Heterozigosidade. O Índice de Shannon mede o grau de certeza em se prever a proximidade genética entre os indivíduos:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

Em que:

n = número de indivíduos de cada espécie;

S = número de espécies;

N = número total de todos os indivíduos

$$- \sum_{i=1}^S$$

p_i = abundância relativa de cada espécie, calculada pela proporção de indivíduos: n_i/N

O Teste de Mantel, uma estatística espacial explícita, necessita de matrizes de distâncias genética e geográfica, é realizado para analisar padrões geográficos que estejam atuando na diferenciação genética, por meio da seguinte equação:

$$r = \frac{2}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \frac{(x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})}{S_x S_y}$$

Onde:

X e Y = localização geográfica e distância genética nas localizações i e j

N = número de entrada de dados nas matrizes de distância

Sx e Sy = Desvios padrão para as variáveis x e y.

Frequentemente, o teste de Mantel é utilizado para avaliar se as populações estão estruturadas no modelo de isolamento-por-distância, passo-a-passo e ilhas. Esse teste se assemelha com a correlação de Pearson, entretanto a significância do valor observado do Z de Mantel é calculada por permutações em uma das matrizes de distância, gerando uma distribuição nula (DINIZ-FILHO et al., 2013).

Outra propriedade do teste de Mantel pode ser estendida para comparar duas matrizes de distâncias, controlando o efeito da outra, comumente sendo a matriz espacial (SMOUSE et al., 1986). Este tipo de correlação matricial é denominado de teste de Mantel Parcial, e tem por objetivo investigar se outros atributos, como características ambientais, juntamente com componentes geográficos explicam os padrões encontrados na variação genética (LICHSTEIN, 2007). Esta abordagem é útil quando verificado anteriormente a influência de fatores bióticos e abióticos na diferenciação genética. Isto é importante, pois é comum que variáveis ambientais sejam afetadas pelo espaço e conseqüentemente estas variáveis possam ser úteis para sugerir que a seleção natural esteja atuando para a formação de padrões.

Foram realizadas correlações, em relação às matrizes, pelo teste de Mantel simples, entre as matrizes de distância genética e geográfica e fatores abióticos, como a altitude, e os fatores químicos (alcaloides mitrafilina e isomitrafalina).

A partir dos dados binários, foram efetuadas análises através dos softwares GenAlEx v 6.5 (Genealex, PEAKALL e SMOUSE, 2006), para o cálculo da frequência alélica, análise molecular de variância (AMOVA) e análise de Coordenadas Principais (PCoA) e, assim, determinar a variação genética dentro e entre as populações, a formação dos grupos e sua fragmentação.

Onde os métodos de ordenação podem sintetizar conjuntos complexos de dados, permitindo interpretação sobre padrões no espaço e tempo.

Temos:

$$q_{\alpha\beta} = -\frac{1}{2} \left(d_{\alpha\beta}^2 - \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n d_{j\beta}^2 - \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n d_{\alpha k}^2 + \frac{1}{n^2} \sum_{k=1}^n \sum_{j=1}^n d_{jk}^2 \right)$$

N = unidades amostrais;

A e $\beta = 1$;

q e d = dados alimentados pelas matrizes de dissimilaridades.

Um método baseado em modelo desenvolvido por Pritchard et al., (2000) e implementado no software STRUCTURE, de acordo com Evanno (2005), visa delinear grupos de indivíduos com base nos seus genótipos, utilizando uma abordagem Bayesiana, que representa graficamente a diferença média entre os valores de probabilidade sucessivos de K , $L'(K) = L(K) - L(K - 1)$, esta diferença corresponde à taxa de alteração da função de probabilidade que respeita a K , denominado $L'(K)$ para cada valor de K é dado, permitindo a estimativa do número mais provável de aglomerados, que muitas vezes os valores aumentavam após determinado K . Por fim, estimou-se Δk como a média dos valores absolutos de $G''(K)$ em média mais de 20 pistas dividido pelo desvio padrão de $L(K)$, $\Delta k = m(|L''(k)|) / s[L(K)]$, que se expande para $\Delta k = m(|L(K + 1) - 2L(K) + L(K - 1)|) / s[L(K)]$.

Os dados de quantificação dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos mitrafilina e isomitrafalina entre e dentro das populações foram submetidos à análise de variância e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Coleta

Foram coletados vinte indivíduos de oito populações de cada uma das espécies alvo e a localização geográfica de *U. tomentosa* e *U. guianensis* está descrita nas Tabelas 5 e 6 e Figuras 4 e 5. Com exceção da população coletada no município de Feijó-AC, para a espécie *U. guianensis*, onde foi coletada apenas 17 indivíduos.

Tabela 5. Municípios, códigos das populações e coordenadas geográficas das coletas de *Uncaria tomentosa*.

MUNICÍPIO/ESTADO	CÓDIGO DAS POPS	N	LATITUDE	LONGITUDE	ALTITUDE(m)
TARAUACÁ (AC)	UTTA	20	-07°56'42,3"	-71°29'00,4"	206
FELJÓ (AC)	UTFJ	20	-08°17'36,0"	-70°22'26,1"	167
MAZAGÃO (AP)	UTMZ	20	-00°12'11,6"	-51°21'56,7"	15
MÂNCIO LIMA (AC)	UTML	20	-07°28'48,8"	-72°56'42,2"	175
CRUZEIRO DO SUL (AC)	UTCS	20	-07°40'12,2"	-72°38'21,1"	172
SANTANA (AP)	UTSA	20	-00°02'12,0"	-51°12'10,9"	-10
MACAPÁ (AP)	UTMC	20	+00°19'46,3"	-50°52'14,9"	09
AFUÁ (PA)	UTAF	20	-00°07'39,8"	-50°23'19,2"	28

N= n° de indivíduos coletados

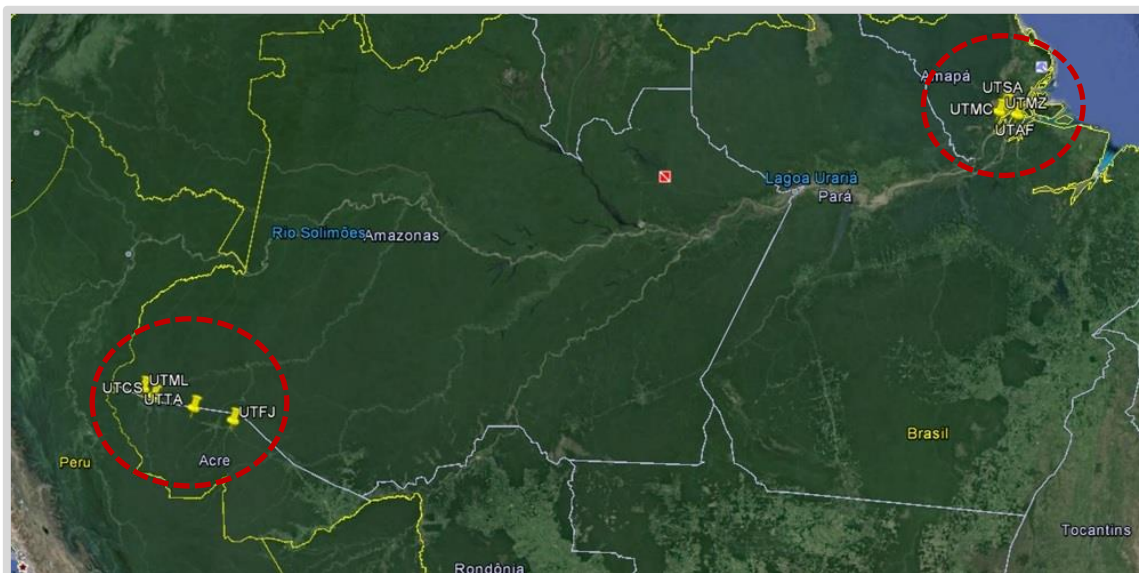


Figura 4. Locais de coleta das populações de *Uncaria tomentosa* nos estados do Acre, Amapá e Pará. (Fonte: Google Earth).

Tabela 6. Municípios, códigos das populações e coordenadas geográficas das coletas de *Uncaria guianensis*.

MUNICÍPIO/ESTADO	CÓDIGO DAS POPS	N	LATITUDE	LONGITUDE	ALTITUDE(m)
RIO BRANCO (AC)	UGRB	20	-09°54'44,2"	-67°26'46,8"	201
BOCA DO ACRE(AM)	UGBC	20	-08°47'52,0"	-67°17'21,0"	120
MAZAGÃO(AP)	UGMZ	20	+00°03'47,5"	-51°14'86,0"	12
OIAPOQUE(AP)	UGOI	20	+03°49'56,9"	-51°50'54,8"	04
CRUZEIRO DO SUL (AC)	UGCS	20	-07°36'44,1"	-72°48'05,7"	180
FELJÓ (AC)	UGFJ	17	-08°11'08,1"	-70°22'26,3"	161
XAPURI(AC)	UGXA	20	-10°36'02,5"	-68°00'32,8"	211
ASSIS BRASIL(AC)	UGAB	20	-10°48'38,7"	-69°17'48,4"	285

N= n° de indivíduos coletados

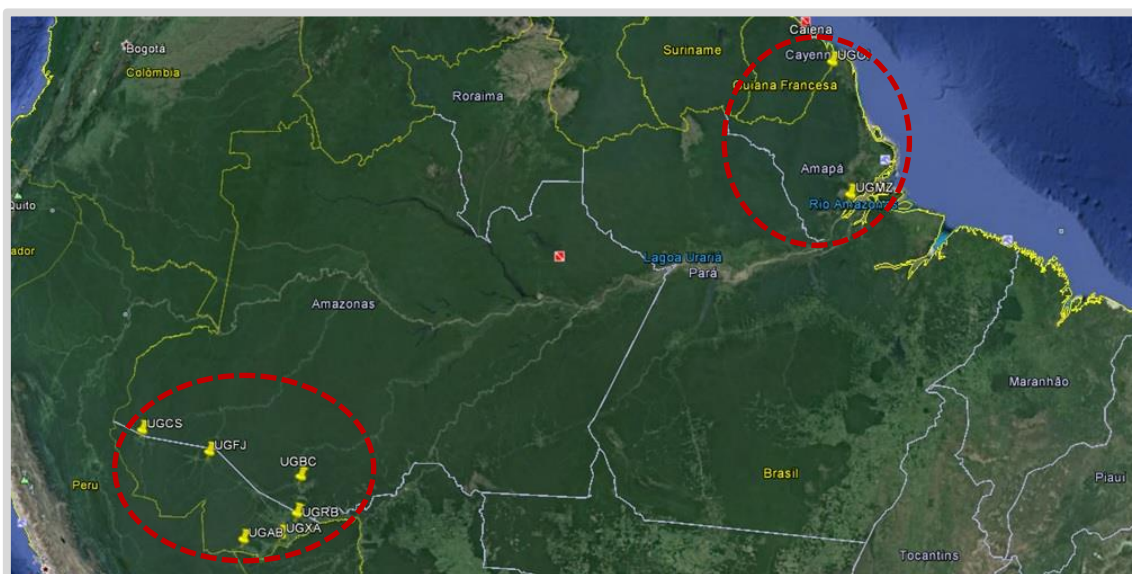


Figura 5. Locais de coleta das populações de *Uncaria guianensis* nos estados do Acre, Amapá, Amazonas e Pará. (Fonte: Google Earth).

7.2. Extração do DNA

A extração de DNA dos indivíduos das duas espécies na sua maioria foi eficiente. No entanto, foram necessárias re-extrações para a obtenção de amostra íntegra para todos os indivíduos (Figura 6).

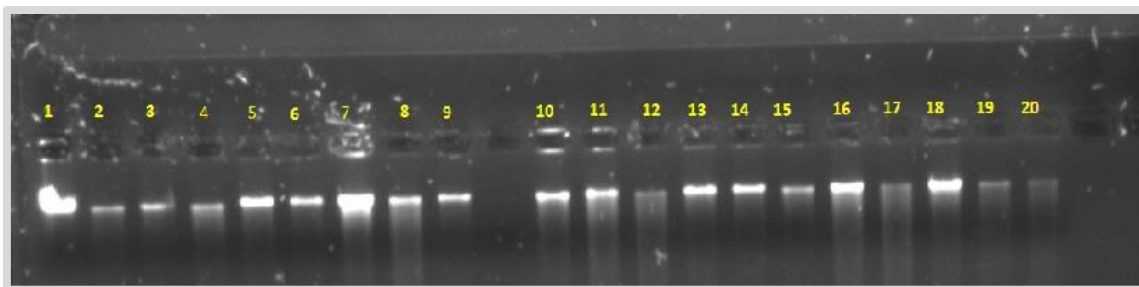


Figura 6. Extração de DNA analisada por meio de gel de agarose 1% utilizando como tampão uma solução de TBE 1X, de indivíduos da população de *Uncaria tomentosa* coletadas em Tarauacá-AC.

7.3. Análise por meio do marcador SRAP

As cinco combinações de *primers* avaliadas para *U. tomentosa* amplificaram bandas, no entanto foram selecionadas três por apresentarem maior polimorfismo e nitidez dos fragmentos, em todas as populações (Tabela 7).

Tabela 7. Combinações de *primers* selecionadas para a execução da técnica de SRAP em *Uncaria tomentosa*.

<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
me3, 5'-TGA GTC CAA ACC GG AAT-3'	em3, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GAC-3'
me1, 5'-TGA GTC CAA ACC GG ATA-3'	em6, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GCA-3'
me5, 5'-TGA GTC CAA ACC GG AAG-3'	em3, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GAC-3'

As seis combinações de *primers* avaliadas para *U. guianensis* também amplificaram bandas e foram selecionadas quatro combinações por apresentarem maior polimorfismo e nitidez dos fragmentos (Tabela 8).

Tabela 8. Combinações de *primers* selecionadas para a execução da técnica de SRAP em *Uncaria guianensis*.

<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
me1, 5'-TGA GTC CAA ACC GG ATA-3'	em3, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GAC-3'
me1, 5'-TGA GTC CAA ACC GG ATA-3'	em6, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GCA-3'
me3, 5'-TGA GTC CAA ACC GG AAT-3'	em3, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT GAC-3'
me3, 5'-TGA GTC CAA ACC GG AAT-3'	em1, 5'-GAC TGC GTA CGA ATT AAT-3'

A análise dos géis de *U. tomentosa* (Figura 7) resultou em 185 bandas (Tabela 9), das quais as combinações em1+me6 e em5+me3 apresentaram 100% de polimorfismo. O maior número de locos (80) foi obtido com a combinação em3+me3.

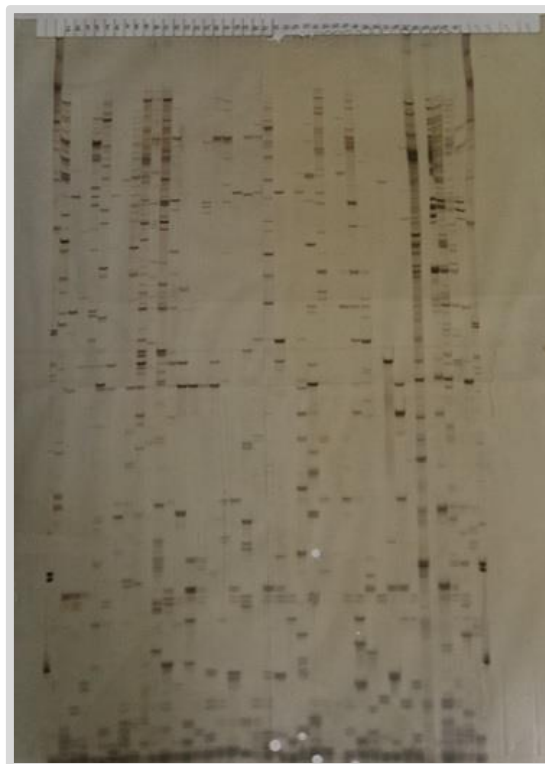


Figura 7. Gel de poliacrilamida com a primeira combinação (em3+me3) de *primers* utilizados em populações de *Uncaria tomentosa* coletado nos municípios de Tarauacá-AC (UTTA) e Feijó-AC (UTFJ). O primeiro e o último poço são os marcadores de 50 pb (PROMEGA 50 pb G452A).

Tabela 9. Número de locus e polimorfismo obtidos em cada combinação de *primers* para a espécie *Uncaria tomentosa*.

COMBINAÇÃO DE PRIMERS	Nº LOCUS	POLIMORFISMO (%)
me3+em3	80	97,5
me1+em6	50	100
me5+em3	55	100
TOTAL	185	

Para a *U. guianensis*, a análise dos géis (Figura 8) resultou em 235 bandas (Tabela 10), sendo que todas as combinações usadas apresentaram 100% de

polimorfismo, e a primeira combinação (me1+em3) apresentou o maior número de bandas (112).

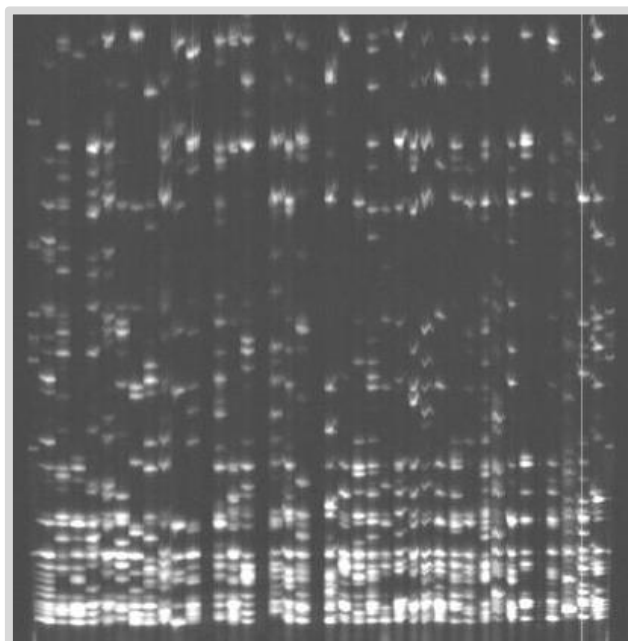


Figura 8. Gel de poliacrilamida com a primeira combinação (em1+me3) de *primers* utilizados em populações de *Uncaria guianensis* coletados nos municípios de Rio Branco-AC (UGRB) e Boca do Acre-AM (UGBC). A visualização refere-se ao canal de 700 nm. O primeiro e o último poço são os marcadores de 50 a 700 pb (PROMEGA 50 pb G452A).

