

Universidade de Ribeirão Preto

UNAERP

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

GUSTAVO HENRIQUE TEIXEIRA PINTO

Banco de germoplasma *in vitro*, seleção e conservação de plântulas de *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F. GMEL produtoras de alcaloides oxindólicos pentacíclicos

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira

Coorientadora: Profa. Dra. Bianca Waléria Bertoni

RIBEIRÃO PRETO

Junho 2020

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

P659b Pinto, Gustavo Henrique Teixeira, 1987-
Banco de germoplasma *in vitro*, seleção e conservação de
plântulas de *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F. GMEL produtoras de
alcaloides oxindólicos pentacíclicos / Gustavo Henrique Teixeira
Pinto. - - Ribeirão Preto, 2020.
53 f.: il. color.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2020.

1. Conservação - Cultura de tecido. 2. Isomitrafalina.
3. Marcador SCoT. 4. Mitrafalina. 5. Unha de gato. I. Título.

CDD 660

GUSTAVO HENRIQUE TEIXEIRA PINTO

**BANCO DE GERMOPLASMA *IN VITRO*, SELEÇÃO E CONSERVAÇÃO DE
PLÂNTULAS DE *Uncaria guianensis* (AUBL.) J.F. GMEL PRODUTORAS DE
ALCALOIDES OXINDÓLICOS PENTACÍCLICOS**


Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de
Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

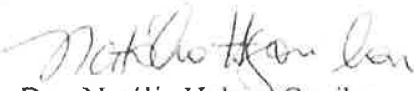
Data da defesa: 26 de junho de 2020

Resultado: Aprovado


BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Dra. Natália Helena Gavilan
EmergeAgro



Profa. Dra. Silvia Helena Taleb Contini
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO
2020**

RESUMO

A espécie *Uncaria guianensis*, originária da Amazônia, é uma planta da família *Rubiaceae*, conhecida como unha de gato que apresenta como ação principal a atividade anti-inflamatória. Essa planta ainda não foi domesticada e toda coleta é realizada no ambiente natural de modo extrativista, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias de conservação e cultivo sustentável da mesma. Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer o banco de germoplasma *in vitro* e genotipar plântulas de *U. guianensis* selecionadas quanto a produção de alcaloides oxindólicos. Para o desenvolvimento deste estudo, 20 genótipos advindos de cinco estados brasileiros foram introduzidos *in vitro*. Foi avaliado o efeito dos meios de cultura MS, WP e SH, além de quatro concentrações de BAP (0; 2,2; 4,4; 11 e 22 μM) no crescimento e número de gemas do caule. A variabilidade genética foi estudada utilizando marcador SCoT (Start Codon Targeted) e as análises químicas foram realizadas por CLAE-DAD e CLUE. Os explantes que cresceram nos meios MS e WP não diferiram entre si e a concentração de 4,4 $\mu\text{M.L}^{-1}$ de BAP apresentou melhores resultados quanto ao crescimento. Os nove primers utilizados geraram 201 bandas, sendo 187 polimórficas, a similaridade genética variou de 32 a 78 % e a análise por UPGMA agrupou os indivíduos em 4 grupos. Além disso, foi demonstrado a formação de dois grupos gênicos. A produção dos alcaloides oxindólicos mitrafilina e isomitrafilina permitiu classificar os vinte indivíduos em três grupos com teores alto, médio e baixo, e houve uma correlação positiva de 97 % entre os dois alcaloides quantificados. A identificação de outros alcaloides, além da mitrafilina e isomitrafilina, permitiu separar os genótipos em 4 grupos distintos. A conclusão deste trabalho é que indivíduos selecionados apresentam considerável base genética e ampla diversidade de alcaloides, sendo, portanto, uma coleção representativa da espécie e apropriada para a multiplicação em escala podendo atender demandas específicas da indústria farmacêutica e de programas de Farmácia Viva.

Palavras-chave: Conservação, cultura de tecido, isomitrafilina, marcador SCoT, mitrafilina, *Rubiaceae*, unha de gato.

Abstract

The species *Uncaria guianensis* known in Brazil as *unha de gato* (cat's claw) is a Rubiaceae species native to Amazon and popularly used for exhibiting anti-inflammatory activity. Since *U. guianensis* is not domesticated, it is indispensable to develop strategies for its conservation and sustainable cultivation, because it has been collected in an extractive manner in its natural habitat. Based on that, the objective of this work was to select *U. guianensis* genotypes containing high levels of oxindole alkaloids and establish an *in vitro* germplasm bank of the species. Explants from 20 accessions collected in 5 states of Brazil were inoculated on MS, WP and SH culture media, containing different concentrations of BAP (0; 2.2; 4.4; 11 and 22 μM) to evaluate growth and number of buds on the stem. The genetic variability of the accessions was verified using molecular marker SCoT (Start Codon Targeted) and their chemical profile was determined by HPLC-DAD and UFLC-DAD. Plantlets cultured in MS and WP media did not show significant difference from each other and the concentration of 4.4 $\mu\text{M.L}^{-1}$ of BAP induced higher proliferation of seedlings. The nine different primers used to identify the genotypes generated 201 bands, 187 of which were polymorphic and the genetic similarity determined by the UPGMA grouping method ranged from 32 to 78% and brought the individuals into four groups. In addition, it was observed the formation of two gene groups. The production of the oxindole alkaloids mitrafilina and isomitrafilina in the twenty investigated individuals allowed distributing them in three different groups according to high, medium and low levels of production of alkaloids and there was a positive correlation of 97% between the two alkaloids quantified. The identification of other alkaloids, besides mitrafilina and isomitrafilina, allowed separating the genotypes in four distinct groups. Obtained results permit us to conclude that the individuals selected for the *in vitro* germplasm bank have a considerable genetic basis and a wide range of alkaloids, thus being a representative collection of the species, appropriate for multiplication on a scale capable of meeting specific demands of the pharmaceutical industry and of Living Pharmacy Programs.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphisms
ANOVA	Análise de Variância
BAP	6-B-Benziaminopurina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
GPS	Global Position System
MS	Meio de Cultura Murashige e Skoog
PCoA	Análise de Coordenadas Principais
PCR	Reação da Cadeia de Polimerase
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms
SCoT	Start Codon Targeted
SH	Schenk e Hildebrandt
WP	Wood Plant Media

LISTAS DAS TABELAS

Tabela 1- Alcalóides encontrados em <i>Uncaria guianensis</i>	12
Tabela 2- Tabela com nomes da cidade e as coordenadas do GPS das coletas das sementes de <i>Uncaria guianensis</i>	19
Tabela 3 - Sequência dos 36 primers testados para SCoT em <i>Uncaria guianensis</i> ..	23
Tabela 4- Efeito dos meios de culturas MS (Murashige e Skoog), WPM (Wood Plant Medium) e SH (Schenk e Hildebrant) no desenvolvimento de explantes de <i>Uncaria guianensis</i>	27
Tabela 5 - Número de bandas e polimorfismo obtidos em cada primers em <i>Uncaria guianensis</i>	29
Tabela 6 - Matriz de similaridade obtida pela distância genética de Jaccard entre 20 genótipos e <i>Uncaria guianensis</i>	33
Tabela 7 - Teor de mitrafilina e isomitrafilina em genótipos de <i>Uncaria guianensis</i> mantidos <i>in vitro</i>	35
Tabela 8 - Grupos de indivíduos formados por alcaloides majoritários mantidos <i>in vitro</i> de <i>Uncaria guianensis</i>	39
Tabela 9 - Alcaloides presentes nos vinte genótipos de <i>Uncaria guianensis</i> mantidos <i>in vitro</i>	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Países onde ocorre <i>Uncaria guianensis</i>	10
Figura 2 - Parte aérea e flor de <i>Uncaria guianensis</i>	11
Figura 3- Mapa contendo os municípios das coletas	18
Figura 4 - Seleção dos indivíduos de <i>Uncaria guianensis</i> para análise da diversidade genética.....	21
Figura 5- Ilustração da metodologia de extração de DNA de <i>Uncaria guianensis</i>	22
Figura 6. Estruturas dos alcaloides mitrafilina e isomitrafilina	24
Figura 7- Efeito de diversas concentrações de 6-Benzylaminopurine (BAP) na altura e número de gemas em explantes de <i>U. guianensis</i>	28
Figura 8 - Dendograma obtido pela distância genética de Jaccard e pelo método de argumento de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) em indivíduos de <i>Uncaria guianensis</i>	31
Figura 9- Gráfico de dispersão de análise em coordenadas principais (PCoA) em indivíduos de <i>Uncaria guianensis</i> chamara a figura 9 no texto	32
Figura 10 - Grupos gênicos dos indivíduos de <i>Uncaria guianensis</i> analisados através do programa STRUCTURE. A mesma cor para genótipos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo genético	34
Figura 11 - Análise de agrupamento para teor de mitrafilina e isomitrafilina em <i>Uncaria guianensis</i> com formações de grupos com alto, médio e baixo teores de mitrafilina e isomitrafilina.	36
Figura 12 - Correlação entre a produção de mitrafilina e isomitrafilina	37
Figura 13 - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos e de massas (CLUE-EM) dos padrões de mitrafilina (A), isomitrafilina (B) e extrato metanólico de <i>U. guianensis</i> (C)	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	10
2.2 BOTÂNICA.....	11
2.3 FITOQUÍMICA	12
2.4 MARCADORES MOLECULARES	13
2.5 MICROPROPAGAÇÃO E BANCO DE GERMOPLASMA.....	14
2.6 FARMACOLOGIA.....	16
3 HIPOTESE.....	17
4 JUSTIFICATIVA	17
5 OBJETIVO.....	17
6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
7 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
7.1 COLETA DE SEMENTE EM ÁREAS DE OCORRÊNCIA NATURAL DA ESPÉCIE.	18
7.2 INTRODUÇÃO DE SEMENTES <i>IN VITRO</i>	19
7.3 EFEITO DO MEIO DE CULTURA E CONCENTRAÇÕES DE BAP NO DESENVOLVIMENTO DOS EXPLANTES	20
7.4 SELEÇÃO DE GENÓTIPOS PARA AVALIAÇÃO GENÉTICA E QUÍMICA.....	20
7.5 EXTRAÇÃO DE DNA.....	21
7.6 REAÇÃO DE PCR	22
7.7 ANÁLISE COM MARCADOR SCOT.....	23
7.8 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ALCALOIDES OXINDÓLICOS PENTACÍCLICOS (AOP) MITRAFILINA E ISOMITRAFILINA.....	24
7.9 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS E DE MASSAS (CLUE-EM).....	25
7.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	26

8 RESULTADOS	27
8.1 BANCO DE GERMOPLASMA	27
8.2 AVALIAÇÃO DE MEIO DE CULTURA BASAL E CONCENTRAÇÕES DE BAP	27
8.3 DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA.....	28
9 CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICE.....	48

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade vegetal do planeta, com grande potencial para descoberta de espécies produtoras de compostos bioativos úteis. Entretanto, com o aumento do desmatamento dos biomas brasileiros, centenas de espécies têm sido expostas a erosão genética e ao risco de extinção.

Entre as espécies vulneráveis encontra-se *Uncaria guianensis*, conhecida popularmente como “Unha de Gato”, pertencente à família *Rubiaceae*. É encontrada na região amazônica de países da América do Sul, sendo ainda coletada de forma extrativista, o que justifica o desenvolvimento de estratégias de conservação e produção em larga escala da espécie.

A espécie *U. guianensis* é utilizada no tratamento de artrite reumatoide e outros processos inflamatórios, sendo que os alcaloides oxindólicos pentacíclicos (AOP), em especial mitrafilina e isomitrafilina, estão relacionados com estas atividades terapêuticas.

O teor destas substâncias é discrepante em indivíduos que crescem em ambientes naturais, o que pode interferir no efeito farmacológico de medicamentos obtidos a partir de *U. guianensis*. Assim, é necessário padronizar e selecionar genótipos de interesse para garantir a qualidade, eficácia e segurança de fitoterápicos produzidos a partir dessa espécie.

O presente trabalho tem como objetivo estabelecer o banco de germoplasma *in vitro* e genotipar plântulas de *U. guianensis* selecionadas quanto a produção de AOP, assegurando desta forma a acessibilidade à variabilidade genética da espécie. Assim, o marcador molecular SCoT (*Start Codon Targeted*), bem como técnicas de cultura de tecido vegetal e de química analítica foram utilizados para avaliar a diversidade genética, o potencial de propagação e a diversidade química dos alcaloides em genótipos introduzidos *in vitro* a partir de populações naturais.

Este trabalho permitiu a identificação de genótipos elites que poderão ser multiplicados em escala, para atender a demanda da indústria farmacêutica e programas de fitoterapia, como as farmácias vivas.