Tabela 10. Número de locus e polimorfismo obtidos em cada combinação de *primers* para a espécie *Uncaria guianensis*.

COMBINAÇÃO DE <i>PRIMERS</i>	Nº LOCUS	POLIMORFISMO (%)
me1+em3	112	100
me1+em6	62	100
me3+em3	30	100
me3+em1	31	100
TOTAL	235	

A população de Mâncio Lima-AC (UTML) de *U. tomentosa* apresentou maior variabilidade (95,68%) e maiores índices nos parâmetros genéticos avaliados (N_a , N_e , H e I). Já a população de Tarauacá-AC (UTTA) foi a menos polimórfica, com 62,16% e conseqüentemente menores índices (Tabela 11).

Tabela 11. Parâmetros genéticos avaliados para a espécie *Uncaria tomentosa*. % locus polimórficos; Na: número de alelos observados; Ne: número de alelos efetivos; H: heterogeneidade; I: Índice de Shannon.

POPULAÇÕES	%LOCUS POLIMÓRFICOS	Na	Ne	H	I
TARAUACÁ(AC)	62,16	1,62	1,17	0,1204	0,2031
FEIJÓ(AC)	94,59	1,94	1,26	0,1852	0,3144
MAZAGÃO(AP)	87,03	1,87	1,44	0,2648	0,4037
MÂNCIO LIMA(AC)	95,68	1,95	1,50	0,3151	0,4818
CRUZEIRO DO SUL(AC)	72,97	1,72	1,26	0,1726	0,2786
SANTANA(AP)	83,24	1,83	1,46	0,2766	0,4176
MACAPÁ(AP)	81,08	1,81	1,28	0,1845	0,2975
AFUÁ(PA)	87,57	1,87	1,30	0,2035	0,3303
TOTAL	98,92	1,98	1,45	0,2836	0,4425

Esse fato pode ser explicado porque os indivíduos de Mâncio Lima-AC estão no presente localizados em uma área de mata mais fechada e mais conservada, as plantas são mais velhas (caules mais grossos), portanto sem muita interferência antrópica. Nesse tipo de vegetação, onde a entrada de luz é mais restrita, essas plantas apresentam maior dificuldade de germinação e maior desafio para se estabelecerem no ambiente, visto que a competição por luz para a realização dos processos fotossintéticos é maior. Sendo assim, aqueles indivíduos que conseguiram se estabelecer e se adaptar à presença de pouca luz, podem ser considerados indivíduos com maior variabilidade e diversidade.

Já a população de Tarauacá-AC estava localizada em ambiente mais influenciado pelo homem, onde havia uma vila de moradores, com isso as plantas estavam em uma área mais susceptível às interferências como, desmatamento para plantio de plantas cultivadas. As plantas nesse município se encontravam na borda da mata (onde provavelmente em algum momento existiu uma mata) e eram plantas mais jovens, de caules mais finos, sendo possivelmente descendentes de indivíduos remanescentes que restaram quando houve o desmatamento da área (Figura 9). Como essas plantas estavam em uma área onde já havia ocorrido o desmatamento, a intensidade luminosa sobre as mesmas era intensa e irrestrita, conseqüentemente essas plantas passaram por poucos desafios para germinar e para se estabelecerem no ambiente, apresentando, portanto menos variabilidade e diversidade, quando comparada às outras, naturais de Mâncio Lima.

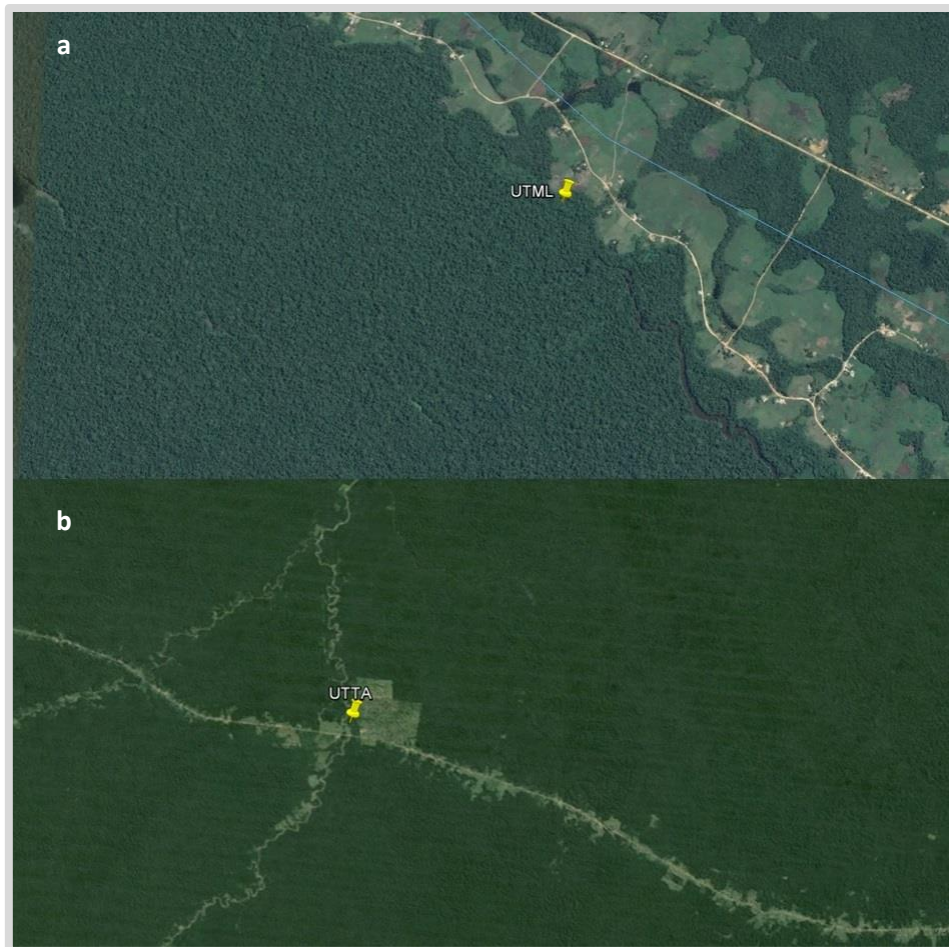


Figura 9. Imagem das populações de *Uncaria tomentosa* coletadas nos municípios de Mâncio Lima-AC (a) e Tarauacá-AC (b). **FONTE:** Google Earth.

Para a *U. guianensis* também foi realizada a avaliação dos parâmetros genéticos (Tabela 12) e a população de Mazagão-AP (UGMZ), coletada as margens do igarapé, em uma área não antropizada, foi a que apresentou a maior porcentagem de locus polimórficos, ou seja, a maior variabilidade genética, com 90,21%. Em contrapartida, a população com a menor variabilidade genética foi a coletada no município de Assis Brasil-AC (UGAB). A coleta dessa população foi realizada às margens de uma rodovia (BR 317), com isso está mais susceptível às mudanças que ocorrem no ambiente (Figura 10).

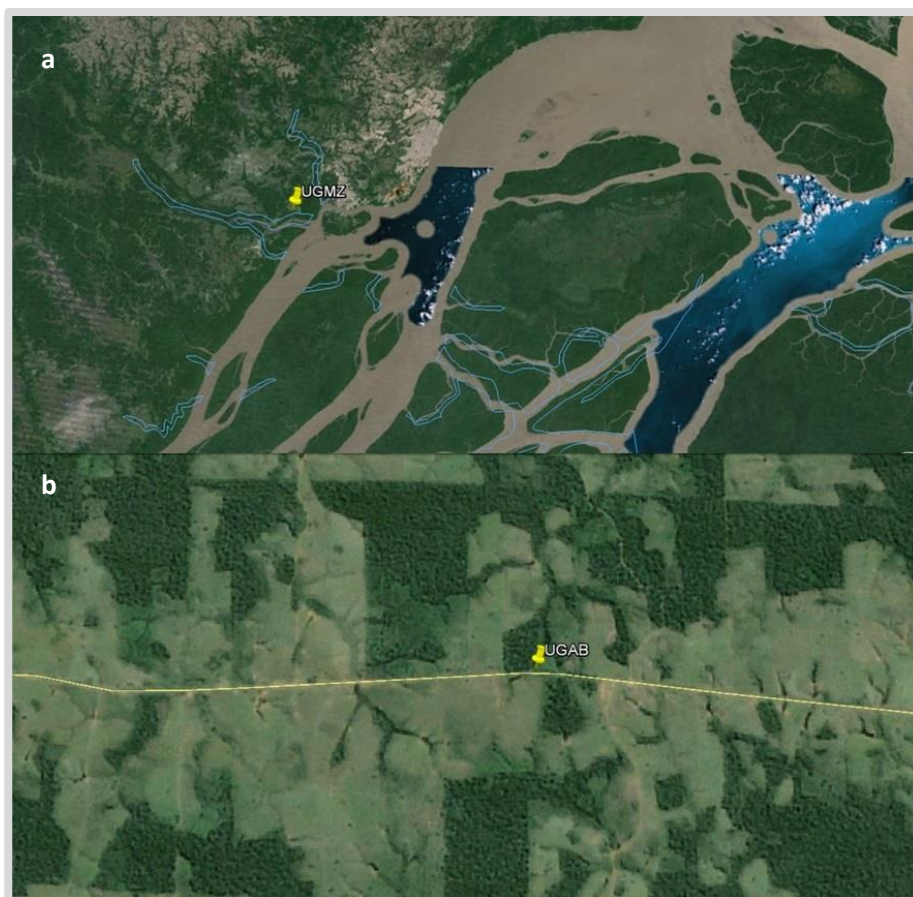


Figura 10. Imagem das populações de *Uncaria guianensis* coletadas nos municípios de Mazagão-AP (a) e Assis Brasil-AC (b). **FONTE:** Google Earth.

Tabela 12. Parâmetros genéticos avaliados para a espécie *Uncaria guianensis*. Porcentagem de locus polimórficos; Na: número de alelos observados; Ne: número de alelos efetivos; H: Índice de Nei; I: Índice de Shannon.

POPULAÇÃO	%LOCUS POLIMÓRFICOS	Na	Ne	H	I
RIO BRANCO (AC)	84,68	1,84	1,28	0,1875	0,3058
BOCA DO ACRE(AM)	76,60	1,76	1,23	0,1582	0,2617
MAZAGÃO(AP)	90,21	1,90	1,45	0,2846	0,4376
OIAPOQUE(AP)	85,96	1,85	1,38	0,2414	0,3776
CRUZEIRO DO SUL (AC)	73,62	1,73	1,35	0,2103	0,3237
FEIJÓ (AC)	67,23	1,67	1,36	0,2080	0,3138
XAPURI(AC)	56,17	1,56	1,23	0,1416	0,2214
ASSIS BRASIL(AC)	39,57	1,39	1,16	0,1000	0,1596
TOTAL	98,30	1,98	1,35	0,2289	0,3686

Elevado polimorfismo também foi encontrado em diversos estudos utilizando o marcador molecular SRAP, como em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (GANGA et al., 2004), *Euterpe edulis* Mart. (CARDOSO et al., 2000), *Butia capitata*

(BUTTOW et al., 2010), *Salvia miltiorrhiza* (PENG et al., 2014), *Pleurotus pulmonarius* (YIN et al., 2014), *Phaseolus vulgaris* L. (CEYLAN et al., 2014) e *Cynodon arcuatus* (HUANG et al., 2013).

As populações amostradas de *U. tomentosa* tiveram suas distâncias genética e geográfica calculadas (Tabela 13) através do teste de Mantel e não houve correlação entre esses parâmetros, o que sugere que essas populações naturais estão estruturadas em modelo de ilhas. Este é um modelo de fluxo gênico que a imigração ocorre ao acaso entre um grupo de pequenas populações (FUTUYMA, 1997). Assim nessas populações já há início de fixação dos alelos, sendo necessários, trabalhos futuros de conservação dessa espécie, como por exemplo, a criação de banco de germoplasma *in vitro* e *in situ*. Segundo Evanno et al. (2005) a estrutura genética de populações nem sempre reflete a proximidade geográfica dos indivíduos, o que corrobora com os resultados obtidos nesse trabalho para a espécie *U. tomentosa*.

Tabela 13. Distância geográfica (Km) e genética da espécie *Uncaria tomentosa*. Acima da diagonal está representada a distância geográfica e abaixo da diagonal a distância genética. TA: Tarauacá; FJ: Feijó; MZ: Mazagão; ML: Mâncio Lima; CS: Cruzeiro do Sul; SA: Santana; MC: Macapá e AF: Afuá.

	TA	FJ	MZ	ML	CS	AS	MC	AF
TA	*	129	2394	170	130	2414	2466	2498
FJ	0,0063	*	2291	295	255	2313	2360	2393
MZ	0,0543	0,0445	*	2530	2502	23,27	80,77	108
ML	0,1041	0,0833	0,0485	*	39,44	2551	2594	2634
CS	0,167	0,1423	0,0879	0,0479	*	2525	2569	2595
AS	0,252	0,2133	0,01186	0,0862	0,0654	*	12,09	91,75
MC	0,0286	0,0321	0,0756	0,1147	0,1969	0,2664	*	75,07
AF	0,1441	0,1208	0,0865	0,8497	0,0357	0,0979	0,166	*

No entanto, para *U. guianensis* o teste de Mantel apontou que há fraca correlação positiva entre a distância genética e distância geográfica ($r = 0,33$). Como a correlação é considerada fraca e não significativa, a espécie já está se aproximando da estruturação em modelo de ilhas. Na Tabela 14 pode ser observado as distâncias genética e geográfica para a espécie.

Tabela 14. Distância geográfica (Km) e genética da espécie *Uncaria guianensis*. Acima da diagonal está representada a distância geográfica e abaixo da diagonal a distância genética. RB: Rio Branco; BC: Boca do Acre; MZ: Mazagão; OI: Oiapoque; CS: Cruzeiro do Sul; FJ: Feijó; XA: Xapuri; AB: Assis Brasil.

	RB	BC	MZ	OI	CS	FJ	XA	AB
RB	*	111	2088	2274	644	359	112	242
BC	0,0191	*	2018	2183	623	349	217	316
MZ	0,0493	0,0460	*	398	2534	2296	2186	2341
OI	0,0784	0,0558	0,0375	*	2624	2409	2353	2487
CS	0,0519	0,0475	0,0478	0,0455	*	279	622	525
FJ	0,0441	0,0452	0,0514	0,0519	0,0123	*	378	321
XA	0,0693	0,0640	0,0760	0,0713	0,0354	0,0460	*	146
AB	0,0888	0,0732	0,0818	0,0730	0,0442	0,0636	0,0187	*

A distribuição geográfica e a história evolutiva desempenham papel importante na distribuição da variação genética entre e dentro das populações (HAMRICK et al., 1992) e o fluxo gênico bem como o sistema reprodutivo são os fatores que mais contribuem para a estrutura genética de populações de plantas (CAVALLI e WINGE, 2003; QUEROL, 1993).

O modelo de ilhas é considerado o modelo convencional de genética de populações de troca de genes entre as populações. Assume o equilíbrio entre migração e deriva genética entre todas as populações e há igual troca de genes entre populações. Este modelo assume que todas as populações são iguais fontes de migrantes e produz estimativas que não refletem a variação contemporânea na troca de genes entre populações ou mudanças atuais no processo dispersivo (ZUCCHI, 2002).

Esse é um modelo convencional de genética de populações de troca de genes e assume o equilíbrio entre migração e deriva genética entre todas as populações. Há igual troca de genes entre populações, e parte da premissa de que todas as populações são iguais fontes de migrantes (ZUCCHI, 2002). No entanto, quando na área onde os indivíduos se encontram é colocado alguma barreira, geralmente pela ação humana (construção de estradas, cidades, entre outros) a troca de alelos é afetada, consequentemente o fluxo gênico diminui e, com o passar do tempo, os indivíduos que realizavam cruzamento ao acaso não conseguem mais realizar essa troca de alelos e com isso há a o início da fixação de alelos. Assim, essa população se torna vulnerável, pelo alto grau de parentesco entre os indivíduos, aumentando o risco de extinção da espécie.

Em *U. tomentosa* foi constatada maior variabilidade genética dentro (75%) do que entre (25%) as populações (Tabela 15), o que mostra que a conservação será mais eficiente, se realizada ao coletar um maior número de indivíduo dentro das populações em um menor número de populações.

Tabela 15. Resumo da AMOVA (Análise Molecular de Variância): Porcentagem da variação total observada entre e dentro das populações de *Uncaria tomentosa*.

 FONTE	 GL	 QM	 COMPONENTE DE VARIÂNCIA	 %	 P	 Fst
Entre pops	7	197,646	8,571	25	>0,001	0,246
Dentro pops	152	26,226	26,226	75		
Total	159		34,797	100		

GL = grau de liberdade; QM = Quadrado médio; Fst = Índice de Fixação de alelos, pops = populações.

Em *U. guianensis* a variabilidade genética dentro da população (81%) também foi maior que entre elas (19%) (Tabela 16), sendo assim a conservação deverá ser feita da mesma forma que a *U. tomentosa*.

Tabela 16. Resumo da AMOVA (Análise Molecular de Variância): Porcentagem da variação total observada entre e dentro das populações de *Uncaria guianensis*.

 FONTE	 GL	 QM	 COMPONENTE DE VARIÂNCIA	 %	 P	 Fst
Entre pops	7	143,067	5,980	19	>0,001	0,188
Dentro pops	149	25,747	25,747	81		
Total	156		31,728	100		

GL = grau de liberdade; QM = Quadrado médio; Fst = Índice de Fixação de alelos, pops = populações.

A variabilidade genética dentro das populações reflete em maior flexibilidade de resposta às situações temporárias de estresses (MARCON, 1988). De acordo com Loveless e Hamrick (1984) as espécies que apresentam mecanismos eficientes de dispersão de pólen e sementes apresentam maior variabilidade genética dentro das populações do que entre elas. Considerando que as duas espécies de *Uncaria* avaliadas nesse trabalho apresentam dois mecanismos de dispersão, ou seja, pelo vento e por insetos polinizadores (PEREIRA, 2006), pode-se afirmar que os resultados obtidos estejam, pelo menos em parte, relacionados a isso.

A alta variação intrapopulacional é esperada em espécies alógamas e o fluxo gênico é inversamente proporcional à divergência dentro das populações, ou seja, quanto maior o fluxo gênico, menor será essa divergência (LOVELESS e HAMDRICK, 1984). No entanto, ainda não foi encontrado na literatura informações sobre a forma de cruzamento e fecundação da *U. tomentosa* e *U. guianensis*, portanto não pode se inferir que as espécies sejam alógamas, mesmo tendo apresentado uma maior variação intrapopulacional.

O fluxo gênico está diretamente relacionado com o modo de reprodução e dispersão da espécie, assim, em relação às espécies em estudo, para seu estabelecimento, a dispersão é realizada principalmente por agentes polinizadores, apesar de o vento, também ter influência (PEREIRA, 2006).

Segundo Ennos (1994) o sucesso do fluxo gênico entre populações de plantas depende do êxito dos agentes dispersores de pólen e sementes, e junto à diminuição de áreas florestadas, a fragmentação pode interferir na dinâmica dessa dispersão. A interrupção por áreas não florestadas pode acarretar da diminuição da fauna local, dificultando assim, a curva de dispersão de sementes próxima à planta materna, o que diminui o fluxo gênico entre as populações e, ainda, dificulta a dispersão de pólen devido à grande distância entre os fragmentos (JORDANO et al., 2006).

Nesse sentido, o baixo fluxo gênico encontrado nas populações de *U. tomentosa* ($Nm=1,57$) pode ser resultado da dificuldade de dispersão, devido à localização de cada população. *U. guianensis* apresentou um maior fluxo gênico ($Nm=2,57$) em relação à outra espécie, no entanto, esses valores ainda são considerados baixos para população natural. Smouse et al. (2001) afirmam que quanto maior a estruturação das populações, menor será a dispersão de pólen e conseqüentemente, menor o fluxo gênico.

Como *U. tomentosa* mostrou fluxo gênico menor que *U. guianensis*, ela provavelmente se encontra em condições mais críticas de conservação, visto que possui dificuldades de troca gênica, e portanto ocorre maior fixação de alelos, além disso, também ocorre em menor concentração do que a *U. guianensis*, sendo então mais escassa na natureza. Sendo assim, os indivíduos de *U. tomentosa* possuem maior grau de parentesco entre si, pois em populações pequenas há maior chance de cruzamento entre indivíduos aparentados, quando o fluxo gênico não está ocorrendo normalmente.

A existência de fluxo gênico entre populações é de grande importância para a sustentabilidade da espécie. Com a ocorrência desse fluxo, novos alelos podem ser introduzidos dentro da população e a diferença das frequências alélicas entre as populações locais, dessa forma, se tornará menor. Como consequência a variabilidade genética entre as populações locais tende a diminuir e a variabilidade genética dentro da população aumentará (TEMPLETON et al., 2011). O fluxo gênico, dessa forma, atua como um fator evolutivo responsável pela homogeneização das populações, restringindo os efeitos da deriva genética e seleção (SEOANE et al., 2000).

Oliveira (2015) encontrou fluxo gênico de 1,18 em *Croton antisiphiliticus*, sugerindo a dificuldade de dispersão da semente. Em estudo com *Erythrina mulungu*, Benincasa (2015) verificou fluxo gênico de 1,66, também considerado baixo. Em populações naturais de *Myrciaria dubia* foi encontrado um valor de 2,90 de fluxo gênico (TEIXEIRA et al., 2004), em *Eugenia dysenterica* DC. o fluxo gênico foi de 0,675 (ZUCCHI, 2002) e em várias espécies nativas e cultivadas do gênero *Zanthoxylum* foi encontrado valores de fluxo gênico que variavam de 1,432 a 7,862 (FENG et al., 2015).

Em contrapartida, em relação ao Índice de Fixação de alelos, o valor encontrado para *U. tomentosa* ($F_{st} = 0,246$) é considerado moderado, próximo ao limite proposto por WRIGHT (1978) que é de 0,25, o que mostra que há uma grande estruturação populacional. Quanto a espécie *U. guianensis* foi constatado que o Índice de Fixação de alelos é mais baixo (também moderado) ($F_{st} = 0,188$).

Quanto maior o valor de F_{st} , menor é a capacidade de dispersão da espécie, ou seja, há dificuldade de troca de alelos entre elas, o que aumenta a probabilidade de estas populações tornarem-se endogâmicas (FRANKHAM et al., 2007). Esses autores ainda afirmam que em pequenas populações a endogamia e a perda de diversidade genética são inevitáveis, o que reduz a taxa de reprodução e sobrevivência em curto espaço de tempo. Além disso, populações endogâmicas tem menor capacidade de adaptação às mudanças climáticas, o que aumenta o risco de extinção (ELLSTRAND et al., 1993; SILVA et al., 2013).

Com isso, os baixos valores de fluxo gênico e índice de fixação de alelos encontrados nas espécies estudadas, refletem o ambiente dos locais onde as plantas foram coletadas, que apesar de se encontrarem em áreas que apresentam grande diversidade vegetal, são fortemente antropizadas e conseqüentemente já fragmentadas, resultando assim em populações estruturadas em modelo de Ilha.

Esses resultados corroboram com os dados obtidos com a espécie *Croton antisiphiliticus* ($F_{st} = 0,3803$) (OLIVEIRA, 2015); *Palicourea rigida* ($F_{st} = 0,3601$) (SILVA et al., 2013); *Erythrina mulungu* ($F_{st} = 0,23$) (BENINCASA, 2015); *Eugenia desynerica* DC. ($F_{st} = 0,2703$) (ZUCCHI, 2002); várias espécies nativas e cultivadas do gênero *Zanthoxylum* (F_{st} variando de 0,259 a 0,60) (FENG et al., 2015).

Pelas análises do dendograma (Figura 11), análise de coordenadas principais (PCoA) (Figura 12) e STRUCTURE de *U. tomentosa* (Figura 13) observa-se a tendência de formação de dois grupos gênicos entre as populações. O grupo 1 foi formado pelas populações de Tarauacá-AC (UTTA), Feijó-AC (UTFJ) e Macapá-AP (UTMC); e o grupo 2 formado pelas populações de Mazagão-AP (UTMZ); Mâncio Lima-AC (UTML), Cruzeiro do Sul-AC (UTCS), Santana-AP (UTSA) e Afuá-PA (UTAF).

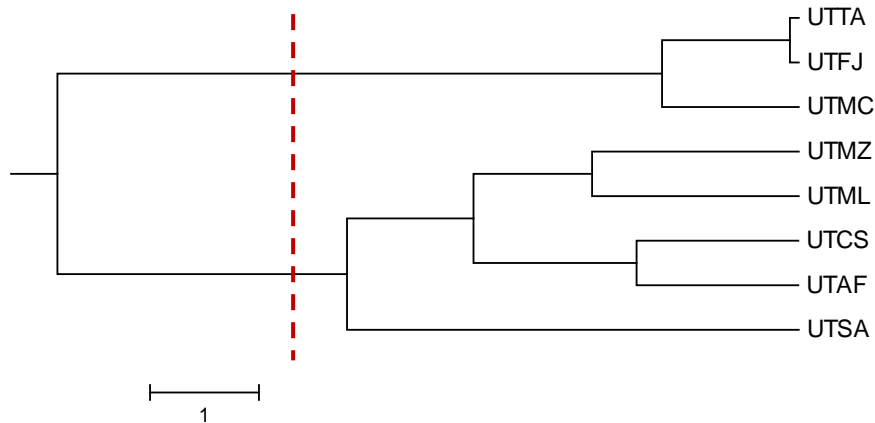


Figura 11. Dendograma das populações de *Uncaria tomentosa* amostradas e o agrupamento destas em dois grupos.

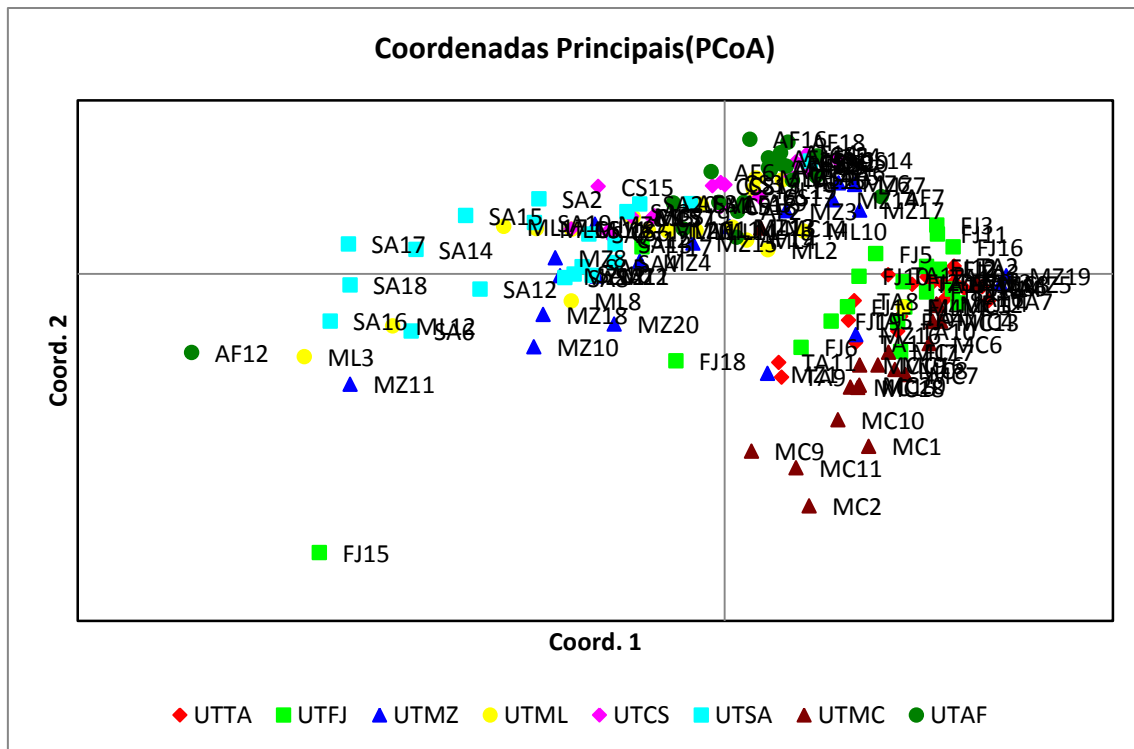


Figura 12. Análise de dispersão em coordenadas principais (PCoA) obtido a partir da matriz de similaridade de Jaccard, estimada com marcadores moleculares SRAP entre indivíduos de oito populações naturais de *Uncaria tomentosa*. UTTA: Tarauacá-AC; UTFJ: Feijó-AC; UTMZ: Mazagão-AP; UTML: Mâncio Lima-AC; UTCS: Cruzeiro do Sul-AC; UTSA: Santana-AP; UTMC: Macapá-AP; UTAF: Afuá-PA.

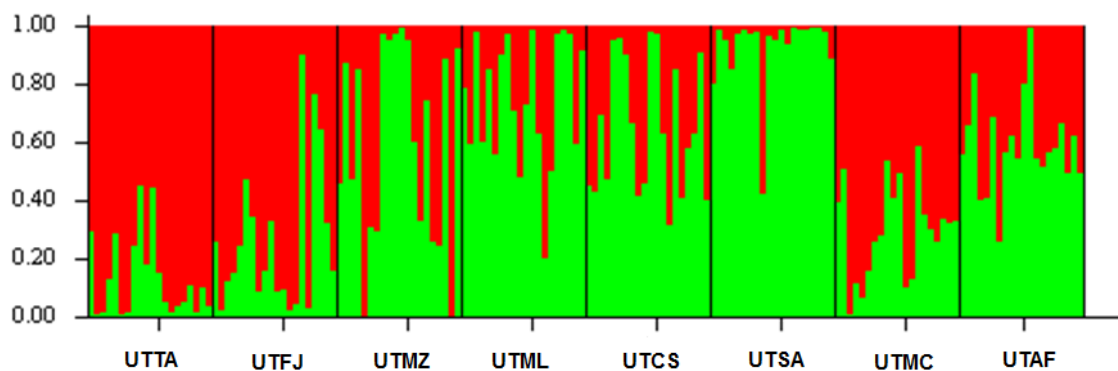


Figura 13. Agrupamento das populações da espécie *Uncaria tomentosa* através do programa STRUCTURE. Grupo 1 (Vermelho): Tarauacá, Feijó e Macapá; Grupo 2 (verde): Mazagão, Mâncio Lima, Cruzeiro do Sul, Santana e Afuá. UTTA: Tarauacá-AC; UTFJ: Feijó-AC; UTMZ: Mazagão-AP; UTML: Mâncio Lima-AC; UTCS: Cruzeiro do Sul-AC; UTSA: Santana-AP; UTMZ: Macapá-AP; UTAF: Afuá-PA.

Com os dados gerados através do Software STRUCTURE pode-se obter a proporção de cada grupo gênico originado para cada espécie em estudo. Através da Figura 16 observa-se a proporção dos dois grupos gênicos formados pelas populações de *U. tomentosa*. Para cada população a proporção de um grupo é variável, e destaca-se as populações de Tarauacá-AC (UTTA) com a maior proporção do grupo gênico de coloração verde (0,885%), em contrapartida a população de Santana-AP (UTSA) é o oposto, com a maior proporção do grupo gênico de coloração vermelha (0,933%). Com isso, podemos inferir que são duas populações mais divergentes entre si, com características bem distintas uma da outra.

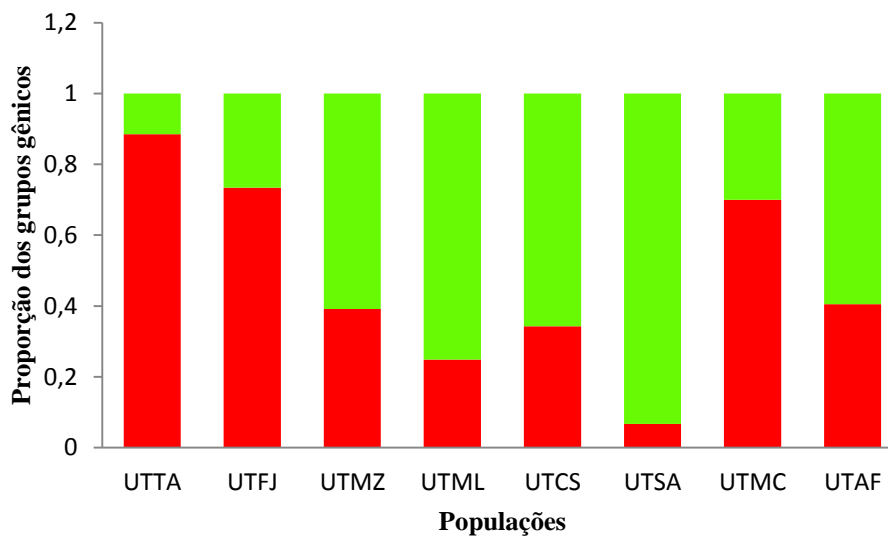


Figura 14. Proporção dos grupos gênicos de *Uncaria tomentosa*. UTTA: Tarauacá-AC; UTFJ: Feijó-AC; UTMZ: Mazagão-AP; UTML: Mâncio Lima-AC; UTCS: Cruzeiro do Sul-AC; UTSA: Santana-AP; UTMC: Macapá-AP; UTAF: Afuá-PA.

Em *U. guianensis*, o dendograma (Figura 15), a análise de coordenadas principais (PCoA) (Figura 16) e o STRUCTURE (Figura 17) mostram a formação de três grupos gênicos. Grupo gênico 1: Rio Branco-AC (UGRB) e Boca do Acre-AM (UGBC); grupo gênico 2: Mazagão-AP (UGMZ) e Oiapoque-AP (UGOI) e grupo gênico 3: Assis Brasil-AC (UGAB), Cruzeiro do Sul-AC (UGCS), Feijó-AC (UGFJ) e Xapuri-AC (UGXA).

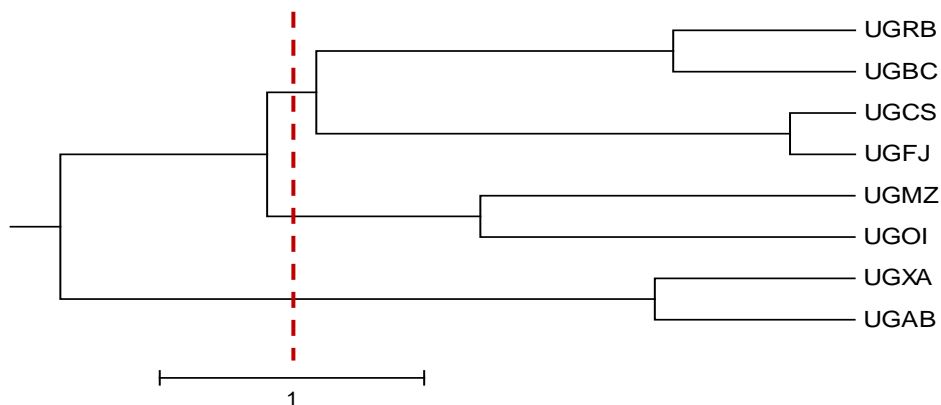


Figura 15. Dendrograma demonstrando as populações de *Uncaria guianensis* amostradas e o agrupamento destas em três grupos.