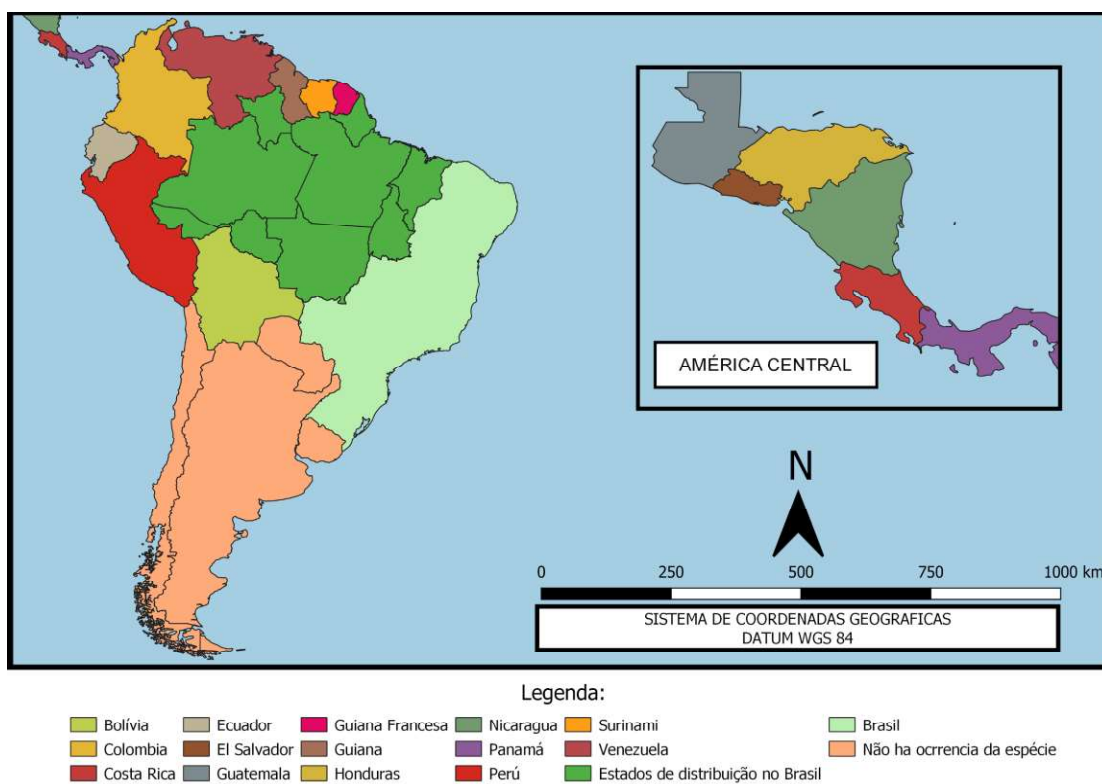
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A espécie *U. guianensis* ocorre no bioma Amazônia, é encontrada na América do Sul nos países Bolívia, Equador, Venezuela, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname, Brasil e também em alguns países da América Central como Costa Rica, Panamá, Guatemala, Nicarágua e Honduras (VILCHES, 1997) (FIGURA 1). Cresce em bordas de florestas primárias, florestas secundárias, beiras de rios e principalmente igarapés (ZEVALLLOS-POLLITO; TOMAZELLO FILHO, 2010).

No Brasil essa espécie está distribuída nos estados de Roraima, Rondônia, Acre, Amazonas, Mato Grosso, Tocantins, Maranhão, Amapá e Pará (HONÓRIO et al., 2016).

Figura 1– Países onde ocorre *Uncaria guianensis*



2.2 BOTÂNICA

O gênero *Uncaria* pertence à família *Rubiaceae* apresenta três sinônimos que são: *Agylophora* Neck, *Ouroparia* Aubl e *Urupara* Raf (<http://tropicos.org/Name/40021558?tab=synonyms>). A espécie *U. guianensis* foi descrita pela primeira vez pelo botânico Jean Bastiste Churistophe Fresée Aublet, em 1775 nas Guianas com nome de *Ouroparia guianensis*, e em 1791 seu nome botânico foi alterado para *U. guianensis*, pelo botânico Joharm Friedrich Gmelin (VILCHES, 1997). Os nomes populares mais encontrados na literatura são: Unha de gato, Uña de gato, Cat's claw, Gabarato colorado, Tambor huasca e Paraguayo (VILCHES, 1997).

A propagação de *U. guianensis* pode ser realizada por sementes, estacas e micropropagação (GUEVARA, 1995, PEREIRA et al., 2006).

Essa espécie é uma liana lenhosa que chega a 30 metros de altura, apresenta espinhos em forma de chifre de carneiro, que não facilita a adesão em outras plantas (FIGURA 2). O diâmetro de tronco das plantas adultas pode variar entre 10 a 30 cm. Suas folhas são ovaladas e elípticas e oscilam de 6 a 12 cm, com cor verde brilhante na parte superior da folha, e as flores ocorrem com pigmentação vermelha e amarela (VILCHES, 1997).

Figura 2 - Parte aérea e flor de *Uncaria guianensis*.



Fonte: Ana Maria Soares Pereira

2.3 FITOQUÍMICA

Vários trabalhos fitoquímicos foram realizados com *U. guianensis* e diversos alcaloides foram identificados como descrito na Tabela 1. Além dessas substâncias, também foram identificados o flavonoide kaempferitrina, dihidrokaempferol, kaempferol (ALVAREZ et al., 1988; LAUS, KEPLINGER, 2003; VALENTE et al., 2009), flavonol catequina, epicatequina e epigalocatequina (SANDOVAL et al., 2002), β -sitosterol, estigmasterol e ester etílico de fenoforbida (RODRIGUEZ et al., 2011), ácido quinovico 3 β -O- β -D-quinovopiranoside, ácido quinovico 3 β -O- β -D-fucopiranoside, ácido quinovico (27-1)- β -D-glucopiranosilester, ácido quinovico (28-1)- β -D-glucopiranosilester (YÉPEZ et al., 1991; LAUS, KEPLINGER, 2003; LAUS, 2004; VALENTE et al., 2009, Zhang et al., 2014), ácido clorogênico e ácido quinico (HERNANDES et al., 2020)

Tabela 1- Alcaloides encontrados em *Uncaria guianensis*

ALCALOIDES OXINDOLICOS				ALCALOIDES INDOLICOS	
Pentacíclicos	Referências	Tetracíclicos	Referências	Alcaloides	Referências
Mitrafilina	Penaloza et al.: 2014; Kaiser et al.: 2013; Laus, Keplinger, 2003; Laus, 2004; Carbonezi et al., 2004; Reinhard, 1999; Lavault; Moretti; Bruneton, 1983	Rinchofilina	Penaloza et al.: 2014; Kaiser et al.: 2013; Laus, Keplinger, 2003; Reinhard, 1999	Angustolina	Heitzman et al., 2005; Zhang et al., 2014.
Isomitrafilina	Penaloza et al.: 2014; Kaiser et al.: 2013; Laus, Keplinger, 2003; Carbonezi et al., 2004; Reinhard, 1999; Lavault; Moretti; Bruneton, 1983	Isorinchofilina	Penaloza et al.: 2014; Kaiser et al.: 2013; Laus, Keplinger, 2003; Reinhard, 1999	Hirsutina	Heitzman et al., 2005; Zhang et al., 2014.
Especiofilina	Penaloza et al.: 2014; Kaiser et al.: 2013; Reinhard, 1999; Lavault; Moretti; Bruneton, 1983			Dihidro-corinantheina	Heitzman et al., 2005; Zhang et al., 2014. . Continua...
Especiofilina	Penaloza et al.: 2014; Kaiser et al.: 2013; Reinhard, 1999; Lavault; Moretti; Bruneton, 1983			Corinoxeina	Laus, Keplinger, 2003
Uncarina F	Penaloza et al.: 2014; Kaiser et al.: 2013; Reinhard, 1999			Isocorinoxeina	Laus, Keplinger, 2003
Pteropodina	Penaloza et al.: 2014; Kaiser et al.: 2013; Reinhard, 1999; Lavault; Moretti; Bruneton, 1983				
Isopteropodina	Penaloza et al.: 2014; Kaiser et al.: 2013; Reinhard, 1999				

2.4 MARCADORES MOLECULARES

Estudos de biologia molecular realizados a partir da implantação da tecnologia do DNA recombinante e das reações em cadeia da polimerase (PCR) estabeleceram marcadores moleculares como: RAPD, AFLP, Microssatélite e SCoT (SOUZA, 2015; FALEIROS, 2007; COLLARD; MACKILL, 2008).

Um dos marcadores mais utilizados é o RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) que utiliza sequência de primers com cerca de 10 pares de bases, que se anelam de forma randômica, pois não existe uma sequência alvo para ser amplificada. As principais aplicações desse marcador são: *fringerprint* e diversidade genética (KUMARI; THAKUR 2014).

Outro tipo de marcador conhecido é o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) que apresenta expressão codominante, utiliza enzimas de restrição para identificar alto número de *locus* polimórficos e abrange todo o genoma. As principais aplicações são: análise filogenética, *fringerprint*, mapeamento genético e avaliação da diversidade genética (SOUZA, 2015; FALEIROS, 2007).

Outro marcador importante é o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) por ser uma combinação de RFLP e PCR. A principal vantagem dessa técnica é a detecção de altos níveis de polimorfismo gerado pelas diferenças entre genótipos, o que permite avaliar a variabilidade genética em nível de DNA. Esse tipo de marcador utiliza enzimas de restrição e adaptadores específicos, sendo suas principais aplicações o mapeamento genético e o estudo da diversidade genética (HUANG et al., 2019).

Outro marcador conhecido é o Microssatélite, essa técnica foi estabelecida a partir de sequências curtas de DNA, ligadas por *tanden*, essas sequências se repetem e não passam de 1 a 8 pares de bases e seus primers são específicos. A principal vantagem deste tipo de marcador é ser co-dominante, que fornece, ao contrário de marcadores dominantes, a informação genética completa. As principais aplicações são: *fringerprint*, mapeamento genético e diversidade genética (CARDENAS et al., 2018).

O marcador SCoT (*Start Codon Targeted*) utiliza 36 primers diferentes onde são anelados em regiões específicas do DNA, é mais reprodutível que o RAPD.

Essa técnica foi desenvolvida em pequenas regiões de genes de plantas a partir do códon inicial de tradução ATG. O marcador SCoT utiliza a reação de PCR, sendo de fácil utilização e de baixo custo em relação a outros marcadores mencionados anteriormente. Suas principais aplicações são: análise de diversidade genética e testes em uma população Backcross, análise da estrutura da população e manejo efetivo de recursos genéticos em banco de germoplasma (COLLARD; MACKILL, 2008; SATYA et al. 2015; ETMINANA et al., 2016).

O marcador SCoT tem sido uma ferramenta molecular útil na investigação de diversidade genética de populações naturais e de bancos de germoplasma (SHEKHAWAT ET AL., 2018; TALEBI et al., 2018; AGARWAL et al., 2019; RAJESH, 2016).

Esse marcador é uma técnica simples e inovadora que pode ser facilmente utilizada em programas de melhoramento de planta (ABOULILA; MANSOUR, 2017).

2.5 MICROPROPAGAÇÃO E BANCO DE GERMOPLASMA

A micropropagação é uma técnica que permite produzir em escala plantas a partir de segmentos nodais, meristemas apicais ou radiculares, folhas e sementes, os quais são chamados de explantes. Com essa técnica é possível regenerar em uma nova planta a partir de segmentos vegetais introduzidos em meios de cultura com ou sem a presença de fitorreguladores (VEIGA, 2008, CARVALHO; VIDAL, 2003; LIMEIRA et al. 2000).

A escolha de explantes é uma parte importante no processo de introdução *in vitro*, o tecido vegetal deve ter ótima condição fitossanitária, não apresentar deficiência hídrica e/ou nutricional, além disso em caso de plantas com aspecto lenhoso, os brotos novos devem ser selecionados, por apresentarem maior quantidade de tecidos meristemáticos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A micropropagação é particularmente indicada para a produção de espécies que são de difícil propagação, em modelos convencionais, ou as que produzem sementes recalcitrantes e não longevas as quais perdem rapidamente sua viabilidade (SARASAN et al., 2006; VEIGA, 2008).

A vantagem dessa técnica é a obtenção de planta livre de contaminação fitopatogênica, uniformidade genética, produção continuada e em larga escala (VEIGA, 2008; SARASAN et al., 2006, ALVARENGA-VENUTOLO, 2011).

Com aumento da ação antrópica muitas plantas estão em eminência de extinção e em decorrência disso várias instituições de pesquisa nacionais e internacionais, juntamente com jardins botânicos espalhados pelo mundo, vão estabelecendo métodos de conservação e preservação de plantas de interesse econômico, cultural e ecológico (SARASAN et al., 2006). Dentro dessas metodologias a micropropagação se destaca, bem como o estabelecimento de bancos de germoplasmas *in vitro* que contribui para o controle de erosão genética, amenizando a perda de alelos importantes à sobrevivência de espécies (CARVALHO; VIDAL, 2003).

O Banco de Germoplasma é uma estrutura física que tem como finalidade conservar material genético vivo, de origem vegetal de forma segura, garantido a variabilidade genética dos acessos conservados, bem como fornecer material para fins de pesquisas (SÁNCHEZ-CHIANG; JIMÉNEZ, 2010).

O germoplasma é a base da herança genética de um ser vivo, que se perpetua através das gerações por meio de genes, que rearranjados de diferentes formas proporciona rica diversidade genética. Assim, quando o germoplasma é conservado ele serve de base para o estudo no melhoramento das culturas que podem ser utilizadas no presente e no futuro (YAMADA, 1993; IBPGR, 1991).

Banco de germoplasma avaliado quanto a diversidade genética é um diferencial no processo de seleção de indivíduos elites e conservação dos mesmos, sendo mais úteis em programas de melhoramento (COSTA et al., 2011).

Atualmente há mais de 1750 bancos de germoplasma no mundo que conservam 7,5 milhões de acessos de 16.500 espécies de plantas (Fu, 2017) e, no Brasil, os dados quanto ao número de espécies de plantas conservadas *ex situ* incluindo banco de germoplasma não são consistentes, porque não há um sistema de informação integrado entre as instituições que conservam a flora brasileira. Entretanto, dados atuais mostram que Jardins Botânicos têm realizado um trabalho importante na conservação de espécies ameaçadas de extinção,

com registo de mais de 51 espécies introduzidas em programas de preservação dentro dessas áreas (COSTA et al 2018).

2.6 FARMACOLOGIA

Estudos etnofarmacológicos com *U. guianensis* mostram que essa planta é usada de modo tradicional para curar enfermidades como cirrose, contracepção, diabetes, disenteria, gastrite, gonorréia, inflamações em geral, problemas intestinais, reumatismo, tumores, úlcera gástrica e câncer do trato urinário feminino (JONES, 1995).