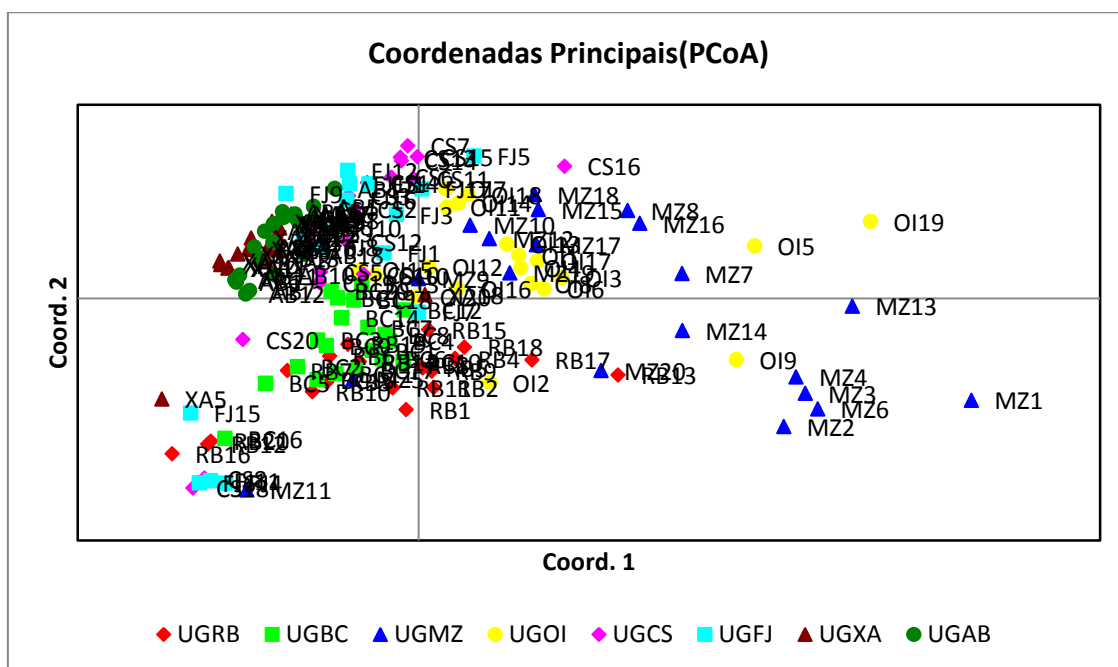


Figura 16. Análise de dispersão em coordenadas principais (PCoA) obtido a partir da matriz de similaridade de Jaccard, estimada com marcadores moleculares SRAP entre indivíduos de oito populações naturais de *Uncaria guianensis*. UGRB: Rio Branco-AC; UGBC: Boca do Acre-AM; UGMZ: Mazagão-AP; UGOI: Oiapoque-AP; UGCS: Cruzeiro do Sul-AC; UGFJ: Feijó-AC; UGXA: Xapuri-AC; UGAB: Assis Brasil-AC.

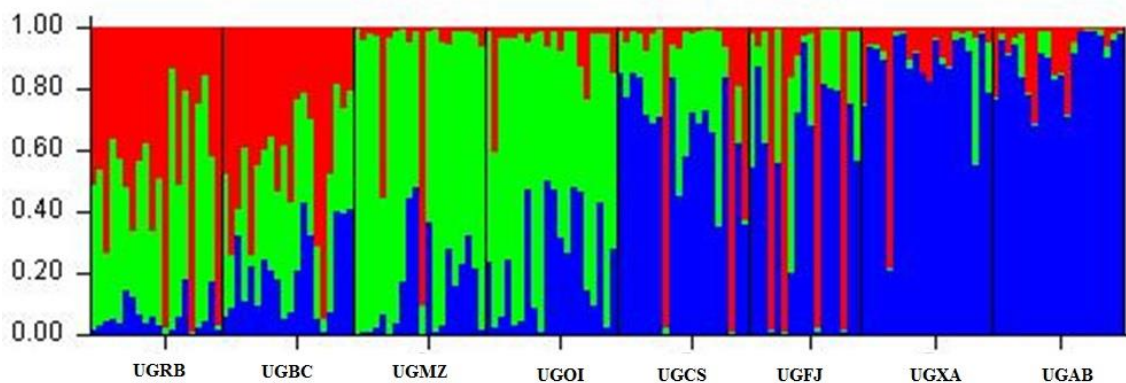


Figura 17. Agrupamento das populações da espécie *Uncaria guianensis* através da análise em coordenadas principais. Grupo 1 (Vermelho): Rio Branco e Boca do Acre; Grupo 2 (verde): Mazagão e Oiapoque; Grupo 3 (Azul): Cruzeiro do Sul, Feijó, Xapuri e Assis Brasil. UGRB: Rio Branco-AC; UGBC: Boca do Acre-AM; UGMZ: Mazagão-AP; UGOI: Oiapoque-AP; UGCS: Cruzeiro do Sul-AC; UGFJ: Feijó-AC; UGXA: Xapuri-AC; UGAB: Assis Brasil-AC.

A tendência de agrupamento de indivíduos que não são da mesma população mostra a presença de variabilidade entre e dentro das populações. De acordo com Linhart et al. (1981), a diferenciação genética dentro de uma população ou mesmo entre populações distintas pode ocorrer a distâncias relativamente pequenas, e a ocorrência desta diferenciação significa que a variabilidade genética é estruturada no espaço.

Os resultados gerados pelo programa STRUCTURE distribuíram as oito populações amostradas de *U. tomentosa* em dois grupos gênicos, sendo $K = 2$ (Figura 13) e de *U. guianensis* em três grupos gênicos ($K = 3$) (Figura 17). A mesma cor para populações diferentes significa que pertencem ao mesmo grupo genético. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo. Essas figuras demonstram a tendência de formação de subpopulações, visto que em todas as populações o genoma dos indivíduos está distribuído pelos dois grupos gênicos, evidenciando a fragmentação das espécies.

Um das consequências da fragmentação pode ser a restrição de indivíduos de uma mesma espécie a pequenas áreas, isolando-as parcial ou totalmente das outras populações. Do ponto de vista genético, a fragmentação pode alterar o fluxo gênico entre as populações, de maneira que elas se tornem mais

susceptíveis aos processos de endogamia e deriva genética, o que significa ocorrer um afastamento das frequências de seus alelos comparados aos da população original (KAGEYAMA et al., 1998).

A Figura 18 mostra a proporção dos três grupos gênicos de *U. guianensis*. Essa espécie mostra situação pouco diferente de *U. tomentosa*, visto que através da maior quantidade de grupos formados, pode-se inferir maior fragmentação da espécie. No entanto, essa fragmentação pode ser devido ao fato de as populações de *U. guianensis* coletadas estarem presentes em área mais degradadas, ou seja, com maior interferência antrópica do que as populações de *U. tomentosa*. As populações de Xapuri-AC (UGXA) e Assis Brasil-AC (UGAB) possuem grande proporção do grupo gênico de coloração verde (0,852% e 0,89%, respectivamente) em comparação com as demais, onde possuem distribuição mais homogênea dos três grupos formados.

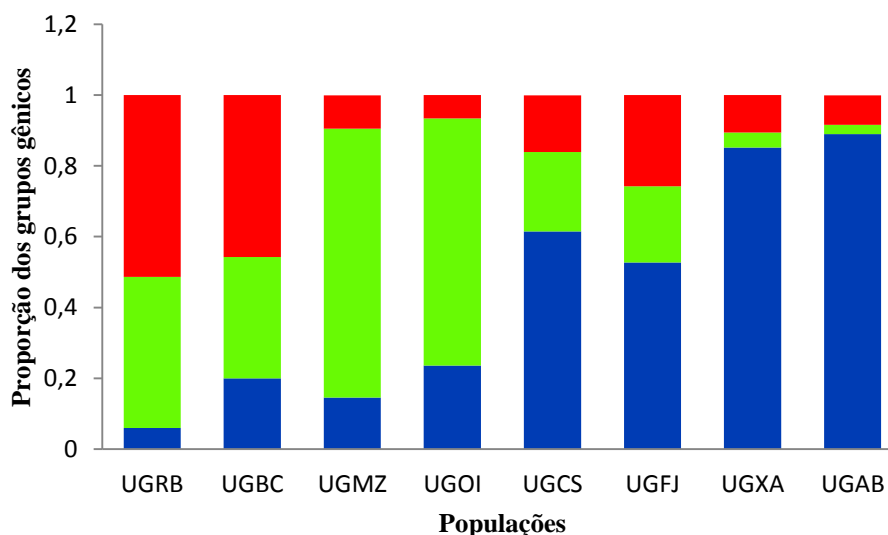


Figura 18. Proporção do grupo gênico das populações de *Uncaria guianensis*. UGRB: Rio Branco-AC; UGBC: Boca do Acre-AM; UGMZ: Mazagão-AP; UGOI: Oiapoque-AP; UGCS: Cruzeiro do Sul-AC; UGFJ: Feijó-AC; UGXA: Xapuri-AC; UGAB: Assis Brasil-AC.

Através da análise dos dendogramas gerados (Figura 19), utilizando os dados de quantificação de mitrafilina e isomitrafilina de *U. tomentosa*, pode-se observar a formação de dois grandes grupos diferentes para ambos os alcaloides, mostrando que as populações de Santana-AP (6) e Mâncio Lima-AC (4) são mais próximas entre si em relação à produção de mitrafilina. Para o alcaloide

isomitrafalina, as populações que mais se assemelham em termos de produção foram as de Afuá-AP (8) e Mazagão-AP (3).

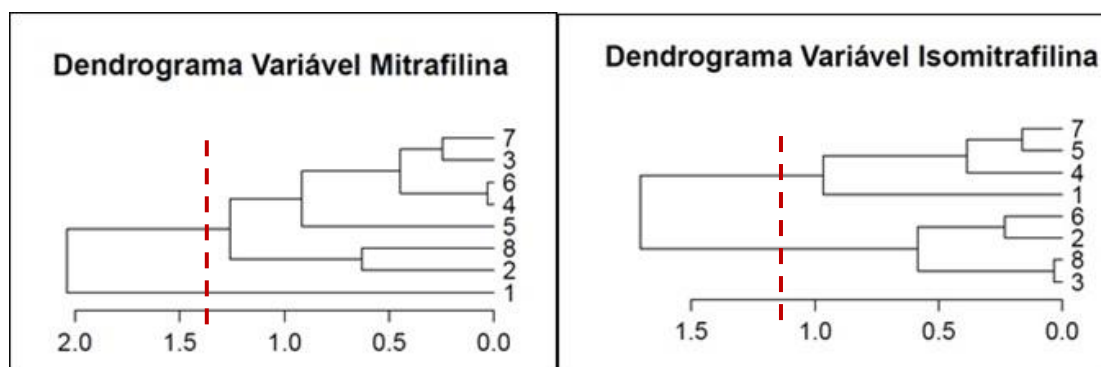


Figura 19. Dendrogramas obtidos para a produção dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos em *Uncaria tomentosa*. 1=Tarauacá-AC, 2=Feijó-AC, 3=Mazagão-AP, 4=Mâncio Lima-AC, 5=Cruzeiro do Sul-AC, 6= Santana-AP, 7=Macapá-AP, 8= Afuá-AP.

Em relação ao dendrograma (Figura 20) realizado utilizando os dados dos alcaloides analisados da *U. guianensis*, pode-se verificar também a presença de dois grande grupos que se assemelham. As populações coletadas em Feijó-AC (6) e Rio Branco-AC (1) são as mais semelhantes em relação à produção do alcaloide mitrafalina, já as populações coletadas nos municípios de Feijó-AC (6) e Cruzeiro do Sul-AC (5) são mais próximas em relação à isomitrafalina.

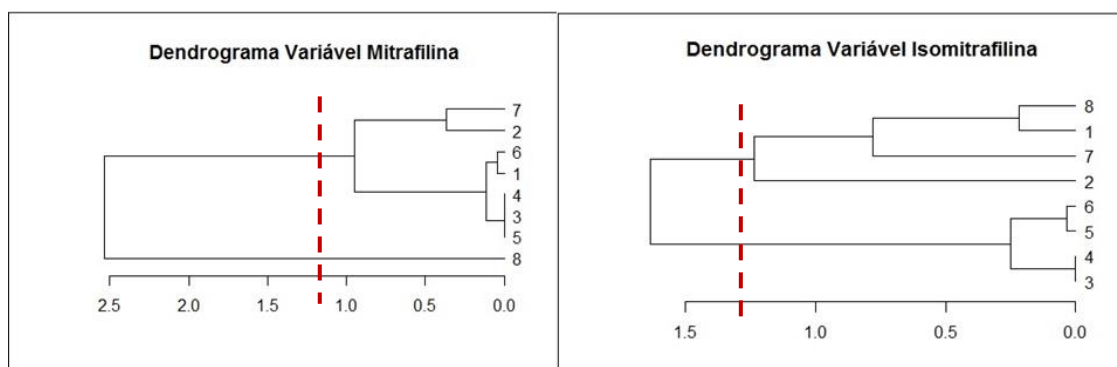


Figura 20. Dendrogramas obtidos para o acúmulo de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (mitrafalina e isomitrafalina) em *Uncaria guianensis*. 1= Rio Branco-AC, 2=Boca do Acre-AM, 3=Oiapoque-AP, 4=Mazagão-AP, 5= Cruzeiro do Sul-AC , 6= Feijó-AC , 7=Xapuri-AC, 8=Assis Brasil-AC .

O marcador molecular SRAP se mostrou simples, informativo, reprodutível e apropriado para analisar a relação genética entre as populações das

espécies de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, o que também pode ser visto em diversos outros estudos usando o mesmo marcador molecular. Em um estudo de diversidade genética de *Dyospiros* L., Jing et al. (2013) mostraram que a técnica SRAP foi eficiente para analisar a relação entre um cultivar chinesa de caqui e outras cultivares, além disso, o SRAP foi mais informativo do que o marcador ISSR (LIU et al., 2013), SSR (CEYLAN et al., 2014) e RAPD (YIN et al., 2014).

Todos os índices encontrados neste trabalho podem sugerir que as populações das duas espécies têm origem em comum, e que foram sofrendo processos de seleção, deriva, isolamento geográfico e mutações que ocasionaram as diferenças entre elas, estruturando-as em subpopulações.

7.4. Extração e quantificação dos alcaloides mitrafilina e isomitrafilina

Indivíduos de *U. tomentosa* apresentaram concentrações dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos (AOP), mitrafilina e isomitrafilina, bem variáveis dentro das populações (Tabela 17). A Figura 21 mostra o cromatograma do indivíduo 16 da população de Cruzeiro do Sul (AC), indivíduo este que obteve a maior concentração do alcaloide mitrafilina em comparação com todos os outros do estudo.

A população coletada no município de Tarauacá-AC (Tabela 18) se destacou por apresentar indivíduos com as maiores médias de mitrafilina e isomitrafilina. Na população de Cruzeiro do Sul foi encontrado um indivíduo que apresentou a maior concentração de mitrafilina (32,94 mg.g⁻¹.PS) e isomitrafilina (7,37 mg.g⁻¹.PS), quando comparado aos demais indivíduos coletados em todos os municípios. Observou-se que 50% dos indivíduos da população de Afuá-PA não apresentaram mitrafilina em concentração quantificável, assim essa população foi a que teve a menor concentração desse composto, quando comparada às outras populações.

As variações quantitativas e qualitativas nos metabólitos secundários é afetada pelos fatores genéticos e ambientais e, a interação desses fatores geram diversidade biológica que podem originar os chamados quimiotipos (D'ANDREA et al., 1995; HU et al., 2007; ZHANG et al., 2011).

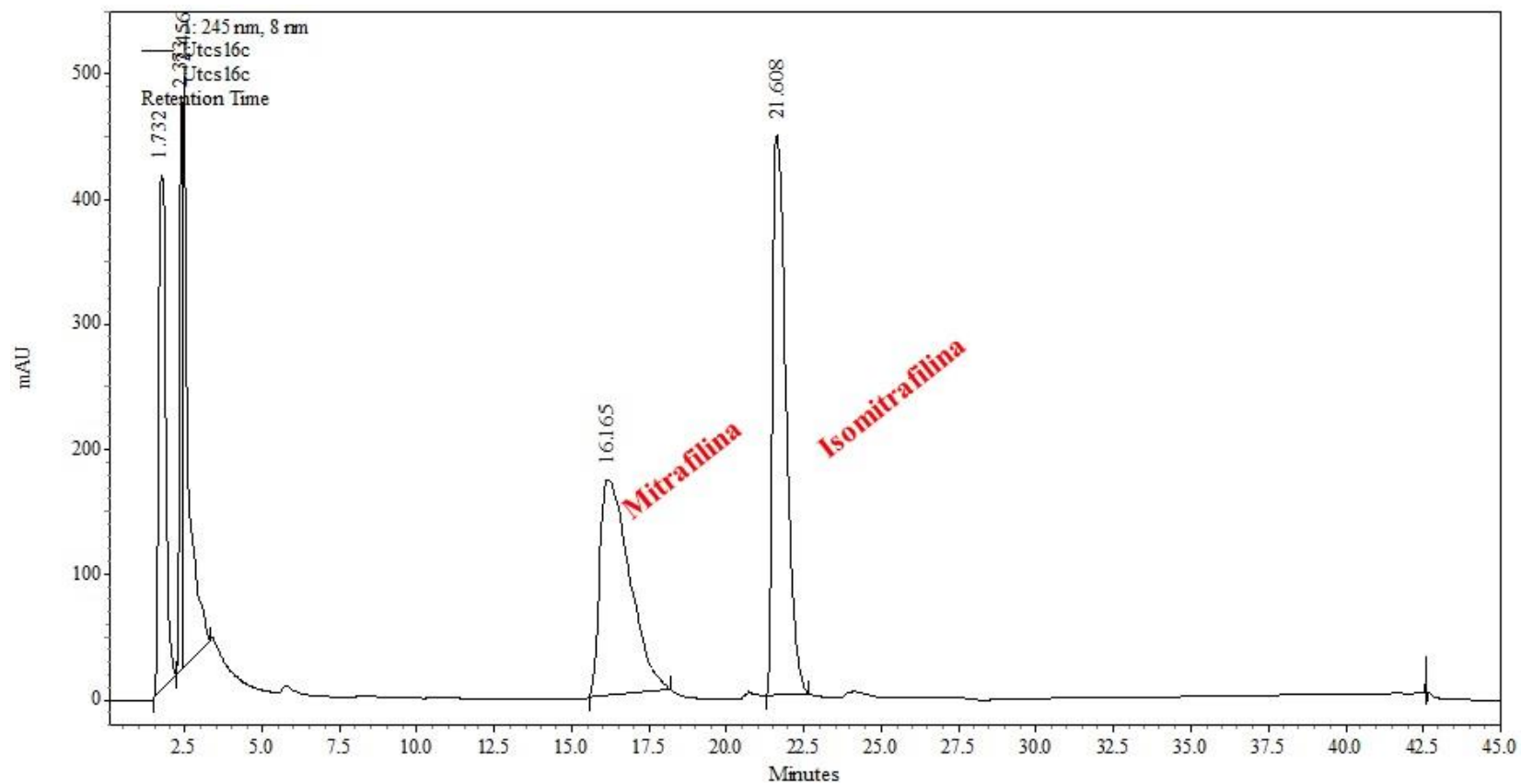


Figura 21. Cromatograma de *Uncaria tomentosa* do indivíduo 16 da população coletada no município de Cruzeiro do Sul (UTCS).

Tabela 17. Teste de Média dentro das populações de *Uncaria tomentosa* (mg.g⁻¹.PS dos AOP mitrafilina e isomitrafilina). TA: Tarauacá-AC; FJ: Feijó-AC; MZ: Mazagão-AP; ML: Mâncio Lima-AC; CS: Cruzeiro do Sul-AC; SA: Santana-AP; MC: Macapá-AP e AF: Afuá-PA.

		INDIVÍDUOS-Concentração de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (mg.g ⁻¹ .PS)																			
POP	AOP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TA	Mit	11,88c	0,0f	0,0f	0,0f	9,35d	15,61b	6,95e	14,97b	14,38b	6,91e	12,86c	1,38f	11,75c	9,81d	9,79d	9,63d	16,22b	9,16d	12,31c	19,45a
	Iso	3,15a	1,98a	3,73a	3,25a	2,03a	3,47a	1,85a	3,57 ^a	3,15a	1,80a	3,16a	0,36 ^a	10,0a	2,07a	2,28a	2,07a	3,67a	1,66a	2,69a	3,16a
FJ	Mit	1,35e	0,91e	2,58d	0,64e	1,09e	4,05c	2,60e	1,51d	1,10e	7,20a	1,24e	2,25d	6,23b	5,45b	2,29d	*	2,81d	6,68a	2,88d	3,94c
	Iso	1,51b	1,05b	1,75b	0,74b	0,83b	1,62b	2,23a	1,45b	1,26b	1,84b	0,94b	1,45b	2,61a	2,49a	1,30b	*	1,27b	3,12a	1,22b	1,75b
MZ	Mit	11,05a	5,68c	8,92a	7,20b	7,05b	10,26a	7,67b	6,76b	7,58b	6,55b	6,61b	4,86c	4,49c	7,49b	3,60c	3,96c	3,63c	2,28c	10,73a	4,82c
	Iso	1,85a	0,96c	1,99a	1,34b	1,26c	1,68a	1,21c	1,12c	1,15c	1,04c	1,06c	0,78d	0,76d	1,42b	0,52d	0,65d	0,60d	0,47d	1,91a	0,77d
ML	Mit	9,01d	11,12c	12,22b	5,39e	18,03a	9,91d	5,28e	10,62c	9,21d	5,18e	0,0f	0,0f	0,0f	0,0f	0,0f	0,0f	0,0f	0,0f	0,0f	0,0f
	Iso	2,50b	2,79b	3,75b	1,64b	5,29b	2,36b	2,16b	3,48b	2,40b	1,96b	0,0b	0,0b	0,0b	8,02a	12,04a	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,0b
CS	Mit	4,09f	6,21e	6,18e	12,32c	5,79e	9,13d	5,23f	7,39e	5,93e	16,54b	6,11e	11,64c	11,21c	10,16d	4,27f	32,94a	5,01f	0,0g	0,0g	4,90f
	Iso	1,82d	1,55e	1,51e	4,22d	2,19d	1,89d	1,08e	1,92d	1,73d	3,90b	2,02d	2,92c	2,20d	2,11d	2,52c	7,37a	1,15e	0,46e	2,71c	1,33e
SA	Mit	0,0h	0,0h	3,88f	6,88d	2,53f	7,61c	11,15a	0,0h	6,13d	5,23e	3,68f	4,58e	3,23f	7,92c	3,38f	4,68e	1,78g	7,75c	7,11d	9,54b
	Iso	2,58 ^a	0,74d	1,08c	1,69b	1,05c	1,71b	2,44a	1,49b	1,30c	1,22c	1,06c	1,19c	0,95d	1,76b	0,76d	1,26c	0,65d	1,87b	1,63b	2,59a
MC	Mit	5,81e	7,09c	6,61d	7,38c	8,25b	7,96b	8,04b	10,35a	9,74 ^a	5,62e	9,41a	8,04b	4,17f	4,37f	5,36e	6,96c	0,62g	0,57g	0,0g	0,0g
	Iso	1,73 ^a	2,41a	2,18a	4,82 ^a	3,01a	1,81a	2,16a	3,28 ^a	1,71 ^a	2,77a	2,98a	2,46 ^a	2,60a	2,18a	1,60 ^a	2,49a	0,25a	0,23a	0,0a	0,0a
AF	Mit	3,32c	6,00a	2,49d	1,14f	2,73d	2,16e	Nq	3,99b	0,0g	0,0g	0,0g	1,81e	0,81f	0,78f	0,0g	0,0g	0,0g	0,0g	0,0g	0,0g
	Iso	1,66b	1,23c	0,81d	0,78d	1,71b	1,23c	1,07c	1,70b	1,49b	0,61d	2,76a	1,43b	0,73d	0,61d	0,32d	0,96c	0,96c	1,02c	1,32c	1,85b

As médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. * Indivíduo não coletado para análise

fitoquímica.

Os

dados

foram

transformados

para

$\sqrt{x} + 0,5$

Tabela 18. Teste de Média entre as populações de *Uncaria tomentosa* (mg.g^{-1} .PS dos AOP mitrafilina e isomitrafilina). TA: Tarauacá; FJ: Feijó; MZ: Mazagão; ML: Mâncio Lima; CS: Cruzeiro do Sul; SA: Santana; MC: Macapá e AF: Afuá.

Concentração de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (mg.g^{-1} .PS)		
População	Mitrafilina	Isomitrafilina
TA	11,17a	2,99a
FJ	3,27b	1,61b
MZ	6,47b	1,12b
ML	4,73b	2,50a
CS	8,28a	2,31a
SA	4,93b	1,43b
MC	5,65b	2,18a
AF	1,31b	1,14b

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados foram transformados para $\sqrt{x} + 0,5$.

Como pode ser observado na Tabela 17, o alcaloide mitrafilina foi quantificado em 81,2 % das amostras e a isomitrafilina em 94,3 %. Isso demonstra que apenas 5,6%, ou seja, nove indivíduos, não tiveram o teor de nenhum alcaloide oxindólico pentacíclico estudado quantificado.

A população de Cruzeiro do Sul-AC, bem como a de Tarauacá-AC, são superiores estatisticamente em termos de produção e acúmulo dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos avaliados neste trabalho.

Apesar de haver uma similaridade genética entre as populações de Tarauacá, Feijó e Macapá (Grupo gênico 1), não pode ser feita uma correlação entre elas em relação aos AOP, pois esses alcaloides foram bastante variáveis nesses municípios, o que revela não haver correlação entre os grupamentos genéticos e químicos, uma vez que os genes envolvidos na produção da mitrafilina e isomitrafilina estão sendo possivelmente mais expressos em uma população do que nas outras. A população de Tarauacá se destacou em relação às demais na quantificação dos AOP, no entanto, essa população obteve a menor variabilidade genética.

Alguns pesquisadores questionam a classificação adotada de dois quimiotipos diferentes para a mesma espécie e sustentam que esses perfis de alcaloides podem ser intercambiáveis sob condições sazonais (PILARSKI et al., 2006) além disso, afirmam que dentro de uma mesma espécie a variação desses metabólitos

pode ser muito variável, o que corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho.

Em trabalho semelhante realizado por Peñaloza et al. (2015) que avaliaram concentrações de diferentes alcaloides oxindólicos pentacíclicos e tetracíclicos, em folhas, cascas do caule e ramos de *U. tomentosa*, também foi observado uma grande variabilidade química entre as os indivíduos coletados, mesmo quando comparados à duas amostras comerciais da espécie.

Em *U. tomentosa* os alcaloides estão distribuídos nas flores (2,10 %), folhas (1,59 %), cascas do caule (0,50 %), ramos com espinhos (0,32 %) (QUIROZ et al., 2004) e raiz (1,00 - 2,00 %) (REINHARD,1999). PEÑALOZA et al. (2015) estudaram acessos de *U. tomentosa* coletados *in situ* no Perú e mostraram que o teor de alcaloides oxindólicos variou expressivamente de um indivíduo para o outro, tanto nas cascas do caule (0,328 - 2,591 %), nas folhas (0,360 - 4,792 %) quanto nos ramos (0,347 - 1,431 %).

Devido ao manejo florestal ainda incipiente de *U. tomentosa*, a casca do caule é a principal fonte de extração em populações nativas. Isso parece explicar a heterogeneidade química frequente relatada entre amostras a partir de diferentes origens geográficas, condições climáticas e condições de crescimento da planta (PEÑALOZA et al., 2015).

O fato de terem sido encontrados indivíduos em ambientes de ocorrência natural das espécies, que produzem muito mais alcaloides nas folhas do que na casca do caule pode tornar mais viável a coleta das folhas, se o objetivo da indústria farmacêutica for a obtenção de extratos ricos em alcaloides. A produção de fitoterápico a partir da folha pode facilitar o manejo da espécie, considerando que intervalos de 10 anos são necessários para a retirada da casca dos troncos, sendo um tempo consideravelmente longo. Além disso, a retirada de folhas compromete menos a condição fitossanitária e a conservação da planta.

A quantificação dos alcaloides pentacíclicos mitrafilina e isomitrafilina em *U. guianensis* também foi muito variável entre os indivíduos (Tabela 19). A Figura 22 mostra o cromatograma do indivíduo 1 da população coletada no município de Rio Branco-AC. Apenas 24,8% dos indivíduos produziram mitrafilina, e 20,4% isomitrafilina. As duas populações que foram coletadas em municípios do estado do Amapá (Mazagão e Oiapoque) não apresentam os alcaloides oxindólicos em limites quantificáveis e a população de Cruzeiro do Sul-AC não produziu mitrafilina em

nenhum indivíduo, em quantidades suficientes para ser quantificada. Além disso, a população coletada no município de Assis Brasil-AC, foi a única que apresentou mitrafilina em todos os indivíduos coletados.

O indivíduo 17 da população coletada no município de Boca do Acre-AM foi o maior produtor de mitrafilina (2,69 mg.g⁻¹PS) e de isomitrafilina (0,68 mg.g⁻¹PS) em comparação com todos os demais indivíduos de *U. guianensis*.

Na análise entre as populações (Tabela 20), pode-se observar um maior acúmulo de mitrafilina e isomitrafilina na população coletada no município de Boca do Acre-AM (1,09 mg.g⁻¹PS).

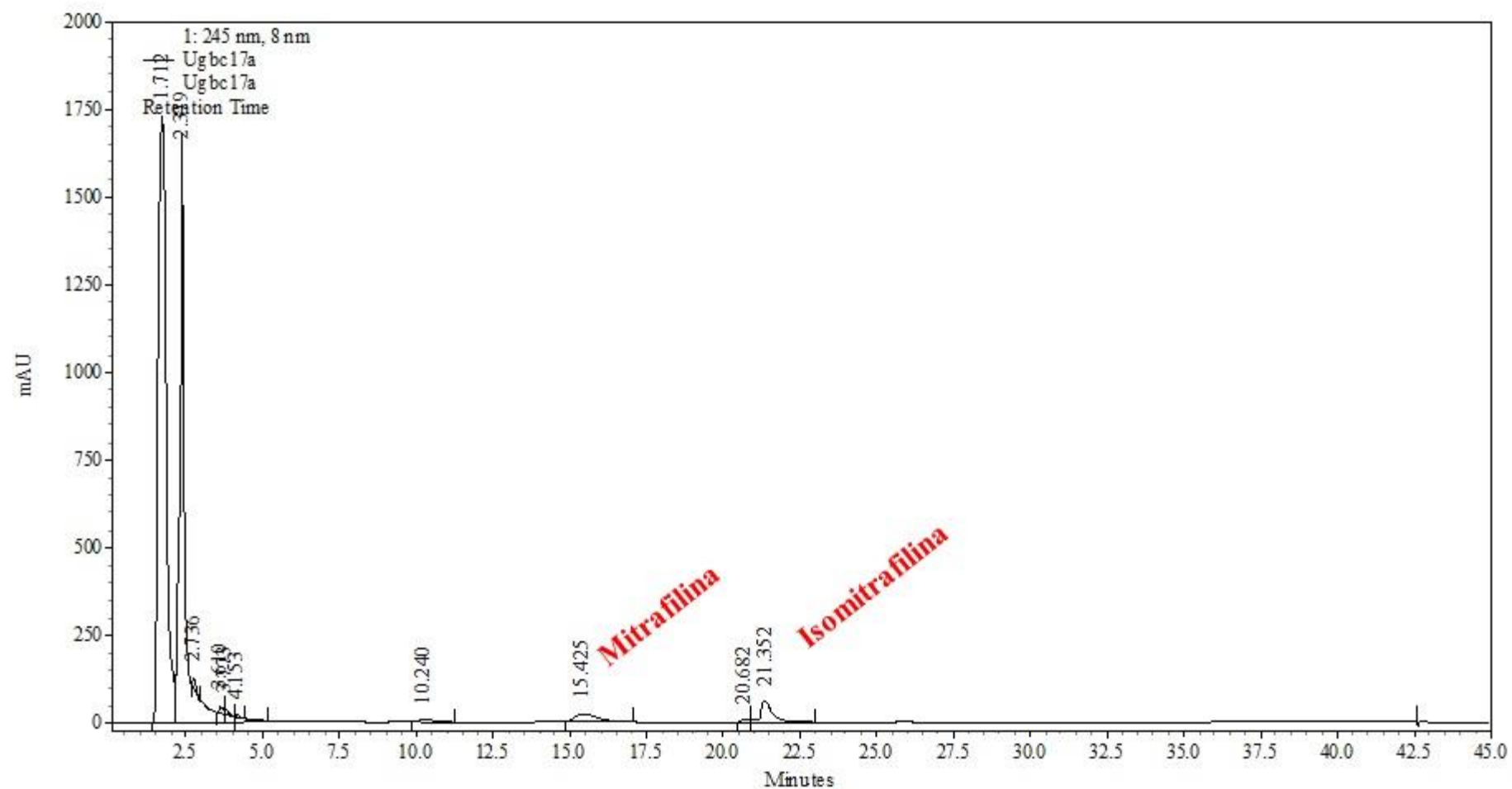


Figura 22. Cromatograma de *Uncaria guianensis* (indivíduo 17) da população coletada no município de Boca do Acre-AM (UGBC).

Tabela 19. Teste de Média dentro das populações de *Uncaria guianensis* (mg.g⁻¹.PS dos AOP mitrafilina e isomitrafilina). RB: Rio Branco-AC; BC: Boca do Acre-AM; OI: Oiapoque-AP; MZ-Mazagão-AP; CS: Cruzeiro do Sul-AC; FJ: Feijó-AC; XA: Xapuri-AC; AB: Assis Brasil-AC.

		INDIVÍDUOS-Concentração de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (mg.g ⁻¹ .PS)																				
POP	AOP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
RB	Mit	0,22a	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,19a	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	
	Iso	0,11c	0,00f	0,07d	0,00f	0,00f	0,00f	0,00f	0,00f	0,00f	0,00f	0,00f	0,00f	0,00f	0,00f	0,16b	0,27a	0,13c	0,18b	0,04e	0,00f	0,06d
BC	Mit	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,98b	0,96b	2,69a	0,00c	0,00c	0,30c
	Iso	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,07c	0,16c	0,68a	0,21c	0,49b	0,08c
OI	Mit	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
	Iso	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
MZ	Mit	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
	Iso	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
CS	Mit	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
	Iso	0,00c	0,00c	0,00c	0,05b	0,11a	0,02c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c
FJ	Mit	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,49a	0,00b	*	*	*	
	Iso	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	0,10a	0,03b	*	*	*	
XA	Mit	0,00g	0,00g	0,00g	0,00g	0,601c	0,892b	0,00g	0,043f	0,273d	0,00g	0,053f	0,132e	0,004g	0,036f	0,012g	0,038f	0,00g	1,24a	0,00g	0,082f	
	Iso	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,036b	0,524a	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,00c	0,022b	0,00c	0,00c	0,023b	0,00c	0,00c	
AB	Mit	0,79c	0,39e	0,92c	1,00b	0,29e	1,17a	0,47d	0,56d	0,78c	0,52d	0,63d	0,57d	0,13f	0,55d	0,51d	0,44d	0,38e	0,69d	0,54d	0,58d	
	Iso	0,37a	0,00e	0,017e	0,25c	0,013e	0,30b	0,088d	0,013e	0,00e	0,09d	0,00e	0,00e	0,00e	0,00e	0,00e	0,00e	0,00e	0,00e	0,00e	0,00e	

As médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. * Indivíduo não coletado. Os dados

foram

transformados

para

$\sqrt{x} + 0,5$

Tabela 20. Teste de Média entre as populações de *Uncaria guianensis* (mg.g^{-1} .PS dos AOP mitrafilina e isomitrafilina). RB: Rio Branco-AC; BC: Boca do acre-AM; OI: Oiapoque-AP; MZ-Mazagão-AP; CS: Cruzeiro do Sul-AC; FJ: Feijó-AC; XA: Xapuri-AC; AB: Assis Brasil-AC.