Há vários ensaios farmacológicos que comprovam a efetividade terapêutica da espécie *U. guianensis*. O extrato etanólico apresenta atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* na concentração mínima de $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ (CORREIA et al., 2008), antioxidante inibindo a 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) com IC50 de $12,6\mu\text{g.mL}^{-1}$ e peroxidação lipídica com IC50 de $99\mu\text{g.mL}^{-1}$ (SANDOVAL et al., 2002).

A atividade antitumoral do extrato hidroetanólico foi confirmada com a diminuição de 91 % do tumor de mama do tipo 4T1 (URDANIBIA et al., 2013), além disso houve uma redução nos linfócitos T, macrófagos e neutrófilos filtrantes tumorais e do número de células positivas para COX-2, iNOS, IL-6, TNF- α e p65 (URDANIBIA et al., 2013). Outros ensaios também mostraram a ação anti-inflamatória do extrato etanólico de *U. guianensis* com a inibição da TNF α , com IC50 de $9,5\text{ ng.mL}^{-1}$, (SANDOVAL et al., 2002) e diminuição de 85 % do edema de pata com 5 mg.kg^{-1} do extrato etanólico, a inibição de 45 % no óxido nítrico (NO) e 65 % do TNF α na mesma concentração (URBANIBIA et al., 2013). A ação anti-inflamatória de *U. guianensis* não tem sido considerada para todos os tipos de inflamação, visto que esse processo é muito complexo e envolve um número muito grande de fatores e vias metabólicas (HERNANDES et al., 2020).

Estudo realizado com extrato hidroalcoólicos de caule e folha de *U. guianensis* apresentou atividade antiviral contra infecção do vírus da dengue (MELLO et al., 2017). Além disso, extrato de *U. guianensis* também apresenta atividade imunoestimulante (HEITZMAN et al., 2005).

3 HIPOTESE

A caracterização genética por marcador molecular e avaliação do teor dos alcaloides mitrafilina e isomitrafilina viabiliza a conservação de genótipos elites de *U. guianensis* em banco de germoplasma *in vitro*.

4 JUSTIFICATIVA

A extração de *U. guianensis* é realizada atualmente, no seu local de origem, no bioma Amazônia, de forma extrativista sem padronização de matéria prima o que compromete a produção de fitoterápicos já existentes no mercado. A estruturação de um banco de germoplasma *in vitro* possibilitará a propagação de clones elites para atender a demanda nacional e internacional da espécie, considerando que a legislação brasileira permite a permuta de material genético com outros países.

5 OBJETIVO

Estabelecer o banco de germoplasma *in vitro* e genotipar plântulas de *U. guianensis* selecionadas quanto à produção de alcaloides oxindólicos pentacíclicos.

6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

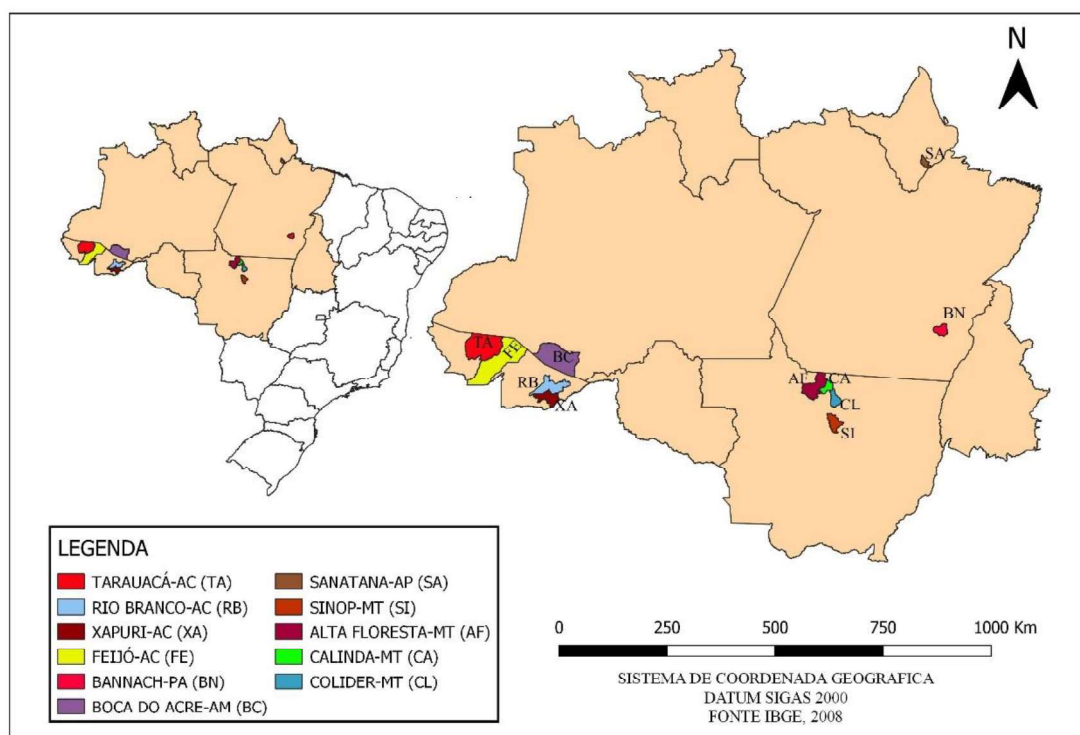
1. Estabelecer o banco de germoplasma *in vitro* de *U. guianensis*;
2. Quantificar mitrafilina e isomitrafilina de plântulas de *U. guianenses* mantidas no banco de germoplasma *in vitro* da UNAERP;
3. Genotipar por marcador molecular SCoT acessos de *U. guianensis* mantidos no banco de germoplasma *in vitro*.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 COLETA DE SEMENTE EM ÁREAS DE OCORRÊNCIA NATURAL DA ESPÉCIE.

As coletas de sementes de 5 indivíduos por população de *U. guianensis* foram realizadas nos municípios de Bannach (PA), Carlinda (MT), Colider (MT), Sinop (MT), Alta Floresta (MT), Feijó (AC), Rio Branco (AC), Xapuri (AC), Santana (AP), Boca do Acre (AM), Tarauacá (AC) (Figura 3). Exsiccatas de todos os indivíduos foram depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (HMP-UNAERP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil).

Figura 3- Mapa contendo os municípios das coletas



As informações sobre topografia, características do habitat, data da coleta, frequência dos indivíduos e características morfológicas das plantas foram anotadas em caderneta de campo. Foram obtidos os dados de localização

geográfica (altitude, latitude e longitude) (Tabela 2) por meio do Sistema de Posicionamento Global (GPS) para indicação exata da localidade.

Tabela 2- Tabela com nomes da cidade e as coordenadas do GPS das coletas das sementes de *Uncaria guianensis*

Localidade	Latitude	Longitude	Altitude (m)
Alta Floresta (MT)	9° 66' 0,95"	56° 01' 84,9"	238
Bannach (PA)	7° 33' 24,0"	50° 37' 12,4"	393
Boca do Acre (AM)	8° 47' 52,0"	67° 17' 21,0"	120
Carlinda (MT)	9° 97' 76,9"	55° 80' 14,1"	258
Colider (MT)	10° 77' 49,7"	55° 45' 57,8"	398
Feijó (AC)	8° 11' 8,10"	70° 22' 26,3"	161
Rio Branco (AC)	9° 54' 44,2"	67° 26' 46,8"	201
Santana (AP)	0° 03' 47,5"	51° 14' 86,0"	12
Sinop (MT)	11° 98' 7,30"	55° 51' 71,0"	363
Tarauacá (AC)	7° 56' 55,19"	71° 28' 51,3"	199
Xapuri (AC)	10° 36' 2,50"	68° 00' 32,8"	211

7.2 INTRODUÇÃO DE SEMENTES *IN VITRO*

As sementes foram coletadas, separadamente, dos indivíduos selecionados no campo e acondicionadas em frascos de vidro, previamente identificado com local de coleta e o código do acesso.

Para realização da assepsia, as sementes foram embaladas em papel de filtro e colocadas em frascos contendo solução fungicida 0,5 % (Cercobin®), sendo mantidas sob agitação por 24 horas em mesa agitadora. Posteriormente, transferiu-se as sementes para outro frasco contendo solução de Hipoclorito de Sódio a 1 %, sendo as mesmas mantidas sob agitação por 20 minutos.

Após o procedimento descrito acima, as sementes foram lavadas por 3 vezes com água destilada autoclavada, em fluxo laminar e então foram inoculadas em frasco de 8,5 x 4 cm (altura x diâmetro), contendo 15 mL meio WP (Wood Plant) basal, suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose, 2,5 g.L⁻¹ de agente geleificante (Gellax®) e o pH foi ajustado para 6,0. Foram inoculadas trinta sementes, em meio de cultura, de cinco indivíduos de cada uma das onze localidades (Tabela 2). O material previamente identificado com local de coleta e o código do acesso e foi mantido em sala de crescimento, com fotoperíodo de 18 x 6 horas (claro x escuro), a temperatura de 22 °C (± 3).

7.3 EFEITO DO MEIO DE CULTURA E CONCENTRAÇÕES DE BAP NO DESENVOLVIMENTO DOS EXPLANTES

Seguimentos nodais foram introduzidos em três meios de culturas diferentes MS (Murashige & Skoog, 1962) com 30 g.L⁻¹ de sacarose, SH (Schenk & Hildebrant 1972) com 30 g.L⁻¹ de sacarose e WP (Wood Plant 1981) com 20 g.L⁻¹ de sacarose, 2,5 g.L⁻¹ de agente geleificante (Gellex®) e o pH foi ajustado para 6,0.

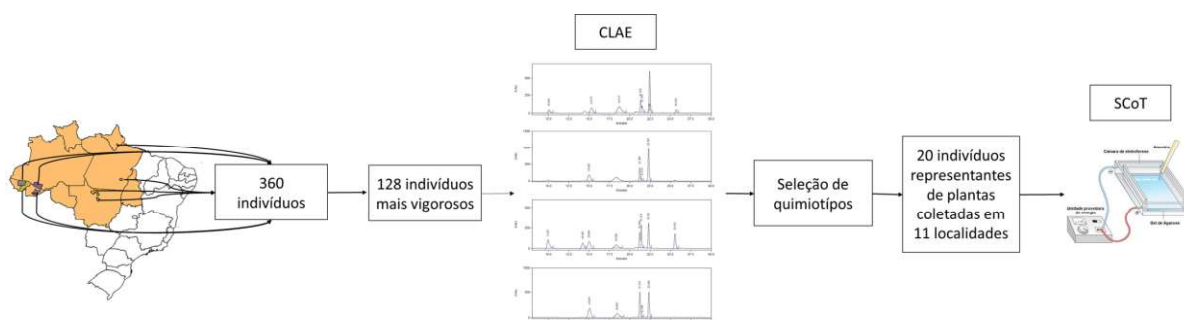
Após a realização do experimento, com diversos meios de cultura, foram adicionadas diferentes concentrações (0; 2,2; 4,4 e 11 µM) de 6-Benzilaminopurina (BAP) em meio de cultura WP. Foi inoculado 1 segmento nodal com cerca de 0,5 cm de comprimento, em cubeta de 8,5 x 2,5 cm (altura x diâmetro) contendo 6 mL (± 2 cm) de meio de cultura. Esses explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 18 x 6 horas (claro x escuro), a temperatura de 22 °C (± 3), por 45 dias.

Os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata, com 10 repetições por tratamento.

7.4 SELEÇÃO DE GENÓTIPOS PARA AVALIAÇÃO GENÉTICA E QUÍMICA.

Após a obtenção das plântulas (aproximadamente 360) introduzidas *in vitro*, foram selecionados 128 indivíduos considerados os mais robustos e vigorosos, sendo eles representantes dos acessos coletados em onze localidades (Tabela 2). Esses indivíduos foram submetidos a análise química por CLAE-DAD e, após a avaliação do perfil cromatográfico, foram selecionados 20 indivíduos que apresentaram ampla diversidade quanto a presença de alcaloides oxindólicos, sendo que entre eles houve pelo menos uma planta de cada uma das onze localidades alvo deste estudo (Figura 4). Esses indivíduos foram posteriormente avaliados quanto a diversidade genética e quanto ao teor de mitrafilina e isomitrafilina, os quais são considerados os marcadores químicos da espécie (Honório et al., 2018).

Figura 4 - Seleção dos indivíduos de *Uncaria guianensis* para análise da diversidade genética.