Concentração de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (mg.g^{-1} .PS)		
População	Mitrafilina	Isomitrafilina
RB	0,28b	0,13b
BC	1,09a	0,29a
OI	0,00c	0,00b
MZ	0,00c	0,00b
CS	0,00c	0,05b
FJ	0,49b	0,04b
XA	0,37b	0,11b
AB	0,61b	0,10b

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados foram transformados para $\sqrt{x} + 0,5$.

Foi constatado similaridade genética (Grupo gênico 2-verde) e química entre as populações de Mazagão-AP e Oiapoque-AP. A causa dessa correlação pode ter sido por que os genes envolvidos na produção dos alcaloides oxindólicos avaliados estavam sendo pouco ou não expressos nessas duas populações, o que as incluiu em um mesmo grupo gênico. Esse pode ter sido o motivo de *U. guianensis* possuir três grupos gênicos (mesmo apresentando índices de diversidade e conservação melhores do que a *U. tomentosa*), já que apresentaram duas populações muito divergentes das demais coletadas.

Vários estudos que comparam dados químicos e genéticos corroboraram com os resultados encontrados no presente trabalho, de que não houve correlação entre esses dois parâmetros. Dente eles os trabalhos com *Cananga odorata* (BENINI et al., 2012); *Centella asiatica* (ZHANG et al., 2011); *Crocus sativus* (SIRACUSA et al., 2012); *Croton antisyphiliticus* (OLIVEIRA, 2015); *Coriandrum sativum* (LÓPES et al., 2008); *Lippia alba* (MANICA-CATTANI et al., 2009); *Erigeron breviscapus* (LI et al., 2013); *Panax notoginseng* (HONG et al., 2005); *Vitex rotundifolia* (HU et al., 2007) e *Zataria multiflora* (HADIAN et al., 2011).

Para a espécie *U. tomentosa* a análise de correlação matricial entre distância geográfica e isomitrafilina mostrou-se diferente de zero e significativa

($rm=0,3005$; $p\leq 0,05$), o que evidencia que populações que foram coletadas em distâncias próximas apresentaram quantidades de isomitrafalina semelhantes (Figura 23).

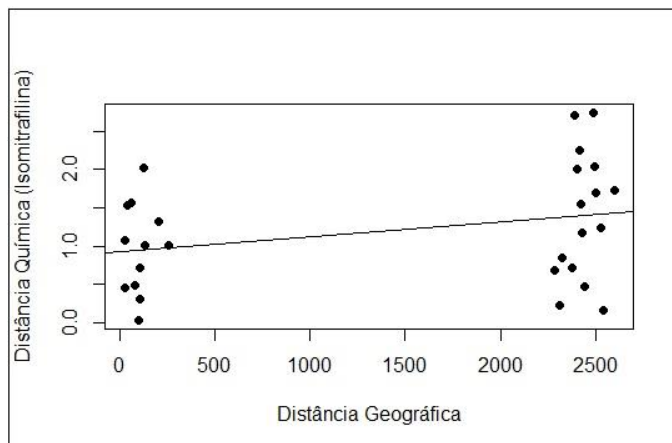


Figura 23. Gráfico de correlação entre o alcaloide isomitrafalina e a distância geográfica das populações de *Uncaria tomentosa*.

A mesma correlação feita comparando o alcaloide isomitrafalina e a altitude também mostrou-se diferente de zero e significativa ($rm=0,2828$; $p\leq 0,05$), evidenciando que a concentração desse alcaloide é influenciada positivamente em relação à altitude (Figura 24).

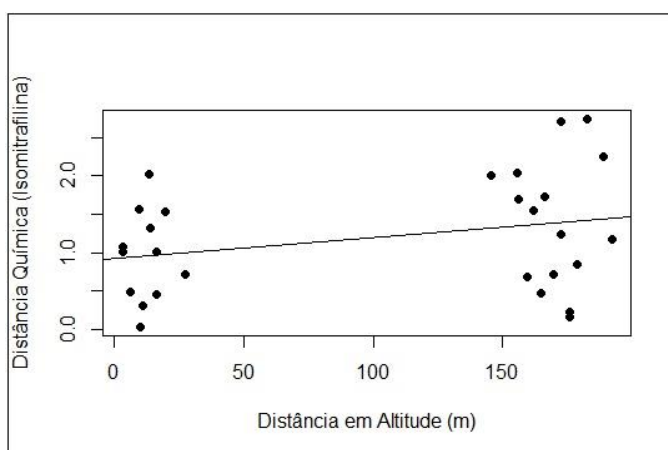


Figura 24. Gráfico de correlação entre o alcaloide isomitrafalina e a altitude das populações de *Uncaria tomentosa*.

Não foi encontrado correlação quando se analisou os parâmetros de distância geográfica e altitude com o alcaloide mitrafilina para a espécie *U. tomentosa*.

Já para *U. guianensis* as mesmas comparações foram realizadas, no entanto não foi encontrado correlação e significância em nenhum dos parâmetros analisados.

Fatores genéticos, definidos pelo genótipo, são responsáveis por regular e manter características próprias das plantas, em relação aos seus diversos aspectos, como a síntese de metabólitos secundários (ANDRADE e CASALI, 1999). A adaptação às mais diversas condições ambientais apresenta desafios evolutivos incomuns, e as plantas que ocorrem ao longo de um gradiente ambiental variam também quanto à sua constituição genética e atividade fisiológica, condicionadas pelo processo de seleção natural, embora pertencentes à mesma espécie, podem responder de modo distinto a dado grau de mudança ambiental (OLIVEIRA, 1997).

Apesar de cada espécie ter se adaptado ao seu habitat, frequentemente as plantas são capazes de sobreviver em considerável faixa de temperatura. A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exercem maior influência em seu desenvolvimento, afetando, portanto, a produção de metabólitos secundários.

A precipitação também tem influência da produção dos metabólitos secundários. Em condições de estresse hídrico a produção de vários metabólitos é afetada inclusive os alcaloides (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Dados de temperatura média (°C) e precipitação média (mm) coletados nos locais de ocorrência das populações de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, nos seis meses que antecederam a coleta de cada população (Apêndices 3 e 4) mostraram que houve pouca variação desses parâmetros nos diferentes municípios. Valores médios de 28,35°C foram encontrados nos municípios de Santana-AP, Macapá-AP e Afuá-PA (obteve temperatura próxima) nas populações coletadas de *U. tomentosa*, valores esses pouco superiores aos demais municípios. Além disso, no município de Tarauacá-AC e Feijó-AC foram encontradas as maiores incidências de chuvas no período (6,25 mm e 6,24 mm, respectivamente) (Apêndice 3). Como Tarauacá foi a população que apresentou maior concentração dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos, infere-se que a quantidade de chuva no período que antecedeu a coleta pode ter influenciado na diferenciação e maior produção desses alcaloides nessa localidade.

Para a espécie *U. guianensis*, pode-se observar que a população de Oiapoque-AP (UGOI) foi a que apresentou média mais elevada de temperatura no período de seis meses que antecederam a coleta. Em relação à precipitação, a população de Feijó-AC (UGFJ) foi a que apresentou maior média de chuvas no período (Apêndice 4).

Esses dados divergem dos demais encontrados na literatura, que apontam o estresse hídrico como um fator favorável a produção dos alcaloides (HOFT et al., 1996). Segundo Cechinel-Filho (2012) o estresse hídrico pode afetar o metabolismo das plantas interferindo em importantes processos fisiológicos como o fechamento dos estômatos, o que causa a diminuição da fotossíntese, conduzindo a planta a um estresse oxidativo, e gera a inativação de enzimas presentes nos cloroplastos, aumentando assim a permeabilidade da membrana, portanto induz a um aumento na produção de glicosídeos cianogênicos, alguns terpenos, antocianinas e alcaloides.

O efeito da altitude sobre a produção de vários tipos de alcaloide tem sido demonstrado em diversas plantas (NEJADHABIBVASH et al 2012; ANDOLA et al., 2010; CHANDRA; PUROHIT, 1980) e estudos químicos realizados com a casca de *U. tomentosa*, coletadas no Perú, mostraram que em baixa altitude ocorre maiores concentrações de alcaloides oxindólicos tetracíclicos e em altitudes elevadas há maior concentração do tipo oxindólico pentacíclico (TORREJÓN et al., 2010). O presente trabalho realizado com folhas de *U. tomentosa* confirmou o efeito positivo da altitude no acúmulo do alcaloide oxidólico pentacíclico isomitrafalina, que é um epímero da mitrafalina.

Com a elevação da altitude ocorrem maior intensidade da luz ultravioleta solar (BLUMTHALER et al., 1997) e a irradiação UV está diretamente relacionada com a formação de determinados tipos de alcaloides (LYDON et al., 2009; GREGIANINIY et al., 2003). A nível genético, fatores nucleares envolvidos na expressão do gene relacionado à UV foi identificado e caracterizado a partir de gene essencial na via biossintética de alcaloides indólicos em *Catharanthus roseus*.

8. CONCLUSÕES

O marcador molecular SRAP foi eficiente para caracterizar a variabilidade genética em populações de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, e essas espécies já se encontram estruturadas em modelo de ilhas, por isso requerem cuidados em relação à conservação. O fato de ambas as espécies apresentarem a maior variabilidade genética dentro das populações, sugere que a melhor estratégia de conservação é a coleta de um maior número de indivíduos dentro das populações com diferentes grupos gênicos.

A produção de mitrafilina e isomitrafilina por ambas as espécies não foi homogênea, havendo portanto quimiotipos. Quanto à espécie *U. guianensis* pode-se afirmar que os marcadores químico não devam ser mitrafilina e isomitrafilina, porque há populações que não apresentaram estas substâncias. Ao contrário de *U. guianensis*, os marcadores da espécie *U. tomentosa* são mitrafilina e isomitrafilina, sendo os indivíduos de Tarauacá (AC) os que apresentaram maior concentração dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos. Portanto, esta população é a mais indicada para ser estudada visando à produção de medicamentos fitoterápicos.

9. REFERÊNCIAS

- AHMAD, R. et al. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 129, n. 2, p. 204-210, 2004.
- AMARAL, I. A et al. Educação Ambiental e ensino de Ciências: Uma história de controvérsias. **Proposições**, Campinas, v. 12, n. 1, p.73-93, mar. 2001. Quadrimestral.
- AMERICAN HERBAL PHARMACOPEIA, **Herbal Gramatica**, v. 40, 1997.
- ANDOLA, H.C.K.S.G et al. Habitat-Dependent Variations in Berberine Content of *Berberis asiatica* Roxb. ex. DC. in Kumaon, Western Himalaya. **Chemical Biology**. v.7, n.2, p. 415-420. 2010.
- ANDRADE, F. M. C.; CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: Relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário**. Viçosa: UFV, 139 p. 1999.
- AQUINO, R. et al. Plant metabolites. New compounds of anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**. v.54, p.453-459. 1991.
- AQUINO, R. et al. Triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**. v.45, p. 1033-1040, 1997.
- ARELLANO, P. **Instituto Nacional de Medicina Tradicional**. Ministerio de Salud. Lima, Perú, 1994.
- ARPA- **Um novo caminho para a conservação da Amazônia**. Ministério do Meio Ambiente, 34p, 2010.
- BABAEI, S. et al. Analysis of gentic diversity among saffron (*Crocus sativus*) accessions from different regions of Iran as revealed by SRAP markers. **Scientia Horticulturae**, v. 171, p. 27-31, 2014.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v.3, UFV, p.189-227, 1986.
- BENINCASA, B. I. Estudo da diversidade química e genética em populações naturais de *Erythrina mulungu* Mart. Ex. Benth. 56f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP. 2015.
- BENINI, C. et al. Comparative chemical and molecular variability of *Cananga odorata* (Lam.) Hook. F. & Thomson forma genuina (Ylang-Ylang) in the western Indian Ocean Islands: Implication for valorization. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p.1389-1402, 2012.
- BERTOL, G. **Desevolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de matérias-primas e produtos contendo *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. – Rubiaceae**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Cutitiba, Paraná, Brasil. 141f. 2010.

BLUMTHALER, M. et al. Increase in solar UV radiation with altitude. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v. 39, p.130-134. 1997.

BOTH, F. L. **Avaliação do perfil farmacológico de psicolatina isolada de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae)**. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 133f. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde, Portal da Saúde - SUS. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)**. BRASIL. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. (Org.). **A ONU e o meio ambiente**. 2014. Disponível em: <<http://www.onu.org.br/a-onu-em-acao/a-onu-e-o-meio-ambiente/>>. Acesso em: 11 ago. 2014.

BRITISH HERBAL PHARMACOPEIA. BOURNAMOUTH. **British Herbal Medicine Association**, 255. 1989.

BUDAK, H. et al. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. **Theoretical Application of Genetic**, v. 108, p. 328-334, 2004.

BUTTOW, M.V. et al. Caracterização molecular de populações de *Butia capitata* (Arecaceae) do Sul do Brasil através de marcadores AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, p.230-239, 2010.

CADASTRO NACIONAL DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO. Sistema Nacional de Unidades de Conservação. 2015. Disponível em:<<http://www.florestal.gov.br/snif/recursos-florestais/sistema-nacional-de-unidades-de-conservacao?print=1&tmpl=component>>. Acesso em 13 Out. 2015.

CANALES-SPRINGETT, A.W. et al. Respuesta de la regeneración natural de la *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. “Uña de gato”, al efecto de la luz en ecosistemas boscosos primários intervenidos dentro del bosque nacional Alexander Von Humboldt, Pucallpa, Perú. **Ecología Aplicada**. v.12, n.2, p.99-109, 2013a.

CANALES-SPRINGETT, A.W. et al. Respuesta de la regeneración natural de la *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F. Gmel “Uña de gato”, al efecto de la luz em bosques secundarios dentro del bosque nacional Alexander Von Humboldt, Pucallpa, Perú. **Ecología Aplicada**. v.12, n.2, p.111-120, 2013b.

CAON, T. et al. Antimutagenic and antiherpetic activities of different preparations from *Uncaria tomentosa* (cat's claw). **Food and Chemical Toxicology**, v.66, p.30-35, 2014.

- CARDOSO, S. R. S. et al. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP analysis. **Molecular ecology**, v. 9, n. 11, p. 1753-1760, 2000.
- CAVALLI, S. S.; WINGE, H. Variabilidade genética em populações naturais. In: FRETAS, L. B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, p. 165-176, 2003.
- CCAHUANA-VASQUEZ, R.A.; SANTOS, S.S.F.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. **Brazilian Oral Research**. v.21, n.1, p.46-50, 2007.
- CEYLAN, A. et al. Genetic diversity among the Turkish common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) as assessed by SRAP, POGP and cpSSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 54, p. 219-229, 2014.
- CHANDRA, P; PUROHIT, A. N. Berberine Contents and Alkaloid Profile of Berberis Species. **Biochemistry Systematic and Ecology**. v.8, p.379-380. 1980.
- CHEN, M. et al. Genetic linkage map construction for kenaf using SRAP, ISSR and RAPD markers. **Plant Breed**, v.130, p. 679-687, 2011.
- CHENG, F.J. et al. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells. **Food Chemistry and Toxicology**, v.45, p.2206-2218, 2007.
- CORDELL, G. A. et al. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytherapy Researche**, v. 15, p. 183-205, 2001.
- CRESTE. S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorfisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306. 2001.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia Univ. Press. p.995-1000, 1981.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering in plants**. Boston, Houghton Mifflin. 303p. 1968.
- CUNHA, A.P. et al. **Plantas e produtos vegetais em Fitoterapia**. Serviço de Educação e Bolsas, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2003. 702p. 2ed.
- D'ANDREA, A. et al. Examen del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. la salvia morada de Corrientes. **IX Sesión de comunicaciones científicas y tecnológicas de la UNNE**, p.74, 1995.
- DAI, X. et al. Analysis of indica- and japonica-specific markers of *Oryza sativa* and their applications. **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, p. 287-296, 2012.

DE CANDOLE, A.P. **Rubiaceae: Prodrromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis**. v.4, Treuttel e Wurtz, p.375-376, 1830.

DE FEO, V. Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes. **Fitoterapia**. v.63, p.417-440, 1992.

DESMARCHELIER, C. et al. Evaluation of the in vitro antioxidant activity in extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Phytotherapy Research**, v.11, p. 254-256, 1997.

DINIZ-FILHO, J.A.F. et al. Mantel test in population genetics. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 4, p. 475-485, 2013.

DINIZ-FILHO, J.A.F. **Métodos Filogenéticos Comparativos**. Holos, Ribeirão Preto, 162 p, 2000.

DOMINGUES, A. et al. Prevention of experimental diabetes by *Uncaria tomentosa* extract: Th2 polarization, regulatory T cell preservation or both? **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.635-642, 2011.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus (Rockville)**, v.12, n.1, p.13-15, 1987.

DREIFUSS A.A. et al. *Uncaria tomentosa* Exerts Extensive Anti-Neoplastic Effects against the Walker-256 Tumour by Modulating Oxidative Stress and Not by Alkaloid Activity. **Plos one**, v.8, n.2, p.1-14, 2013.

DWYER, J. Rubiaceae. In: Flora of Panamá. **Ann. Missouri Botanic Garden**. v.67, n.2, p.332-335, 1980.

DWYER, J.D. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Flora do Panamá. Familia 179. Rubiaceae. v.67, 1º y 2º parts, p.1-522, 1980.

ELLSTRAND, C. A.; ELAM, D. R. Population genetics on sequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.24, p.217-242, 1993.

ENNOS, R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among the plant populations. **Hereditary**, London, v.72, p.250-259, 1994.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 2611–2620. 2005.

FALK, D.A., Knapp, E.E., Guerrant, E.O. **An introduction to restoration genetics**, Society of Ecological Restoration, 2001.