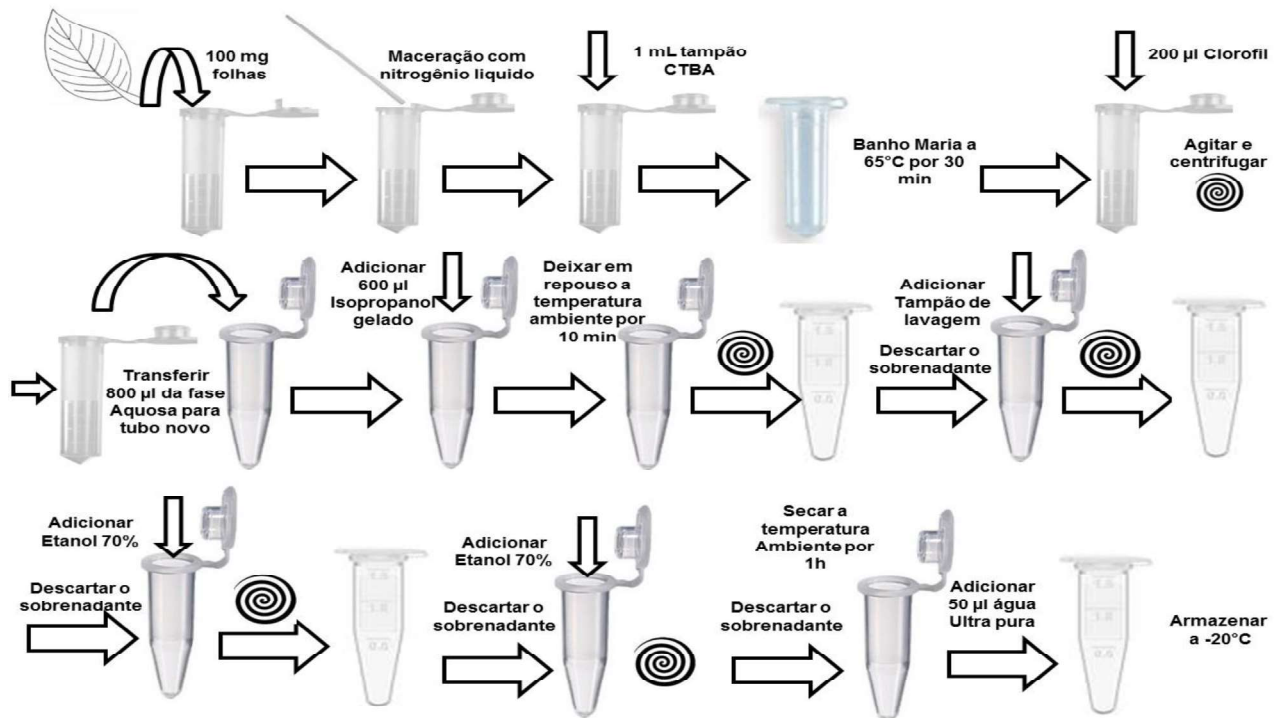
7.5 EXTRAÇÃO DE DNA

A parte aérea de plântulas mantidas *in vitro* foi utilizada para a extração do DNA genômico, pelo método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987) com algumas modificações. 100 mg de tecido vegetal de cada indivíduo foram maceradas em nitrogênio líquido e adicionados 1200 μ L do tampão de extração, em seguida os tubos foram incubados em banho-maria a 65° C por 30 min. Posteriormente, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente e sobre a mesma foi adicionado 200 μ L de clorofil (clorofórmio + álcool isoamilico 24:1) para promover a extração dos lipídeos, proteínas e polissacarídeos.

Após agitação, o material foi centrifugado a 14000 xg/5min. A fase aquosa foi removida para outro tubo, à qual foi adicionado 600 μ L de isopropanol para a precipitação dos ácidos nucleicos. Após centrifugação a 14000 xg/10min, foi adicionado ao sedimento 1 mL de tampão de lavagem (etanol 70 % v/v e acetato de amônio 10 mM), que permaneceu à temperatura ambiente por 20 min (Figura 4). A centrifugação foi repetida a 14000 xg/5min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento (DNA) foi lavado duas vezes em etanol 70 %, seguido de centrifugação a 14000 xg/5 min. Após uma hora de secagem, à temperatura ambiente, o “pellet” foi ressuspensionado em 50 μ L de água ultrapura (Milli-Q). 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 sob condições controladas de 100 V por 60 minutos e quantificado através do espectrofotômetro *NanoDrop* (NANOPHOTOMETER IMPLIN P 360).

Após a ressuspensão do DNA, extraído e quantificado de cada indivíduo, foi realizada a diluição para uma concentração de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e foram selecionados três indivíduos de cada população para realizar o teste com as combinações de *primers*.

Figura 5- Ilustração da metodologia de extração de DNA de *Uncaria guianensis*



Fonte: Bianca Valéria Bertoni

7.6 REAÇÃO DE PCR

Os fragmentos resultantes da PCR para a *U. guianensis* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2 % (KASVI®), contendo 30 poços.

Foram aplicados 15 µL para cada amostra, sendo 10 µL da amostra e 5 µL de tampão de carregamento e 0,8 µL para o marcador de peso molecular de 100 pb. As condições da corrida foram: 60 V por 6 horas. A visualização do gel aconteceu, após as 6 horas de corrida e foi gerada uma imagem do gel pelo equipamento Gel Logic 112, que possibilitou a leitura bandas em presença e ausência.

7.7 ANÁLISE COM MARCADOR SCOT

A análise SCoT foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Collard e Mackill (2009). Foram testados os 36 *primers* para a escolha dos nove *primers* melhores para *U. guianensis* (Tabela 3).

Para as reações de amplificação utilizou-se 1 µL de tampão de reação a 10X, 0,3 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de mix de dNTP (2,5m M), 1 µL primer *Forward* (me) (5 µM) , 0,1 µL *Taq* DNA polimerase (5 U/ µL), 1 µL de DNA (10 ng.µL⁻¹) e água deionizada para completar o volume de 10,0 µL.

Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 1min; 50 °C, 1 min, 72 °C, 2min; e para finalizar 72 °C por 5 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. Todas as amplificações foram aplicadas em gel de agarose a 1,2 %, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz de UV.

Tabela 3 - Sequência dos 36 primers testados para SCoT em *Uncaria guianensis*.

Sequência dos <i>primers</i>	
1 CAACAATGGCTACCACCA	19 CCATGGCTACCACCGGC
2 CAACAATGGCTACCACCC	20 CCATGGCTACCACCGCG
3 CAACAATGGCTACCACCG	21 CGACATGGCGACCCACA
4 CAACAATGGCTACCACCT	22 ACCATGGCTACCACCAC
5 CAACAATGGCTACCACGA	23 ACCATGGCTACCACCAG
6 CAACAATGGCTACCACGC	24 ACCATGGCTACCACCAT
7 CAACAATGGCTACCACGG	25 CCATGGCTACCACCGGG
8 CAACAATGGCTACCACGT	26 CCATGGCTACCACCGTC
9 CAACAATGGCTACCAGCA	27 CCATGGCTACCACCGTG
10 AACAATGGCTACCAGCC	28 CATGGCTACCACCGCCA
11 AGCAATGGCTACCACCA	29 CATGGCTACCACCGGCC
12 CGACATGGCGACCAACG	30 CATGGCTACCACCGGCG
13 CGACATGGCGACCATCG	31 CATGGCTACCACCGCCT
14 CGACATGGCGACCACGC	32 CATGGCTACCACCGCAC
15 CGACATGGCGACCGCGA	33 CATGGCTACCACCGCAG
16 CCATGGCTACCACCGAC	34 CCATGGCTACCACCGCA
17 CCATGGCTACCACCGAG	35 ATGGCTACCACCGGCC
18 CCATGGCTACCACCGCC	36 CAACAATGGCTACCACC

7.8 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ALCALOIDES OXINDÓLICOS PENTACÍCLICOS (AOP) MITRAFILINA E ISOMITRAFILINA.

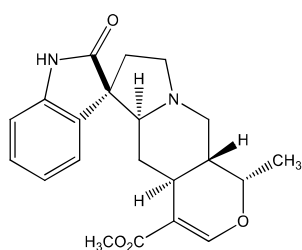
A parte aérea de plântulas mantidas *in vitro* foi seca em estufa de ar circulante a temperatura de 45 °C e triturada com pistilo em almofariz de cerâmica, obtendo-se a droga vegetal de cada indivíduo, separadamente, para a quantificação dos alcaloides oxindólicos mitrafilina e isomitrafilina.

Adicionou-se 1mL de metanol 100 % (Synth®) à droga vegetal (10 mg) e a amostra foi mantida em ultrassom por 5 minutos (Eco-sonica modelo Q5.9/37). O material permaneceu em maceração estática por 24 horas, a temperatura ambiente (22±1°C). Este procedimento foi realizado em triplicata. Os extratos foram filtrados e secos.

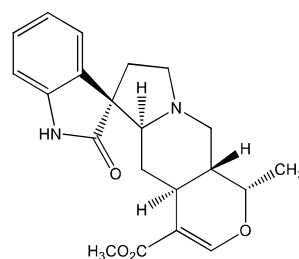
O extrato seco foi ressuspendido em metanol 100 % (Synth®) e aplicados em cartucho de C18 (Supelco® - LC18 reorder 57054), previamente ativado com metanol.

Em seguida os extratos secos foram pesados e solubilizados em metanol (JT BAKER – CAS 67-56-1): H₂O (Milli-Q) (85:15) na concentração de 10 mg.mL⁻¹ e filtrado em filtro seringa millipore 0,22 e 1 mL do extrato foi acondicionado em *vial* para análise. Os analitos em solução (10 mg.mL⁻¹) foram submetidos à injeção para análise dos alcaloides mitrafilina e isomitrafilina cuja estruturas estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6. Estruturas dos alcaloides mitrafilina e isomitrafilina



Mitrafilina



Isomitrafilina

FONTE: Adriana Aparecida Lopes.

As condições cromatográficas utilizadas foram: CLAE 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). As análises foram conduzidas em temperatura ambiente (22 ± 1 °C) por 45 minutos com fluxo de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 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.

Para a quantificação dos alcaloides foram utilizados os padrões de mitrafilina e isomitrafalina, os quais foram solubilizados em metanol e analisado por CLAE analítico. Foi realizada uma curva de quantificação dos alcaloides nas concentrações de 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125 µg/mL, o experimento foi realizado em triplicata. O limite de quantificação e de detecção da mitrafilina foi de 0,40 e 0,13 e da isomitrafalina foi de 1,03 e 0,34, respectivamente.

7.9 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS E DE MASSAS (CLUE-EM)

As análises utilizando cromatógrafo líquido de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos e de massas (CLUE-EM) foram realizadas no Departamento de Química Orgânica da Universidade de São Paulo, com a colaboração do Dr. Eduardo José Crevelin.

Os padrões autênticos dos alcaloides mitrafilina (ChromaDex, Irvine, CA, USA), isomitrafalina (ChromaDex, Irvine, CA, USA) e extrato metanólico de *U. guianensis* foram solubilizados separadamente em metanol ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) e injetadas em alíquotas de 5 µL. foram analisados em sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada a detector de massas (UPLC H-Class - Waters Corporation - Xevo TQ-S tandem quadrupolo - Waters Corporation, Milford, MA), operando com uma fonte de ionização Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) em modo positivo de análise. O volume de injeção de

amostras foi de 5 µL em uma coluna Zorbax Eclipse XDB - coluna C18 (150 x 4,6 mm I.D.; 3,5 µm de tamanho de partícula) de Agilent.

O sistema de fase móvel consistiu de um gradiente de eluição com os solventes (A) acetato de amônio 0,2 % e (B) acetonitrila, iniciando com 35% de B por 18 min., de 35 a 50% de B até 32 min., manteve-se em 50% de B até 35 min., retornando para 35% de B, até 40 min da análise. O fluxo utilizado foi de 0,6 mL min⁻¹.

7.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental adotado nos experimentos foi o inteiramente casualizado. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com regressão linear utilizando o programa SISVAR V.5.1 sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância. Para a obtenção da medida da similaridade genética foi calculado o Índice de Jaccard ($a/a+b+c$) onde, “a” representa o número de concordância positiva do tipo 1-1, “b” é o número de discordância 1-0 e, “c” é o número de discordância do tipo 0-1.

Em seguida, ao método hierárquico de Jaccard, o modelo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) foi utilizado para promover o agrupamento. A consistência dos agrupamentos foi obtida com *bootstrap* de 1000 réplicas.

A mesma matriz foi analisada por PCoA (Análise em Coordenadas Principais) visando determinar a formação dos grupos (Genalex, PEAKALL; SMOUSE, 2006) e para a discriminação entre os indivíduos foi empregado o método bayesiano utilizando o programa Structure versão 2,1 (PRITHARD et al., 2000).

Foi utilizado o modelo “*no admixture*” com frequências alélicas não correlacionadas, por se tratar de banco de germoplasma. O número de interações utilizadas no *burn-in* e MCMC (Markov Chain Monte Carlos) foram de 1.000.000 e 500.000, respectivamente com cinco interações independentes e valores de K variando de 1 a 10, sendo que o número ótimo foi estimado de acordo com (EVANNO, 2005).

8 RESULTADOS

8.1 BANCO DE GERMOPLASMA

Após três anos de manutenção do banco de germoplasma *in vitro*, atualmente o número de indivíduos conservados é de 360. Esse número é bem expressivo e deverá ser continuamente avaliado quanto a diversidade química e genética, para que sejam mantidos apenas os acessos representativos da diversidade da espécie. O excesso de indivíduos em banco de germoplasma torna-o inviável, ao longo do tempo, do ponto de vista econômico.

8.2 AVALIAÇÃO DE MEIO DE CULTURA BASAL E CONCENTRAÇÕES DE BAP

Não houve diferença estatística entre os meios MS e WP quanto à altura (cm) do caule e número de gemas no caule e o meio SH diferiu estatisticamente destes, apresentando resultado inferior quanto aos parâmetros avaliados (Tabela 4).

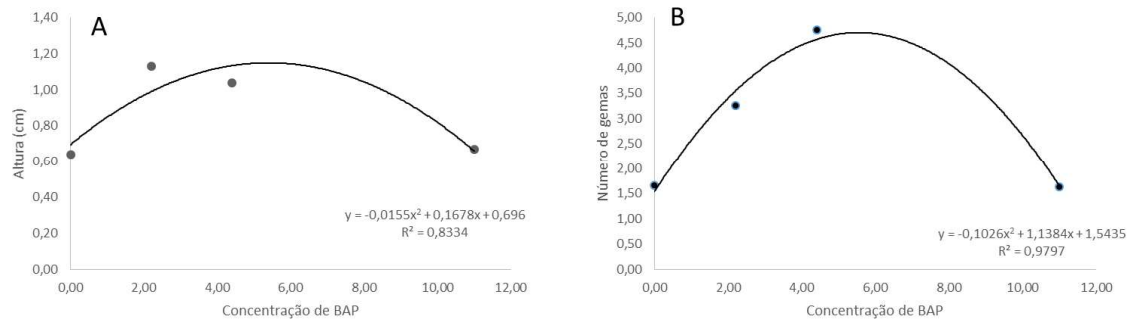
O experimento realizado com meio de cultura WP, suplementado com diferentes concentrações de BAP, mostrou que a concentração de 5,5 μM promoveu o maior número de gemas no caule (4,7) (Figura 7) e a maior altura do caule(1,15 cm).

Tabela 4- Efeito dos meios de culturas MS (Murashige e Skoog), WPM (Wood Plant Medium) e SH (Schenk e Hildebrant) no desenvolvimento de explantes de *Uncaria guianensis*

Tipos de meio de cultura	Altura (cm)	Nº de gemas no caule
MS	0,85 a	1,50 a
WP	0,76 a	1,43 a
SH	0,57 b	1,03 b

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Figura 7- Efeito de diversas concentrações de 6-Benzylaminopurine (BAP) na altura e número de gemas em explantes de *U. guianensis*



Trabalho anteriormente realizado *in vitro* com *U. guianensis* mostrou a efetividade do meio MS na produção de brotos, demonstrando ser esse o melhor meio basal para a espécie (PEREIRA et al., 2005). Esse resultado corrobora com os dados obtidos no presente estudo e concluímos que a resposta quanto ao crescimento e multiplicação em ambos os meios, MS e WP, não diferem estatisticamente.

O trabalho citado acima demonstrou que o meio de cultura $\frac{1}{4}$ MS, com sacarose, foi melhor do que o MS sem diluição, ao compararmos a quantidade de sais do meio WP e $\frac{1}{4}$ MS concluímos que o nitrato de amônia (NH_4NO_3) e o cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) apresentam a mesma proporção nesses meios basais e que em função do MS ser mais barato este pode ser o meio mais recomendado, tanto na sua formulação original quanto na forma diluída $\frac{1}{4}$ MS, se o objetivo for a propagação em larga escala.

Resultado semelhante foi relatado com figueira (*Ficus carica*) em que os meios de cultura $\frac{1}{2}$ MS e WP apresentaram resultados equivalentes, quanto ao desenvolvimento de gemas apicais (PALÚ et al., 2014)

8.3 DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA

A extração de DNA foi eficiente para todos os indivíduos de *U. guianensis*, dentre os 36 *primers* utilizados foram selecionados nove, por apresentarem maior nitidez e polimorfismo. Os nove *primers* escolhidos amplificaram de 16 a 30

bandas, por *primer*, com um total de 201 bandas amplificadas, apresentando um polimorfismo médio de 92,91 % (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de bandas e polimorfismo obtidos em cada *primers* em *Uncaria guianensis*

<i>Primers</i>	Nº de bandas	Nº de bandas polimórficos	Polimorfismo (%)
13 CGACATGGCGACCATCG	30	28	93,33
14 CGACATGGCGACCACGC	27	26	96,30
18 CCATGGCTACCACCGCC	23	20	86,96
19 CCATGGCTACCACCGGC	22	21	95,45
21 CGACATGGCGACCCACA	24	22	91,67
28 CATGGCTACCACCGCCA	21	21	100,00
30 CATGGCTACCACCGGCG	16	15	93,75
31 CATGGCTACCACCGCCT	17	15	88,24
35 ATGGCTACCACCGGCC	21	19	90,48
Total	201	187	-

O marcador molecular SCoT foi eficiente para analisar a variabilidade genética em indivíduos de *U. guianensis* conservados *in vitro*, sendo a primeira vez que foi utilizado esse marcador para avaliar diversidade genética na espécie. A eficiência da utilização deste marcador para o estudo da diversidade genética de outras espécies foi descrita em trabalhos anteriores com *Prosopis cineraria*, *Dendrobium nobile*, *Silybum marianum* e *Lonicera macranthoides* (BHATTACHARYYA et al., 2013; CHEN et al., 2015; SHEKHAWAT et al., 2018; RAFIZADEH; KOOHI-DEHKORDI; SORKHEH, 2018).

Os indivíduos selecionados neste trabalho se dividiram em 4 grupos como pode ser visto no dendograma obtido pela distância genética e no gráfico de dispersão de análise em coordenadas principais (FIGURAS 8 e 9).

O primeiro grupo foi composto por 5 indivíduos, sendo quatro progênes procedentes do município de Bannach (BN1, BN2, BN3 e BN4) e um advindo de Santana (SA1). Os indivíduos BN2 e BN3 são os mais aparentados e o indivíduo SA1 não ficou agrupado com os indivíduos de Bannach, embora todos eles apresentem certa similaridade genética, pois ficaram num mesmo grupo.

O segundo grupo foi constituído por 10 indivíduos: dois proveniente de Xapuri-AC (XA2 e XA3), um de Tarauacá-AC (TA1), dois de Sinop-MT (SI1 e SI2), dois de Alta Floresta-MT (AF1 e AF2), um de Feijó-AC (FE1), um de Boca

do Acre-AM (BC1) e um de Bannach-PA (BN5), este grupo apresenta indivíduos provenientes de cinco estados brasileiros Acre, Amazonas, Pará, Mato Grosso e Amapá, revelando que mesmo havendo distância geográfica entre eles, houve agrupamentos que os indivíduos AF2 e FE1 e os indivíduos SI1 e TA1, mostrando que mesmo havendo um distanciamento geográfico eles apresentaram similaridade genética entre si.

O terceiro grupo foi composto por dois indivíduos, sendo um de Xapuri-AC (XA1) e outro de Rio Branco-AC (RB1), esses municípios são bem próximos geograficamente e os indivíduos apresentam similaridade genética.

O quarto grupo foi formado por três indivíduos de dois estados diferentes, um de Bannach-PA (BN6), um Colider-MT (CL1) e um Carlinda-MT (CA1). Os indivíduos BN6, CL1 são os mais similares dentro deste grupo. Um fato que merece destaque é que os indivíduos CA1, situado nesse grupo foi o mais distante geneticamente quando comparado com os 19 indivíduos de todos os grupos analisados (FIGURA 8 E 9).

O menor coeficiente de similaridade foi entre os indivíduos CA1 e BN1 (0,32) e o maior foi entre os indivíduos BN2 e BN3 (0,78) (Tabela 6). O fato de haver indivíduos com quase 80% de dissimilaridade genética mostra que os acessos conservados no banco de germoplasma de *U. guianensis* apresentam significativa diversidade genética, resultado semelhante foi demonstrado em estudo realizado com 23 acessos de *Cocus nucifera*, localizados em diferentes países e regiões geográficas, os quais apresentaram uma diversidade genética de 0,37 a 0,91 (RAJESH et al 2015).

Figura 8 - Dendograma obtido pela distância genética de Jaccard e pelo método de argumento de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) em indivíduos de *Uncaria guianensis*

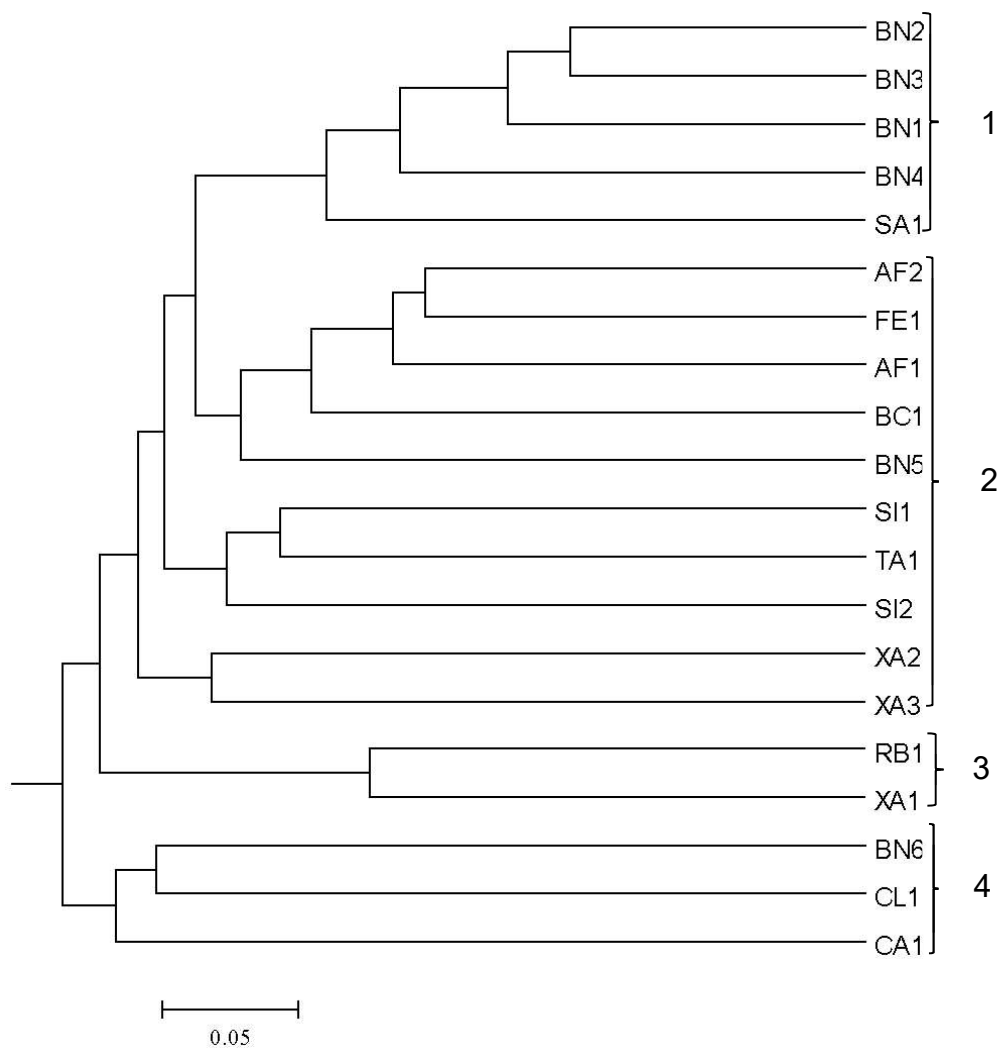


Figura 9- Gráfico de dispersão de análise em coordenadas principais (PCoA) em indivíduos de *Uncaria guianensis chamara* a figura 9 no texto

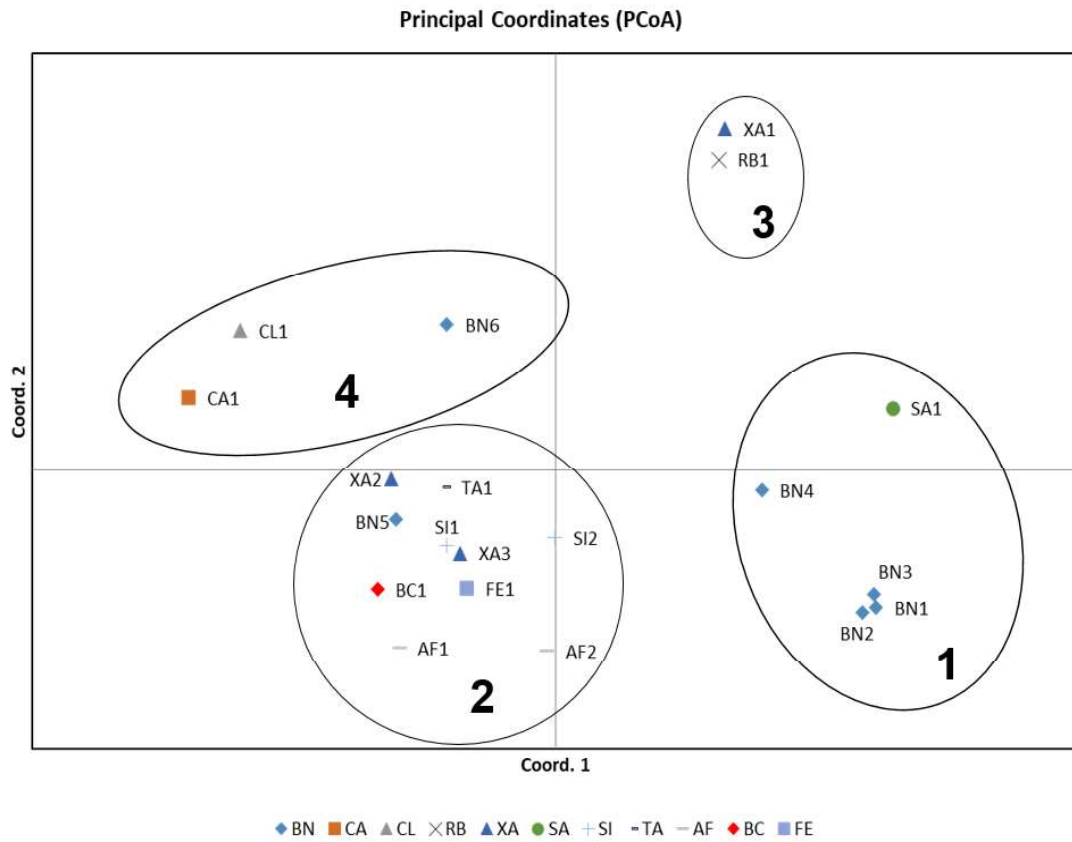
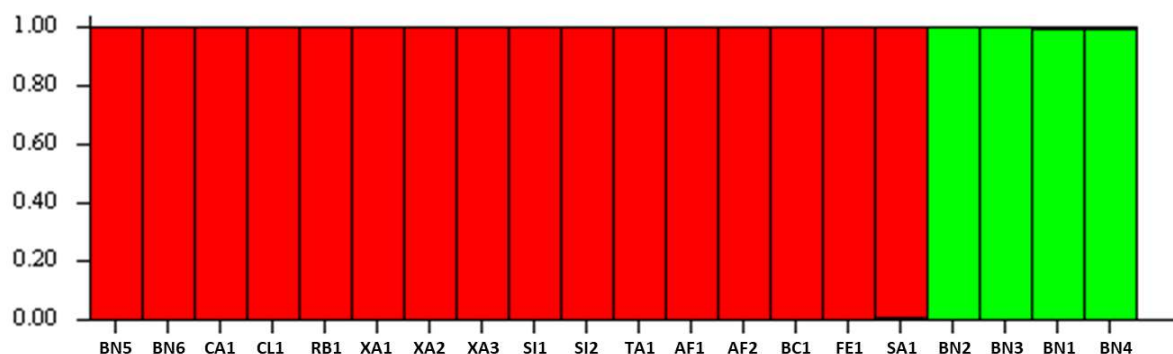