FALKIEWICZ, B.; LUKASIAK, J. Vilcacora [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmel.] – a review of published scientific literature. **Case Reports and Clinical Practice Revue**, v.2, p. 305-316, 2001.

FARWIG, Nina; BRAUN, Carsten; HNING-GAESE, Katrin Bo. Human disturbance reduces genetic diversity of an endangered tropical tree, *Prunus africana* (Rosaceae). **Springer Science business Media**, Mainz, n. 9, p.317-326, 2007.

FENG, N. et al. Genetic diversity and population structure of *Celosia argentea* and related species revealed by SRAP. **Biochemistry Genetic**, v. 47, p. 521-32, 2009.

FENG, S. et al. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated *Zanthoxylum* germplasms based on sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. **Genetic Resources Crop Evolution**, v. 62, p. 1193-1204, 2015.

FERIA-ROMERO, I. et al. Induced accumulation of oleanolic acid and ursolic acid in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. **Biotechnology Letters**: v.27, n.12, p.839-843, 2005.

FERRIOL, M. et al. Plant genetic resources. *Crop Science*, v. 44, p. 653-664, 2004.

FLORES Y. **Propagación por semillas de la “Uña de Gato”**. Pucallpa, Perú, Instituto Nacional de Investigación Agraria, 1995. 51p. (Boletín Técnico, 5).

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2006, 280p.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**, 2ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1997, 144p.

GANGA, R. A. D. et al. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 494-498, 2004.

GANZERA, M. et al. Improved method for the determination of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. **Planta Medica**, v.67, p.447-450, 2001.

GARCIA, E.P. et al. Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. **Phytomedicine**, v.14, p.280-284, 2007.

GARCIA-KIRKBRIDE, M.C. A preliminary phylogeny for the neotropical Rubiaceae. **Plant Systematic Evolution**, v.141, p.115-121, 1982.

GENTRY, A.H. **Woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Perú) with supplementary notes on Herbaceous taxa**. Washington DC, 1993.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GREGIANINIY, T.S. The alkaloid Brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is a singlet oxygen quencher. **Photochemistry and Photobiology**. v.78, n.5, p.470–474. 2003.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.*(Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. Da UFSC, 2001. p. 13-26.

GUEVARA, A.Q. **Silvicultura de la Uña de Gato- Alternativa para su conservación**. Pucalpa-Perú: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, 1995.43p.

GUIMARÃES, C. T. et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Biotecnologia**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.30, n.253, p.24-33, nov/dez. 2009.

GUO, D. et al. Genetic variability and relationships between and within grape cultivated varieties and wild species based on SRAP markers. **Tree Genetics & Genomes**,v. 8, p. 789-800, 2009.

HADIAN, J. et al. Chemical and genetic diversity of *Sataria multifloraboiss*. Accessions Growing wild in Iran. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n.1, p. 176-188, 2011.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SHERMAN-BROYLES, S. L. **Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species**. **New Forests**. v.6, p.95-124, 1992.

HEYWOOD, V. H.; IRIONDO, J. M. Plant conservation: old problems, new perspectives. **Biological Conservation**, [s. L.], n. 113, p.321-335, 2003.

HONG, D. Y. Q. et al. Genetic diversity and variation of saponin contents in *Panax notoginseng* roots from a single farm. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 22, p. 8460-8467, 2005.

HU, Y. et al. Association between chemical and genetic variation of *Vitex rotundifolia* populations from different locations in China: its implication for quality control of medicinal plants. **Biochemical Chromatography**, v. 21, p. 967-975, 2007.

HUANG, C. et al. Genetic relationships of *Cynodon arcuatus* from different regions of China revealed by ISSR and SRAP markers. **Scientia Hosticulturae**, v. 162, p. 172-180, 2013.

INDACOCHEA, I.L; POLLITO, P.Z. **Guia para el cultivo, aprovechamiento y conservación de la uña de gato *Uncaria tomentosa* (Willd. Ex Roemer & Schultes) De Candolle**. SECAB: Ciencia y Tecnología, 1999. n.75, 49p.

JING, Z. B. et al. Genetic diversity and relationships between and within persimmon (*Diospyros L.*) wild species and cultivated varieties by SRAP markers. **Plant and Systematics Evolution**, v.299, p.1485-1492, 2013.

- JOLY, A.B. Introdução à Taxonomia Vegetal. Botânica, 5.ed, São Paulo, Cia Ed. Nacional, p.570-571, 1979. **Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 960-966, 2009.
- JORDANO, P. et al. Ligando frugivoria e dispersão de sementes à biologia da conservação. In: DUARTE, C. F. et al. **Biologia da conservação: essências**. Editora Rima, São Paulo, Brasil. p. 411-436, 2006.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. **Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas**. Série Técnica IPEF. v.12, p.65-70, 1998.
- KEPLINGER, K. **Cytostat, contraceptive and antiinflammatory agent from *Uncaria tomentosa* roots**. Patent – PCT Int. Appl WO – 82 01, 130. p 27, 1982.
- KEPLINGER, K. et al. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.-Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.23-24, 1999.
- KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: um Mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**. v.30, n.3, p. 241-248. 2009.
- LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Biotecnologia**, p.97-108, 2000.
- LAUS, G. Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Uncaria*. **Phytotherapy Research**, v.18, p.259-274, 2004.
- LAUS, G. et al. Alkaloids of Peruvian *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, v.45, p.855-860, 1997.
- LAUS, G; KEPLINGER, D. Separation of stereoisomeric oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.662, p.243-249, 1994.
- LAUS,G. Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Uncaria*. **Phytotherapy Research**, v.18, p.259-274, 2004.
- LI G., MACVETTY, P. B. E., QUIROS, C. F. **SRAP Molecular Marker Technology in Plant Science**. Plant Breeding from Laboratories to Fields. Chapter 2, p. 23-43, 2013.
- LI, G.; QUIROS, C. F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, p.455-461, 2001.
- LI, X. et al. The relationships between chemical and genetic differentiation and environmental factors across the distribution of *Erigeron breviscapus* (Asteraceae). **Plos one**, v. 8, n. 11, p. 1-10, 2013.

LICHSTEIN, J. W. Multiple regression on distance matrices: a multivariate spatial analysis tool. **Plant Ecology**, v. 188, p. 117-131, 2007.

LIMA, V. **Mercado se abre para negócios das plantas amazônicas**. 2005. Disponível em: <<http://ac.gov.br>>. Acesso em: 27 mai. 2015.

LIN, Z. X. et al. Evaluation of application of a new molecular marker SRAP on analysis of F2 segregation population and genetic diversity in cotton. **Acta Genetica Sinica**, v. 31, n. 6, p. 622-626, 2004.

LINHART, Y. B. et al. Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. **Heredity**, v. 46, p. 407-426, 1981.

LIU, L. et al. The first genetic linkage map of Luohanguo (*Siraitia grosvenorii*) based on ISSR and SRAP markers. **Genome**, v.54, p. 19-25, 2011.

LIU, Y. et al. Genetic diversity in *Vicia amoena* (Fabaceae) germplasm resource in China using SRAP and ISSR markers. **Biochemical and Systematic Ecology**, v. 51, p. 86-93, 2013.

LÓPEZ, P. A. et al. Assessing phenotypic, biochemical and molecular diversity in coriander (*Coriandrum sativum* L.) germoplasm. **Genetic resources and crop evolution**, v. 55, n. 2, p. 247-275, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: SP, 2ed, 2008. 544p.

LOVELLES, M. D.; HAMDRICK, J. L. Ecological Determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**. Palo Alto, v.15, p.65-95, 1984.

LUNA-PALENCIA, G.R. et al. Differential alkaloid profile in *Uncaria tomentosa* micropropagated plantlets and root cultures. **Biotechnology Letters**, v.35, p.791-797, 2013.

LYDON, J. et al. The Effects of Ambient Solar UV Radiation on Alkaloid Production by *Erythroxylum novogranatense* var. *Novogranatense*. **Photochemistry and Photobiology**. v.85, p.1156–1161. 2009.

MAC BRIDGE, JF. **Flora del Perú**. Field Museum of Natural History Botany.v.13, p.11-12. 1936.

MANICA-CATTANI, M. F. et al. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 375-380, 2009.

MARCON, G. **Estrutura genética de populações de *Stylosanthes humilis* H. b. K. (Leguminosae) de três regiões ecogeográficas do Estado de Pernambuco**. 179f. Tese

(Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 1988.

MARTINS, E.R. et al. **Plantas Mediciniais**. Viçosa: UFV, 2003. 220p.

MECHÁN, T.E. et al. Influencia de la variabilidad edáfica en la producción de biomasa del cultivo de la uña de gato *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. en la cuenca del río Aguaytia, Region Ucayali-Peru. **Ecología Aplicada**, v.6, n.1,2, p.33-37, 2007.

MIRANDA, E.M. Cat's claw- *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) D.C. and *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F. Gmel. In: SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida Amazônica**. Belém: CIFOR, Imazon, 2005. p.141-146.

MIRANDA, E.M. et al. Caracterização e avaliação de populações nativas de unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) D.C. and *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F. Gmel.] no vale do rio Juruá-AC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.5, n.2, 9.41-46, 2003.

MIRANDA, E.M.; SOUZA, J.A.; PEREIRA, R.C.A. **Subsídios técnicos para o manejo sustentável da unha de gato (*Uncaria spp.*) no Vale do Rio Juruá, AC**. Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, Embrapa, Brasil. 2001. p.1-24. (Documentos 68).

MUNOS B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. **Nature Review Drugs Discovery**. v.8, p. 959–968, 2009.

MUR, E. et al. Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype *Uncaria tomentosa* for the treatment of rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v.29, p.656-658, 2002.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L. et al. **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.31-55.

NEJADHABIBVASH, F. et al. Study of inheritance and environment on tropane alkaloids within *Hyoscyamus* species. **Australian Journal Crop Science**. v 6, n.10, p.1428-1434. 2012.

NEWMAN D.J.; CRAGG G.M. Natural products as sources of new drugs over 30 years from 1981 to 2010. **Journal Nature Products**. v.75, p. 311–335, 2012.

NOGUEIRA NETO, J, P. et al. **Contraceptive effect of *Uncaria tomentosa* (cat's claw) in rats with experimental endometriosis**. Acta Cirúrgica Brasileira, v.26, n.2, p. 15-19, 2011.

OLIVEIRA, J. E. Z. **Variabilidade isoenzimática e do teor de óleo essencial em acessos de *Bidens pilosa* L.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 72p. 1997.

OLIVEIRA, T. G. **Estudo da diversidade genética e química e produção do epímero do ácido caurenóico em calos de *Croton antisiphiliticus* (MART.) MÜLL.ARG.** Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil. 78 p. 2015.

OLSON, D. M., E. DINERSTEIN, et al. **The Global 2000: a representation approach to conserving the Earth's distinctive ecoregions.** Conservation Science Program, WWF - US. Washington, D.C, p.181. 2000.

ORTEGA, O. et al. Pattern of genetic diversity of cultivated and non-cultivated mashua, *Tropaeolum tuberosum*, in the Cusco region of Perú. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.54, p. 807-821, 2007.

PAVEI C. et al. HPLC-PDA method for quinovic acid glycosides assay in Cat's claw (*Uncaria tomentosa*) associated with UPLC/Q-TOF-MS analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.62, p.250-257. 2002.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. **Genealex 6.5: genetic analysis in Exel population genetic software for teaching and research.** Molecular Ecology Notes, v. 6, p. 288-295, 2006.

PEÑALOZA, E.M.C. et al. Chemical composition variability in the *Uncaria tomentosa* (cat's claw) wild population. **Química Nova**, v.38, n. 3, p.378-386, 2015.

PENG, L. et al. Genetic diversity assessment of germplasm collection of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. based on morphology, ISSR and SRAP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 84-92, 2014.

PEREIRA, R.C.A. et al. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento in vitro de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (Unha-de-gato). **Ciências Agrotécnica**. Lavras, v.30, n.4, p. 637-642, 2006.

PEREIRA, R.C.A.; LOPES, J.V.M. **Aspectos botânicos, etnobotânicos, agronômicos e fitoquímicos de unha-de-gato.** Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 105. 2006, 34p.

PILARSKI, R. et al. Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. **Phytomedicine**, v.17, p.1133-1139, 2010.

PILARSKI, R. et al. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.18-23, 2007.

PIMENTA, J. **Ashaninka, Enciclopédia Povos Indígenas no Brasil.** ISA (Instituto Sócio Ambiental). Acesso em 10 out. 2012. Disponível em: <http://www.socioambiental.org/pib/epi/ashaninka/nome.shtm>.2005.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of populations structure using multilocus genotype data. **Genetics Society of America**, v.155, p.945-959, 2000.

PUBMED. Acesso em 12 Dez. 2014. Disponível em <
<http://www.gopubmed.com/web/gopubmed/>>.

QUEROL, D. **Recursos genéticos, nosso tesouro esquecido: abordagem técnica e socioeconômica**. Rio de Janeiro: AS-PTA-Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 206p, 1993.

QUEVEDO, G.A. **Silvicultura y manejo de la “uña de gato”**. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana-IIAP. Pucallpa: Peru, 1995.43p.

QUIROZ, J.D.Z. **Nuevos aspectos en el estudio agronómico y fitoquímico de las dos espécies peruanas del gênero *Uncaria*: *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. y la *Uncaria guianensis* (Aubl)**. Gmel-Uña de Gato. 2004. Acesso em 21 out.2014. Disponível em <<http://www.agroselva.com>>.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, austria, 2015. ISBN 3-9000051-07-0, Disponível em : <http://www.R-project.org/>. Acesso em 08 dez.2015.

REINHARD, K.H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.: Cat'sclaw, uña de gato or seventaro. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.5, p.143-151, 1999.

ROBARTS, D. W. H.; WOLFE, A. D. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology. **Applications in Plant Sciences**, v.2, n.7, p.1-13, 2014.

ROJAS-DURAN, R. et al. Anti-inflammatory activity of Mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v.143, p. 801-804, 2012.

ROUSSET, F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. **Genetics**, v. 145, p. 1219-1228, 1997.

RUTTER, A.R. **Catálogo de Plantas Útiles de la Amazonía Peruana**. Ministerio de Educación – Instituto Linguístico de Verano. Yarinacocha, Pucallpa, Perú, 1990.

SANDES, A. R. R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. In: **Biotecnologia ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, ano 2, n.13, p.28-32, 2000.

SCHULTES, R.E.; RAFFAUF, R. F. The healing forest medicinal and toxic plants of the Northwest Amazonia. **Historical, Ethno and Economic Botany Series**. Dioscórides: Press-Portland, v.2. p.401-403, 1990.

SCHUMANN, C. Rubiaceae: MARTIUS, C.F.P. von; EICHLER, A.G; URBAN, I. Ed. Flora Brasiliensis. v.6, n.6, Lipsiae. Fried. Fleischer, p.329-340, 1889.

SEOANE, C. E. S. et al. Efeitos da fragmentação florestal em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. **Scientia Florestalis**, n.57, p. 123-139, 2000.

- SHENG Y, et al. An active ingredient of Cat's Claw water extracts Identification and efficacy of quinic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.577–584. 2005.
- SHENG Y, et al. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation on human tumor cells treated with extract of *Uncaria tomentosa*. **Anticancer Research**, v.18, p.3363-3368. 1998.
- SHI, Z. et al. Neuroprotective effects of aqueous extracts of *Uncaria tomentosa*: Insights from 6-OHDA induced cell damage and transgenic *Caenorhabditis elegans* model. **Neurochemistry International**, v.62, p.940-947, 2013.
- SILVA, M. S. et al. Association of loganin contents with the genetic characterization of natural populations of *Palicourea rígida* Kunth determined by AFLP molecular markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.51, p.189-194, 2013.
- SILVA, M.C. et al. Estimativa do rendimento de casca de unha-de-gato (*Uncaria tomentosa* (Wild. ex Roem. & Schult)) na regional do Juruá, Acre. In: SEMINÁRIO DO PROJETO KAMAKAIA MANEJO SUSTENTÁVEL DE PRODUTOS FLORESTAIS NÃO MADEIREIROS NA AMAZÔNIA. 2008. Rio Branco, Acre. **Anais...** Embrapa Acre, 2008.
- SILVA, S. R. et al. **Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio**. Brasília: TRAFFIC, 63p, 2001.
- SIRACUSA, L. et al. Agronomic, chemical and genetic variability of saffron (*Crocus sativus* L.) of different origin by LC-UV-vis-DAD and AFLP analyses. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, n. 2, p. 711-721, 2013.
- SLATKIN, M. **Gene flow and population structure**. In: Ecological Genetics, Editado por L. Real. Princeton, 1994.
- SMOUSE, P. E. et al. Multiple Regression and Correlation Extensions of the Mantel Test of Matrix Correspondence. **Systematic Zoology**, v. 35, n. 4, p. 627-632, 1986.
- SMOUSE, P. E. et al. Two-Generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. **Evolution**. Lawrence, v.55, n.2, p.260-271, 2001.
- SOARES-FILHO, B. S. et al. Modelling conservation in the Amazon basin. *Nature*. 2006. 440, 520–523.
- SOUKUP, J. **Vocabulario de los nombres tradicionales de la Flora Peruana y catálogo de los géneros**, Editorial Salesiana, Lima: Peru, 1987.
- SOUZA, A.V. **Bioteecnologia para conservação “ex-situ” de plantas medicinais do cerrado**. 2006. 218f. Tese (Doutorado em Agronomia-Horticultura). Curso de Pós Graduação em Agronomia-Horticultura. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

SPIEGELFELD, C. **Cat's claw herbal remedy**. Trade & Environmental Database (TED) Case Studies. v.15, n.1, 2006. Disponível em: <<http://www.american.edu/ted/cats-claw-htm>>. Acesso em 27 mai. 2015.

STRUM, S. et al. ***Uncaria tomentosa*-Wurzelrinde**. In: **Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis**, edited by Blaschek, W.R. et al. (Germany: Springer-Verlag), v.2., p.706-710.1999.