Tabela 6 - Matriz de similaridade obtida pela distância genética de Jaccard entre 20 genótipos e *Uncaria guianensis*

Genótipos	BN1	BN2	BN3	BN4	BN5	BN6	CA1	CL1	RB1	XA1	XA2	XA3	SA1	SI1	SI2	TA1	AF1	AF2	BC1	FE1
BN1	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BN2	0,76	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BN3	0,72	0,78	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BN4	0,62	0,65	0,70	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BN5	0,46	0,46	0,47	0,41	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BN6	0,43	0,43	0,46	0,49	0,43	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CA1	0,32	0,34	0,34	0,41	0,44	0,46	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CL1	0,35	0,36	0,35	0,34	0,41	0,48	0,43	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RB1	0,46	0,46	0,49	0,49	0,43	0,45	0,38	0,38	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XA1	0,46	0,48	0,47	0,48	0,39	0,45	0,35	0,39	0,64	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XA2	0,42	0,42	0,43	0,45	0,44	0,41	0,40	0,38	0,37	0,40	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XA3	0,47	0,50	0,46	0,48	0,45	0,36	0,40	0,37	0,39	0,40	0,52	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-
SA1	0,60	0,61	0,60	0,61	0,46	0,44	0,35	0,35	0,60	0,56	0,41	0,43	1,00	-	-	-	-	-	-	-
SI1	0,48	0,48	0,44	0,49	0,44	0,42	0,45	0,38	0,38	0,37	0,47	0,50	0,51	1,00	-	-	-	-	-	-
SI2	0,46	0,55	0,51	0,49	0,43	0,38	0,39	0,40	0,45	0,38	0,41	0,49	0,53	0,54	1,00	-	-	-	-	-
TA1	0,43	0,47	0,44	0,46	0,43	0,41	0,39	0,38	0,39	0,43	0,43	0,42	0,48	0,57	0,52	1,00	-	-	-	-
AF1	0,53	0,49	0,53	0,49	0,54	0,43	0,48	0,46	0,39	0,38	0,46	0,52	0,45	0,47	0,47	0,48	1,00	-	-	-
AF2	0,59	0,58	0,60	0,52	0,57	0,45	0,44	0,43	0,46	0,46	0,50	0,55	0,56	0,53	0,49	0,50	0,67	1,00	-	-
BC1	0,46	0,54	0,47	0,46	0,52	0,46	0,50	0,42	0,37	0,40	0,48	0,49	0,46	0,48	0,49	0,50	0,55	0,60	1,00	-
FE1	0,49	0,53	0,55	0,51	0,53	0,45	0,50	0,43	0,46	0,44	0,46	0,50	0,57	0,50	0,51	0,56	0,63	0,68	0,63	1,00

A análise bayesiana realizada no programa STRUCTURE (Figura 10), indicou a formação de dois grupos gênicos (K2), sendo que os indivíduos BN2, BN3, BN1 e BN4, indicado pela cor verde, são pertencentes ao mesmo o grupo gênico, enquanto os indivíduos indicados pela cor vermelha compõem o outro grupo. Um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa com populações naturais *U. guianensis* utilizando o molecular SRAP (sequence-related amplified polymorphism), mostrou a presença de 3 grupos gênicos (K3) (HONÓRIO et al., 2018). Assim, como a grande maioria dos acessos depositados no banco de germoplasma foram coletados nas mesmas regiões geográficas do referido trabalho, é possível considerar que os acessos conservados no banco de germoplasma representam uma considerável parte da diversidade da espécie encontrada nas populações naturais.

Figura 10 - Grupos gênicos dos indivíduos de *Uncaria guianensis* analisados através do programa STRUCTURE. A mesma cor para genótipos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo grupo gênico



Os genótipos foram separados pelo teor de mitrafilina e isomitrafilina com destaque para três indivíduos (XA3, SA1 E CA1) advindos dos estados de Acre, Amapá e Mato Grosso, os quais apresentaram elevados teores desses alcaloides (Tabela 7). Associando os dados químicos com os dados genéticos foi constatado que existe diversidade genética entre esses indivíduos, pois ficaram em grupos diferentes (Figuras 8 e 9).

Com relação aos indivíduos que apresentaram os menores teores dos alcaloides destacam-se BN1 e BN3 (Tabela 8), sendo que ambos pertencem ao mesmo grupo gênico (Figura 10).

Tabela 7 - Teor de mitrafilina e isomitrafilina em genótipos de *Uncaria guianensis* mantidos *in vitro*

Genótipos*	Alcaloide	
	mitrafilina	Isomitrafilina
	(mg.g⁻¹ de droga vegetal seca)	
BN 1	0,98 q	1,33 s
BN 2	1,29 o	1,65 q
BN 3	0,74 r	1,21 t
BN 4	1,72 m	2,64 n
BN 5	3,15 f	4,72 d
BN 6	1,47 n	2,41 o
CA 1	4,13 c	5,58 c
CL 1	2,06 l	3,15 j
RB 1	2,03 l	2,64 n
XA 1	2,81 h	4,01 g
XA 2	3,70 e	4,52 e
XA 3	5,43 a	6,42 a
SA 1	4,79 b	6,35 b
SI 1	1,74 m	2,85 m
SI 2	2,20 j	2,97 l
TA 1	2,96 g	3,73 i
AF 1	1,15 p	1,50 r
AF 2	1,70 m	2,32 p
BC1	2,58 i	3,85 h
FE1	3,86 d	4,12 f

*BN= Bannach- PA, CA= Carlinda- MT, CL= Colider-MT, RB= Rio Branco-AC, XA= Xapuri-AC, SI= Sinop-MT, TA= Tarauacá-Ac, AT= Alta Floresta-MT, BC1= Boca do Acre- AM e FE = Feijó-AC. As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os vinte indivíduos analisados, quanto ao teor de mitrafilina e isomitrafilina, foram separados em três grupos: alto, médio e baixo produtores desses alcaloides oxindólicos pentacíclicos (Figura 11 a e b). Assim, os acessos denominados CA1, XA2, FE1, XA3 e SA1, provenientes dos municípios Carlinda (MT) Xapuri (AC), Feijó (AC) e Santana (AP) apresentaram os mais elevados teores de mitrafilina, variando de 3,70 a 5,43 mg.g⁻¹ de droga vegetal (Tabela 8). Quanto a produção de isomitrafilina os indivíduos mais produtores são os localizados nos municípios de Carlinda (MT), Xapuri (AC) e Santana (AP) (Figura 11 a e b).

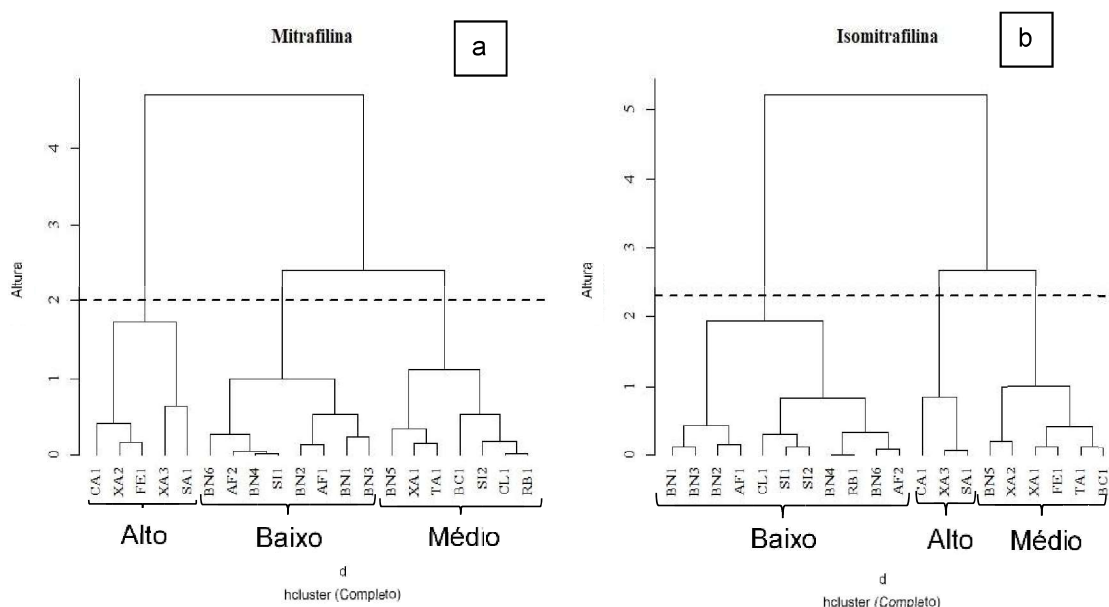
Os indivíduos que apresentaram concentração mediana de mitrafilina foram BN5, XA1, TA1, BC1, SI2, CL1 e RB1, variando de 2,03 a 3,15 mg.g⁻¹ de droga vegetal, advindos dos municípios Bannach (PA), Xapuri (AC), Boca do Acre (AM), Tarauacá (AP), Sinop (MT), Colíder (MT) e Rio Branco (AC).

Quanto ao teor mediano de isomitrafalina o grupo foi composto pelos indivíduos BN5, XA2, XA1, FE1, TA1, BC1, variando de 3,73 e 4,72 mg.g⁻¹ de droga vegetal, advindo dos municípios de Bannach (PA), Xapuri (AC), Feijó (AC), Tarauacá (AP) e Boca do Acre (AM) (Figura 10 a e b).

Os indivíduos que apresentaram menor teor de mitrafalina formaram um grupo com BN6, AF2, BN4, SI1, BN2, AF1, BN1, BN3, variando de 0,98 a 1,74 mg.g⁻¹ de droga vegetal e quanto a isomitrafalina os menores teores foram encontrados no grupo formado por BN1, BN3, BN2 e AF1, CL1, SI1, SI2, BN4, RB1, BN6 e AF2 variando de 1,33 a 3,15 mg.g⁻¹ de droga vegetal, localizados nos municípios de Bannach (PA), Alta Floresta (MT), Colider (MT), Sinop (MT) e Rio Branco (AC), é importante ressaltar que os indivíduos de Bannach foram os que apresentaram os baixo teor desses alcaloides.

A divisão de grupos com alto, médio e baixo teor de mitrafalina e isomitrafalina nos acessos selecionados de *U. guianensis* é importante, porque há controvérsia quanto a relação entre a atividade anti-inflamatória apresentada por essa espécie e a presença desses alcaloides (SANDOVAL et al., 2002). Dessa forma, existem extratos padronizados com teores específicos desses alcaloides e outros que apresentam ausência dessas substâncias.

Figura 11 - Análise de agrupamento para teor de mitrafalina e isomitrafalina em *Uncaria guianensis* com formações de grupos com alto, médio e baixo teores de mitrafalina e isomitrafalina.



Houve uma correlação positiva ($r=0,97$) entre o teor de mitrafilina e isomitrafilina, mostrando que os indivíduos mais produtores de mitrafilina são aqueles que também produzirão maiores teores de isomitrafilina (Figura 12).

Figura 12 - Correlação entre a produção de mitrafilina e isomitrafilina

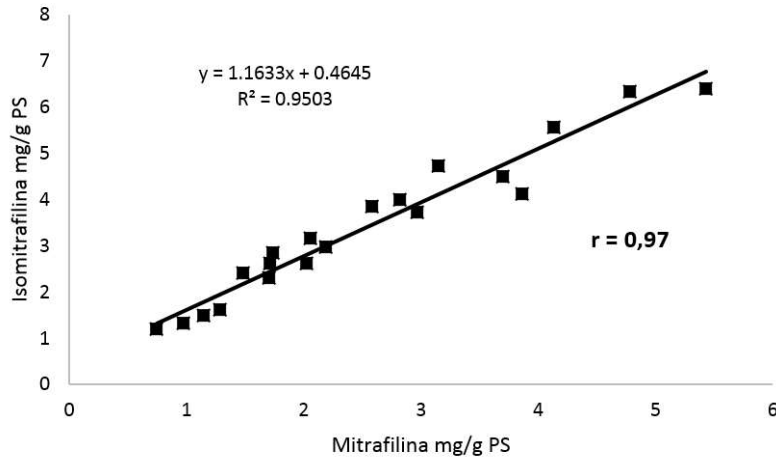
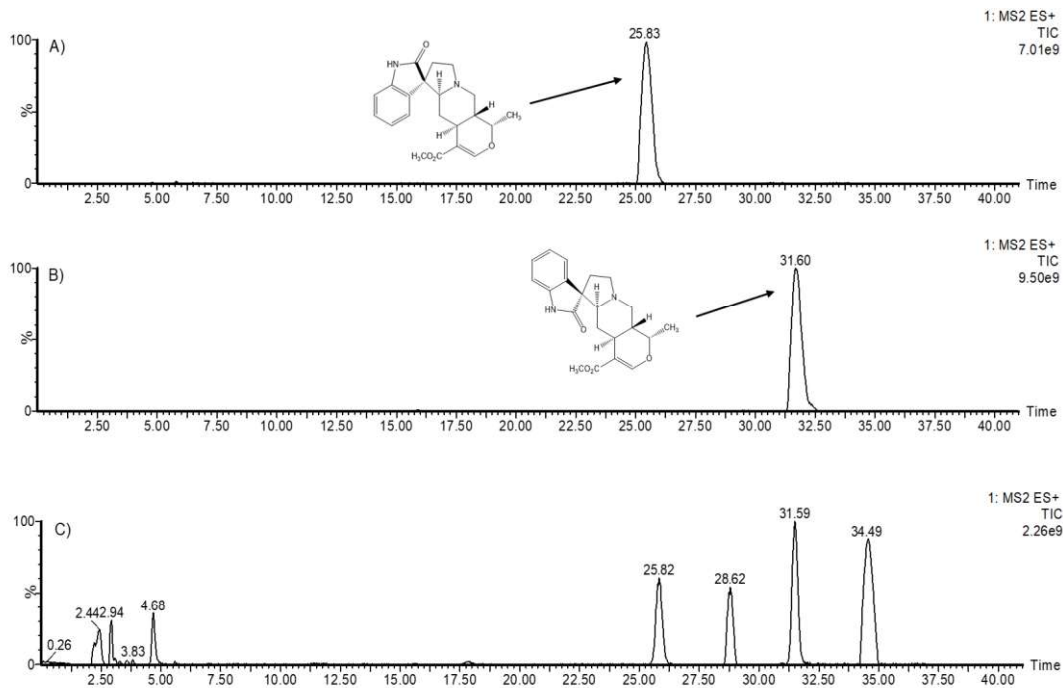


Figura 13 - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos e de massas (CLUE-EM) dos padrões de mitrafilina (A), isomitrafilina (B) e extrato metanólico de *U. guianensis* (C)



A análise do extrato de *U. guianensis* analisado por CLUE-EM em conjunto com padrões confirmou a presença dos alcaloide mitrafilina e isomitrafilina (FIGURA 13).

A análise dos cromatogramas obtidos por CLAE mostrou que os vinte indivíduos avaliados foram separados em quatro grupos quanto a presença de alcaloides oxindólicos majoritários (Tabela 8 e APÊNDICE).

O grupo 1 foi formado pelos indivíduos advindos de Carlinda-MT (CA1) e de Xapuri-AC (XA3), cujo alcaloide majoritário é a isomitrafilina.

Quanto ao grupo 2 os indivíduos procedentes de Bannach-PA (BN5), Boca do Acre-AM (BC1), Colider-MT (CL1), Santana-PA (SA1), Rio Branco (RB1), Tarauacá (TA1) e Xapurí-AC (XA1) ficaram agrupados, todos apresentaram dois alcaloides oxindolico como compostos majoritários, sendo um tetracíclico a isorinchofilina e outro pentacíclico a isomitrafilina.

O grupo 3 foi formado pelos indivíduos de Bannach-PA (BN1, BN2, BN3, BN4, BN6), Sinop-MT (SI1) e Xapurí-AC (XA2), todos eles apresentam o alcaloide oxindólico tetracíclico isorinchofilina como majoritário, destacando que esse grupo apresenta mais indivíduos provenientes de Bannach, do que de outros municípios.

O grupo 4 foi formado pelos indivíduos Alta Floresta-MT (AF1 e AF2), Feijó-AC (FE1) e Sinop-MT (SI2), todos eles apresentaram três alcaloides oxindólicos majoritários sendo um tetracíclico isorinchofilina, e dois pentacíclicos isomitrafilina e pteropodina. Este grupo tem predominância de indivíduos localizados no estado do Mato Grosso.

Foi constatado expressiva diversidade de alcaloides oxindolicos, somando oito tipos diferentes, sendo que todos os genótipos avaliados apresentaram mitrafilina, isomitrafilina, pteropodina e isorinchofilina, 90 % produziram isopteropodina, 80% acumularam especiofilina, 55 % produziram rinchofilina e apenas 40% apresentaram uncarina F (Tabela 9).

Dentro dos quatro grupos que foram separados pela presença dos alcaloides majoritários é possível distingui-los da seguinte forma: grupo I composto por indivíduos que produzem majoritariamente alcaloide oxindólico pentacíclico (isomitrafilina); grupo II alcaloides oxindólicos pentacíclico e tetracíclico (isomitrafilina e isorinchofilina); grupo III alcaloide oxindólico

tetracíclico (isorinchofilina) e o grupo IV alcaloides oxindólicos pentacíclico e tetracíclico (isomitrafalina, isorinchofilina e pteropodina). Essa distribuição de indivíduos na natureza que apresentam como compostos majoritários alcaloides tetracíclicos, pentacíclicos e a mistura dos dois, parece ser um padrão considerando que isso também foi constatado na espécie *U. tomentosa* em que foram encontrados três grupos químicos distintos com essas mesmas características (PEÑALOZA et al., 2015).

A identificação de acessos no banco de germoplasma com diferentes quimiotipos é importante, pois dependendo do interesse da indústria farmacêutica a propagação em larga escala pode ser realizada com determinado quimiotipo específico.

Um fato importante é que os alcalóides oxindólicos tetracíclicos (AOT) atuam no sistema nervoso central, enquanto que os pentacíclicos (AOP) afetam o sistema imunológico e além disso, há dados que mostram que os alcalóides tetracíclicos exercem efeitos antagônicos sobre a ação dos pentacíclicos (Reinhard, 1999). Todas essas informações consolidam a necessidade de produção de clones bem caracterizados quanto aos teores desses alcaloides.

Tabela 8 - Grupos de indivíduos formados por alcaloides majoritários mantidos in vitro de *Uncaria guianensis*

Grupos	Indivíduos	Alcaloides majoritários
1	CA1 e XA3	isomitrafalina
2	BN5, BC1, CL1, SA1, RB1, TA1 e XA1	isomitrafalina e isorinchofilina
3	BN1, BN2, BN3, BN4, BN6, SI1 e XA2	isorinchofilina
4	AF1, AF2, FE1 e SI2	isomitrafalina, isorinchofilina e pteropodina

Tabela 9 - Alcaloides presentes nos vinte genótipos de *Uncaria guianensis* mantidos *in vitro*

Alcaloides	Quantidades de genótipos	Porcentagem (%)
especiofilina	16	80
uncarina F	8	40
mitrafilina	20	100
rinchofilina	11	55
isomitrafilina	20	100
pteropodina	20	100
isorinchofilina	20	100
isopteropodina	18	90

9 CONCLUSÕES

- Foi estabelecido o banco de germoplasma *in vitro* de *U. guianensis* em ampla base genética advinda de acessos coletados em cinco estados brasileiros;
- Todos os acessos avaliados produziram os marcadores químicos da espécie mitrafilina e isomitrafilina, além disso os indivíduos apresentaram também alcaloide oxidolico tetracíclico;
- O marcador molecular SCoT foi eficiente na detecção da variabilidade genética dos acessos avaliados de *U. guianensis* mantidos no banco de germoplasma *in vitro*.

Os acessos mantidos no banco de germoplasma estarão, a partir desse estudo, disponível para a multiplicação em escala, podendo atender demandas específicas da indústria farmacêutica e de programas de fitoterapia como Farmácias Vivas.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA-VENUTOLO, S. Establecimiento *in vitro* y cultivo de células de la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) (Willd.) D.C. **Revista Tecnología en Marcha**, 23(5), p. pág. 24, 2011.

ABOULILA, A. A.; MANSOUR, M. Efficiency of Triple-SCoT *Primer* in Characterization of Genetic Diversity and Genotype-Specific Markers against SSR Fingerprint in Some Egyptian Barley Genotypes. **American Journal of Molecular Biology**, v. 7, n. 3, 13 June 2017. DOI: 10.4236/ajmb.2017.73010.

AGARWAL, A.; GUPTA, V.; HAQ, S.U.; JATAV, P.K.; KOTHARI, S.L.; KACHHWAHA, S. Assessment of genetic diversity in 29 rose germplasms using SCoT marker .Journal of King Saud University – Science 31 (2019) 780–788

ALVAREZ, Carmen M.; SÁNCHEZ, Osear; STILKE, Rainer; UGAZ, Oiga Lock de. ALGUNOS CONSTITUYENTES DE UNCARIA GUIANENSIS. **Revista de Química**, Peru, v. 11, n. 2, p. 99-104, dez. 1988.

BHATTACHARYYA, Paromik et al. Start Codon Targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid species. **Gene**, 529(1) 21-26 2013 doi:10.1016/j.gene.2013.07.096.

CARBONEZI, C. A. et al. Determinação por RMN das configurações relativas e conformações de alcalóides oxindólicos isolados de *Uncaria guianensis*. **Química Nova**, 878-881, 2004.

CARDENAS, J.A.G.; VALLEN, C.M.; AGUGLIARO, F. M; Trends in plant research using molecular markers . *Planta* (2018) 247:543–557

CHEN, D. et al. Genetic structure and genetic diversity of single-variety *Lonicera macranthoides* populations in China, as indicated by SCoT markers. **Genetics And Molecular Research**, 14(3), 8058-8067, 2015, doi:10.4238/2015.july.17.14.

COLLARD, B. C. Y.; MACKILL, D. J. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, 27(1), 86-93, 2008, doi: 10.1007/s11105-008-0060-5.

CORREIA, A. F. et al. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **Medical And Pharmacological Sciences**, 369-380, 2008.

COSTA, M.L.M.N, JACKSON, P.W; FERNANDES, R.A.V.; PEIXOTO, A.L Conservation of threatened plant species in botanic garden reserves in Brazil *Oryx*, 2018, 52(1), 108–115

ETMINANA, A.; POUR-ABOUGHADAREH, A.; MOHAMMADIC, R.; AHMADI-RADD, A.; NOORIA, A.; MAHDAVIANA, Z.; MORADIA, Z. Applicability of start codon targeted (SCoT) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic diversity analysis in durum wheat genotypes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2016 VOL. 30, NO. 6, 1075–1081

FALEIRO, F. G. Marcadores Genéticos Aplicados a programas de conservação e uso dos recursos genéticos. **Embrapa: Cerrado**, Planaltina, DF, 1(1), 1-102, 2007.

Fu, Y. The Vulnerability of Plant Genetic Resources Conserved *Ex Situ* **Crop Science**, 57, 2314-2328, 2017.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, A. M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: Embrapa-SPI/EmbrapaCNPQ, 83-260, 1998.

GUEVARA, A.Q. **Silvicultura de la Uña de Gato- Alternativa para su conservación**. Pucallpa-Perú: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, p43, 1995.

HEITZMAN, M. E. et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of (Rubiaceae). **Phytochemistry**, 66(1), 5-29, 2005, doi:10.1016/j.phytochem.2004.10.022.

HERNANDES, C.; OLIVEIRA R.N.; SANTOS, A.H.S.; MALVEZZI, H.; AZEVEDO B.C.; GUEUVOGHLANIAN-SILVA, B.Y.; PEREIRA, A. M. S.; PODGAEC, S. *Molecules* 2020, 25, 1325; doi:10.3390/molecules25061325

HONORIO, I.C.; COPPEDE, J.S.; DELPRETE, P.G; COSTA, F.H.S.; TELLES, M.P.C.; BRAGA, R.S.; DINIZ-FILHO, J.A.; CORREA, V.S.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W. Genetic structure and chemical diversity in natural populations of *Uncaria guianensis* (Aubl.) J.F.Gmel. (Rubiaceae). *PLOS ONE* | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205667> October 26, 2018.

HONÓRIO, I. C. G. et al. *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* an agronomic history to be written. **Ciência Rural**, 46(8), 1401-1410, 2016, doi: 10.1590/0103-8478cr20150138.

<http://tropicos.org/Name/27903887?tab=synonyms> 19/06/17 14:00h.

<http://tropicos.org/Name/40021558?tab=synonyms> 19/06/17 14:30h.

<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B5840-2-0%5D.PDF>
26/07/2017 09:59 h.

HUANG, Y.; ZHOU, N.; YANG, M.; SHEN, Y.; ZHANG, D. A comparative study of the population genetics of wild and cultivated populations of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* based on amplified fragment length polymorphism markers. *Ecology and Evolution*. 2019;9:10707–10722.

IBPGR. Elsevier's dictionary of plant genetic resources. Roma: International Board for Plant Resources, 1991.

JONES, K. Cat's claw, healing vine of Peru. Seattle: Sylvan Press, 1995.

KUMARI, N.; THAKUR, S.K Randomly amplified polymorphic DNA-a brief review *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 9 (1): 6-13, 2014.

LAMEIRA, O.A.; LEMOS, O.F.; MENEZES, I.C. de; PINTO, J.E.B.P. *Cultura de tecidos (manual)*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 41p, 2000.

LAUS, G; KEPLINGER, D. Alkaloids of Peruvian *Uncaria guianensis* (Bubiaceae). **Phyton: ANNALES REI BOTANICAE**, 43(1), 1-8, 2003.

LAUS, Gerhard. Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Uncaria*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 4, p. 259-274, abr. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1469>.

LAVAUULT, M.; MORETTI, C.; BRUNETON, J. Alcaloides de *l'Uncaria guianensis*. **Journal of Medicinal Plant Research: Planta Médica**, Boulevard Daviers, 47(1), 244-245, 1983.

MELLO, C. S et al. Decrease in Dengue virus-2 infection and reduction of cytokine/chemokine production by *Uncaria guianensis* in human hepatocyte cell line Huh-7. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 112(6), 458-468, 2017, doi: 10.1590/0074-02760160323.

PALÚ, E. G. et al., MEIOS NUTRITIVOS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE FIGUEIRA , **Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v.10, n.19; p. 2014

PEÑALOZA ,E. M. I. C. I , Kaiser, S., Resende, P. E., Pittol, V., Carvalho, A. R., Ortega G. G., CHEMICAL COMPOSITION VARIABILITY IN THE *Uncaria tomentosa* (cat's claw) WILD POPULATION *Quim. Nova*, 38(3), 378-386, 2015

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). **Ciência e Agrotecnologia**, 30(4), 637-642, 2006 doi: 10.1590/s1413-70542006000400007.