TEIXEIRA, A. S. et al. Esterases no exame da estrutura populacional de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae). **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 89-96, 2004.

TEMPLETON, A. R. **Genética de populações e teoria microevolutiva**. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. SBG, 705 p. 2011.

TEPPNER, H. et al. Kariosystematik von *Uncaria tomentosa* und *Uncaria guianensis* Botanisches aus Pozuzo, Perú I. **Phyton**. v. 24, n. 1, p. 125-134, 1984.

TER STEEGE, H. et al. Estimating the global conservation status of more than 15,000 Amazonian tree species. *Sci. Adv.* 2015; 1, 1-10.

TORREJÓN, G. D. **Uña de gato y producción sostenible**. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina, 1997. 138 p.

TORREJÓN, G.D. Alkaloids content in bark of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC from different habitats in the region Ucayali – Perú. **Revista da Sociedade de Química**. v76, n.3 p. 271-278. 2010.

TORREJÓN, G.D.; QUILIANO, A.C. Crecimiento de um clon de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. en cuatro condiciones de hábitat en la cuenca del río Aguaytía, Ucayali, Perú. **Ecología Aplicada**. v. 6, n. 1,2, p.39-46, 2007.

USPTO, 2015. **United States Patent and Trademark Office**. Disponível em: <<http://search.uspto.gov/search?query=Uncaria&op=Search&affiliate=web-sdmg-uspto.gov>>. Acesso em 27 mai. 2015.

VALENTE, L.M.M. et al. Kaempferitrin from *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) and its Potential as a Chemical Marker for the Species. **Journal Brazilian Chemistry Society**. v.20, n.6, p.1041-1045, 2009.

VALENTE, L.M.M. Unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.]: Um panorama sobre seus aspectos mais relevantes. **Revista Fitos Eletrônica**. v. 2, n.1, 2006.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma in vitro. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n.3, v.14, 2000. p.18-20.

VILCHES, L.E.O. **Género *Uncaria*- Estudios botánicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis***. Lima-Perú, 1997. 3 ed.

- VOLPATO, A.M.M. **Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (ASTERACEAE) para seu emprego como fitoterápico.** 2005. 137f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração em Química Orgânica) – Curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná.
- WANG, Z. et al. Assessment of genetic diversity in *Galega officinalis* L. using ISSR and SRAP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.59, p. 865-873, 2012.
- WHO- Medicinal Plants Monographs (red. Blumenthal M), Herbal Gram, v.40, n.38, 1997.
- WHO- World Health Organization. Draft WHO guidelines on safety monitoring and pharmacovigilance of herbal medicines. Amsterdam: World Health Organization. 2003.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations.** London: Editora The University of Chicaco Press, 613p. 1978.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annual of Eugenics**, v.15, p.313-354. 1951.
- XUE, D. et al. The linkage maps of *Dendrobium* species based on RAPD and SRAP markers. **Journal of Genetics and Genomics**, v.37, p. 197-204, 2010.
- YEBOAH, M. A. et al. A genetic linkage map of cucumber (*Cucumis sativus* L.) combining SRAP and ISSR markers. **African Journal of Biotechnology**, v.6, p. 2784-2791, 2007.
- YIN, Y. G. et al. Genetic diversity of *Pleurotus pulmonarius* revealed by RAPD, ISSR and SRAP fingerprinting. **Current Microbiology**, v. 68, p. 397-403, 2014.
- YOUSSEF, M. et al. Musa genetic diversity revealed by SRAP and AFLP. **Molecular Biotechnology**, v. 47, p. 189-199, 2011.
- ZAEFIZADEH, M. et al. Diversity and relationships among durum wheat landraces (subconvars) by SRAP and phenotypic marker polymorphism. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 960-966, 2009.
- ZEVALA, A.; ZAVALLOS, P.P. **Taxonomía, distribución geográfica y status del Género *Uncaria* em el Perú.** Lima: 1996, 103p.
- ZEVALLOS, P.P.; LOMBARDI, I.; BERNAL, Y. Agrotecnología para el cultivo de la uña de gato o bejuco de agua. In: MARTÍNEZ, J.V.; BERNAL, H.J.; CÁCERES, A. Fundamentos de agrotecnología para el cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas. Santafé de Bogotá. **Ciencia y Tecnología para el Desarrollo**, 2000, p-463-492.
- ZEVALLOS-POLLITO, P.A; TOMAZELLO FILHO, M. Levantamento e caracterização de duas espécies do gênero *Uncaria* schreb. (Rubiaceae) correntes no Estado do Acre, Brasil. **Ecologia aplicada**. v. 9, n.1, p. 19-30, 2010.

ZHANG, F. et al. Genetic analysis and associated SRAP markers for flowering traits of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). **Euphytica**, v. 177, p. 15-24, 2011a.

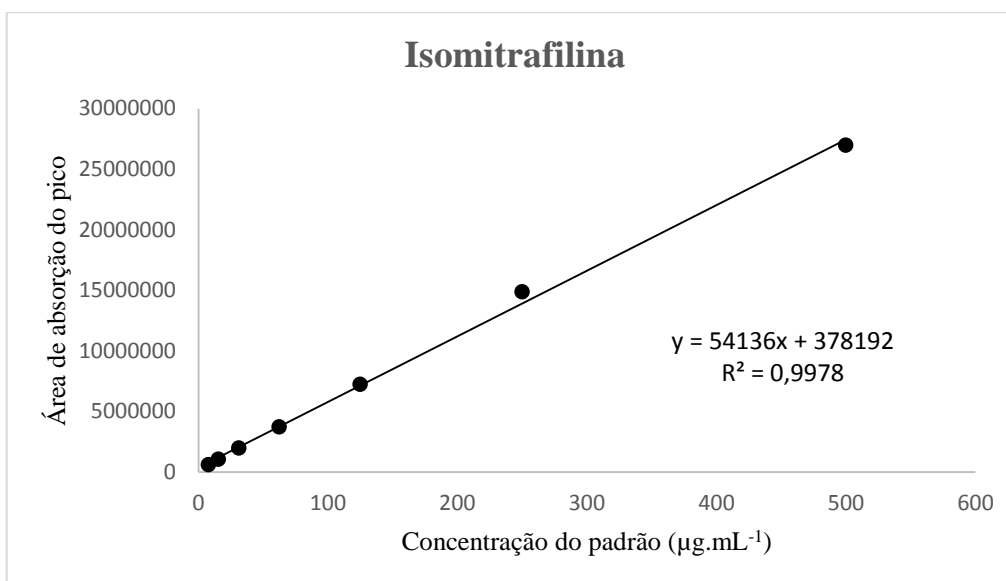
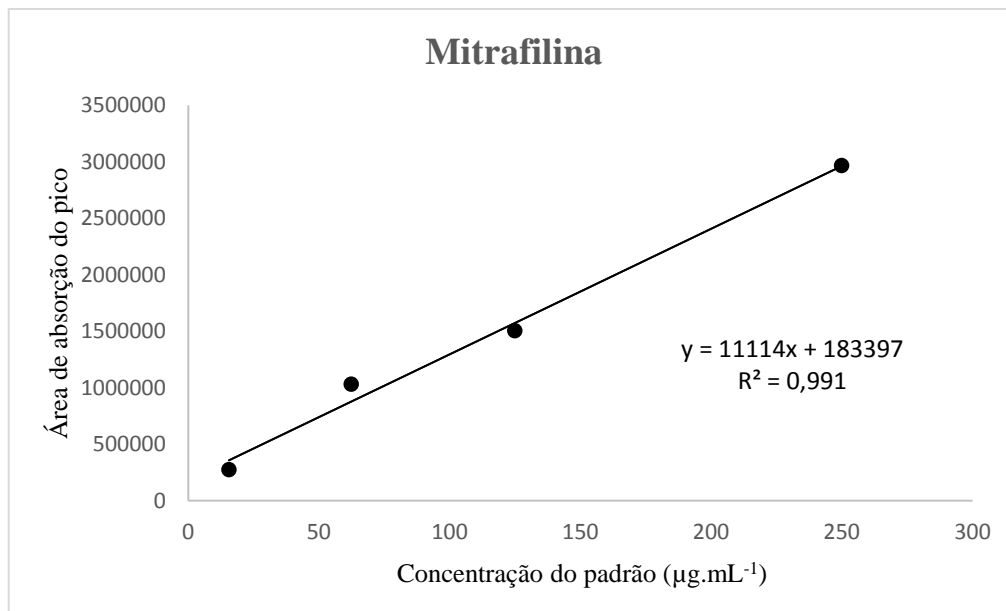
ZHANG, F. et al. SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*). **Molecular Breed**, v. 27, p. 11-23, 2011b.

ZHANG, G. et al. Medicinal uses phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 173, p. 48-80, 2015.

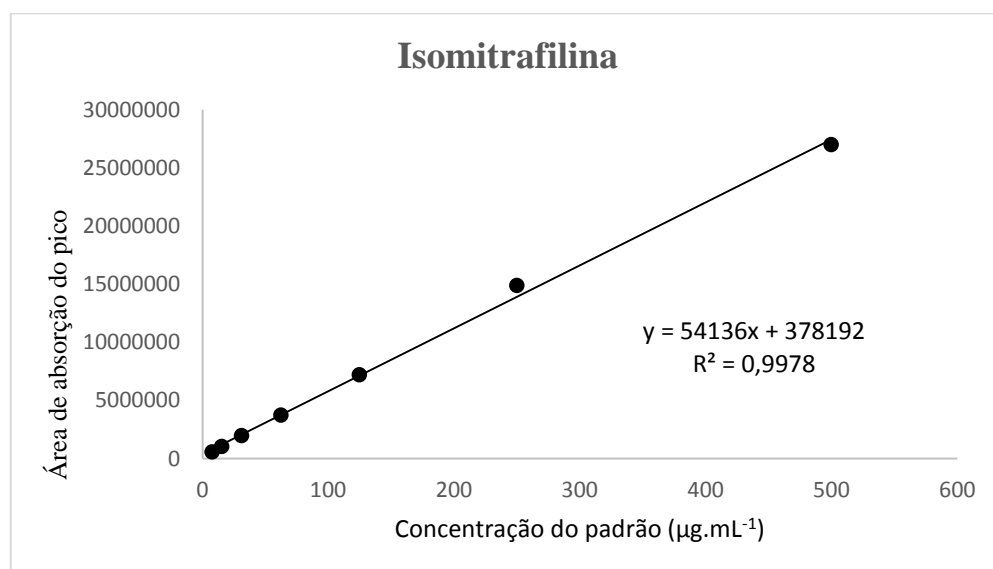
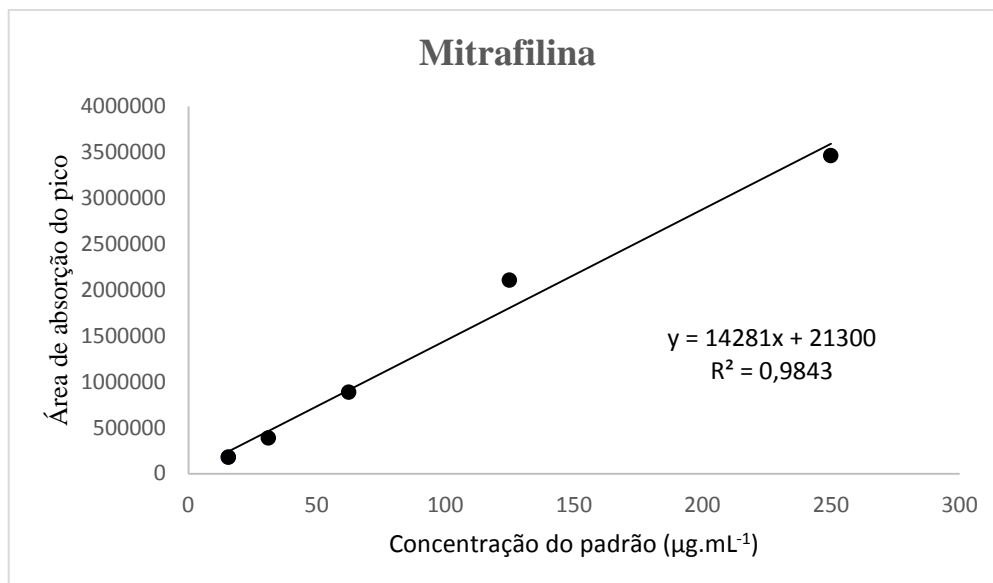
ZHANG, W. et al. Construction of a high density integrated genetic map for cucumber (*Cucumis sativus* L.) **Theor Appl Genet**, v. 124, p. 249-259, 2012.

ZHUCCI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. Tese (Doutorado). Escola superior de Agroicultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 148f. 2002.

10. APÊNDICE

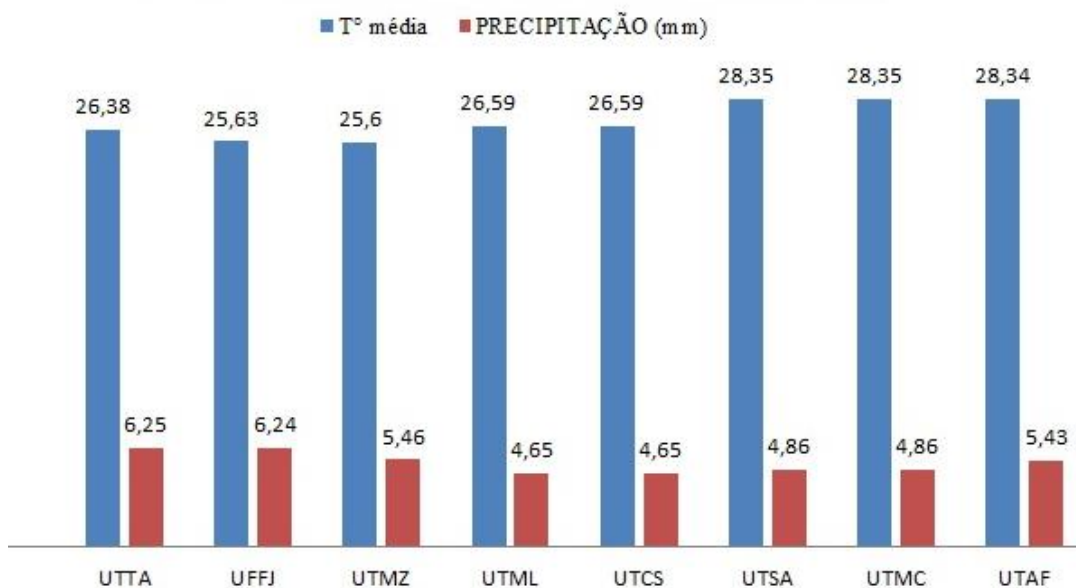


Apêndice 1. Curvas dos padrões de alcaloides oxindólicos Mitrafilina e Isomitrafilina utilizados para quantificar a espécie *Uncaria tomentosa*.



Apêndice 2. Curvas dos padrões de alcaloides oxindólicos Mitrafilina e Isomitrafalina utilizados para quantificar a espécie *Uncaria guianensis*.

Temperatura (°C) e precipitação média (mm) dos municípios nos seis meses que antecederam a coleta de *U. tomentosa*



Apêndice 3. Temperatura e precipitação média dos municípios nos seis meses que antecederam a coleta de *Uncaria tomentosa*. UTTA: Tarauacá-AC; UTFJ: Feijó-AC; UTMZ: Mazagão-AP; UTML: Mâncio Lima-AC; UTCS: Cruzeiro do Sul-AC; UTSA: Santana-AC; UTMC: Macapá-AP; UTAF: Afuá-PA. **Fonte:** Agritempo.

Temperatura (°C) e precipitação média (mm) dos municípios nos seis meses que antecederam a coleta de *U. guianensis*

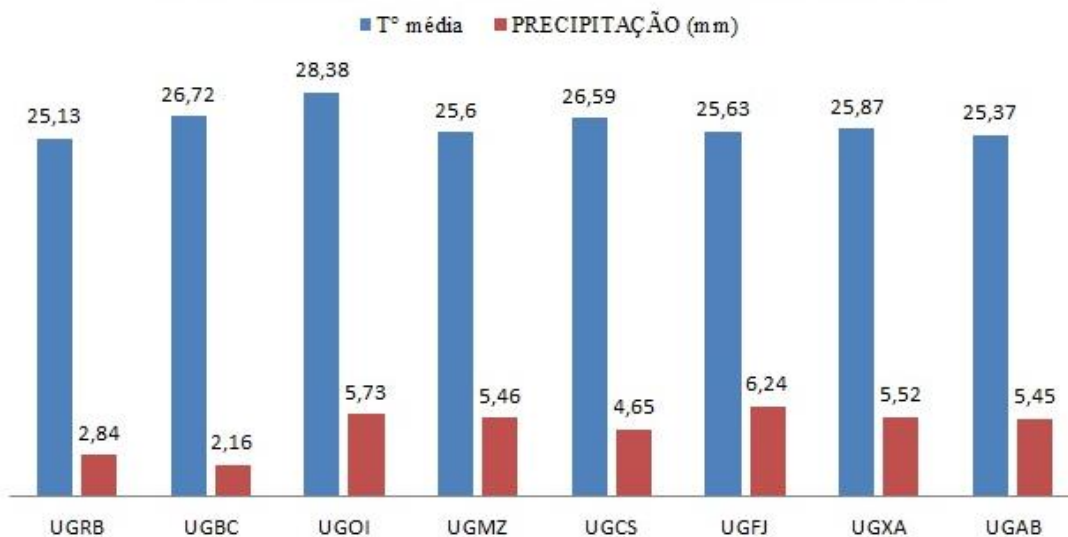


Figura 23. Temperatura e precipitação média dos municípios nos seis meses que antecederam a coleta de *Uncaria guianensis*. UGRB: Rio Branco-AC; UGBC: Boca do Acre-AM; UGOI: Oiapoque-AP; UGMZ: Mazagão-AP; UGCS: Cruzeiro do Sul-AC; UGFJ: Feijó-AC; UGXA: Xapuri-AC; UGAB: Assis Brasil-AC. **Fonte:** Agritempo.