PEREIRA, R.C.A.; VALENTE, L. M. M.; PINTO, J. E. B. P.; SUZAN K. V. BERTOLUCCI; BEZERRA, G. M.; ALVES, F. F.; SANTOS, P. F. P.; BENEVIDES, P. J. C.; SIANI, A. C.; ROSARIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A.; GOMES, L. N. F.; AQUINO-NETO, F. R.; EMMERICK, I. C. M.; CARVALHAES, S. F.. *In vitro* cultivated *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* with determination of the pentacyclic oxindole alkaloid contents and profiles. *J.Braz.Chem. Soc.* 19(6) 1193-1200, 2008.

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

RAFIZADEH, A.; KOOHI-DEHKORDI, M.; SORKHEH, K. Molecular insights of genetic variation in milk thistle (*Silybum marianum [L.] Gaertn.*) populations collected from southwest Iran. **Molecular Biology Reports**, 45(4), 601-609, 2018, doi: 10.1007/s11033-018-4198-4.

RAJESH, M. K.; SABANA, A. A.; RACHANA, K. E.; RAHMAN,S.; JERARD, B. A.; KARUN, A. Genetic relationship and diversity among coconut (*Cocos nucifera L.*) accessions revealed through SCoT analysis. *3 Biotech* (2015) 5:999–1006

REINHARD, KARL-HEINZ *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C: Cat's Claw, *Una de Gate*, or Saventaro **THE JOURNAL OF ALTERNATIVE AND COMPLEMENTARY MEDICINE**, 5(2), 143-151, 1999.

RODRÍGUEZ, Juliet Angélica Prieto et al. Estudio fitoquímico de hojas de *Uncaria guianensis* y evaluación de actividad antibacteriana: **Acto Amazonia**, v. 41, n. 2, p. 303-310, jan. 2011.

SÁNCHEZ-CHIANG, N; JIMÉNEZ, V. M.. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. **Agronomía Mesoamericana**, 1(21), 193-205, 2010.

SANDOVAL, M. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomedicine**, n. 9, 325-337, 2002.

SARASAN, V. et al. Conservation *In vitro* of threatened plants—Progress in the past decade. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 42(3), 206-214, 2006, doi: 10.1079/ivp2006769.

SATYA, P.; KARAN, M.; JANA, S.; MITRA, S.; SHARMA, A.; KARMAKAR, P. G.; RAY, D. P. Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea L.*

Gaudich.), a premium textile fiber producing species. **Meta Gene**, v. 3, p. 62-70, Feb. 2015. DOI: 10.1016/j.mgene.2015.01.003.

SHEKHAWAT, J.K.; Rai1, M.K; SHEKHAWAT, N.S.; KATARIA, V. Start codon targeted (SCoT) polymorphism for evaluation of genetic diversity of wild population of *Maytenus emarginata* *Industrial Crops & Products* 122 (2018) 202–208

SHEKHAWAT, Jatan K. et al. Exploring genetic variability in *Prosopis cineraria* using two gene targeted CAAT box-derived polymorphism (CBDP) and start codon targeted (SCoT) polymorphism markers. **Molecular Biology Reports**, 45(6), 2359-2367, 2018, doi:10.1007/s11033-018-4400-8.

SORKHEH, K.; AMIRBAKHTIAR, N.; ERCISLI, S. Retraction Note to: Potential Start Codon Targeted (SCoT) and Interretrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) Markers for Evaluation of Genetic Diversity and Conservation of Wild Pistacia Species Population. **Biochemical Genetics**, 55(5-6), 421-422, 2017, doi:10.1007/s10528-017-9830-9.

SOUZA, D. C. L.. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 17(3), 495-503, 2015, doi: 10.1590/1983-084x/13_071.

TALEBI, R.; NOSRATI, S.; ETMINAN, A.; NAJI, M. 2018. Genetic diversity and population structure analysis of landrace and improved safflower (*Cartamus tinctorious* L.) germplasm using arbitrary functional gene-based molecular markers. **BIOTECHNOLOGY & BIOTECHNOLOGICAL EQUIPMENT** <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1499443>

Tatiana Santos et al. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesq. Agropec. Bras**, Brasília, 46(5), 499-508, 2011.

URDANIBIA, I. et al. Anti-inflammatory and antitumoural effects of *Uncaria guianensis* bark. **Journal Of Ethnopharmacology**, 150(3), 1154-1162, 2013, doi: 10.1016/j.jep.2013.10.055.

VALENTE, L. M. M. et al. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(2), 216-223, 2006, doi: 10.1590/s0102-695x2006000200015.

VALENTE, L. M. M. et al. Kaempferitrin from *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) and its Potential as a Chemical Marker for the Species. **Sociedade Brasileira de Química**, 20(6), 1041-1045, 2009.

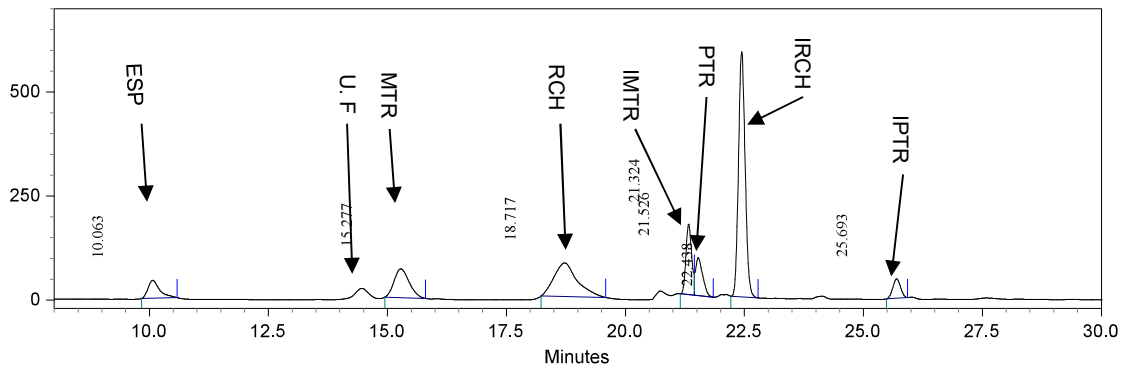
VILCHES, L.E.O. **Género *Uncaria*- Estudios botánicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis***. Lima-Perú, 1997. 3 ed.

YAMADA, T. Cryopreservation of forage crops. In: CRYOPRESERVATION of plant genetic resources projects. Japan: JICA, n. 6, 1993.

ZEVALLS-POLLITO, P. A.; TOMAZELLO FILHO, M.. Levantamento e caracterização” de duas espécies do gênero *Uncaria schreb.* (rubiaceae) correntes no estado do acre, brasil1. **Ecologia Aplicada**, 9(1-2), 19-1, 2010, doi: 10.21704/rea.v9i1-2.391.

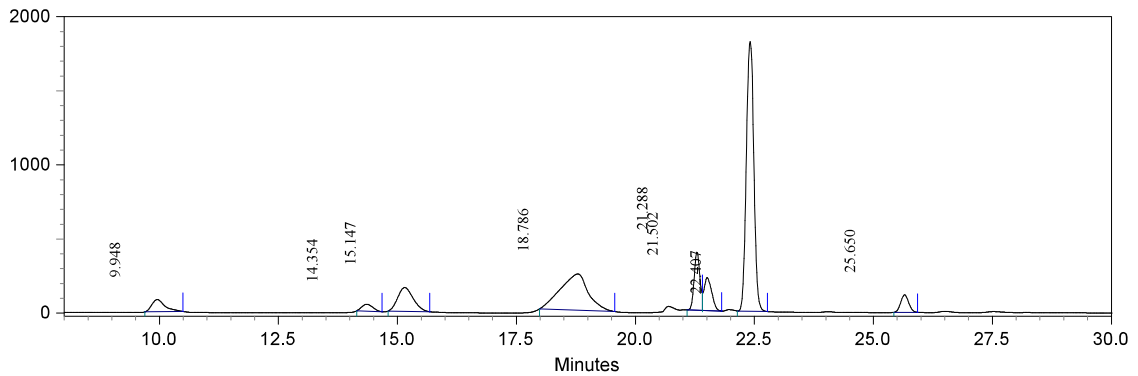
APÊNDICE

Cromatograma do indivíduo BN1 (Bannach)

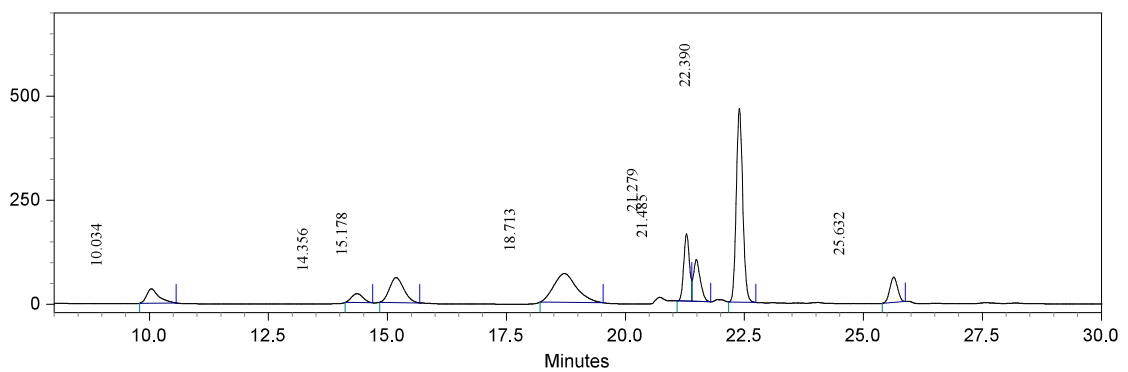


especiofilina = ESP, uncarina f = U.F, mitrafilina = MTR, rinchofilina = RCH, isomitrafilina = IMTR, pteropodina = PTR, isorinchofilina = IRCH e isopteropodina = IPTR

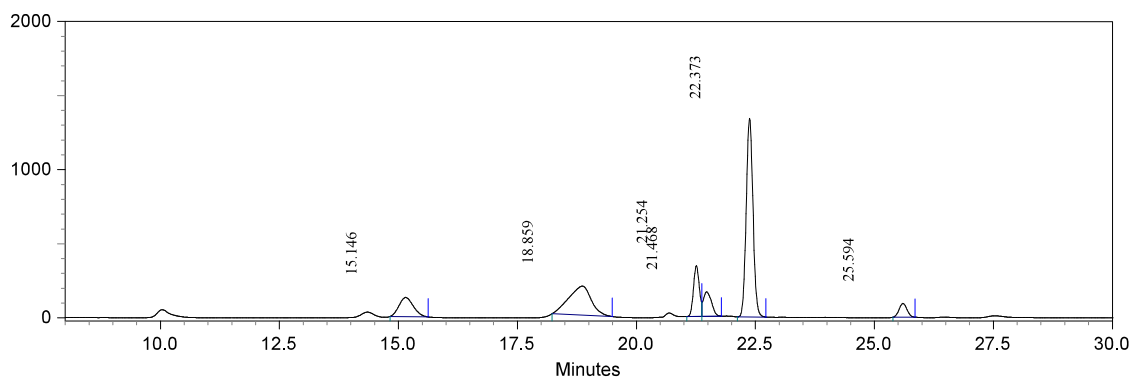
Cromatograma do indivíduo BN2 (Bannach)



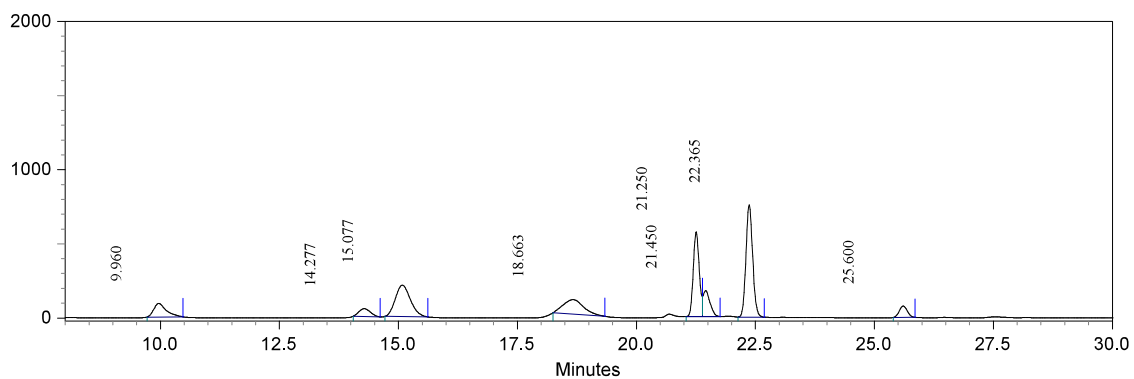
Cromatograma do indivíduo BN3 (Bannach)



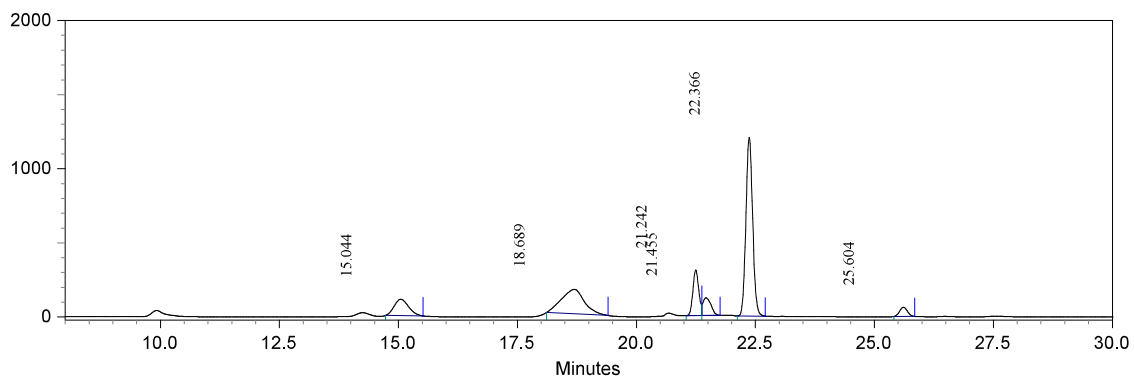
Cromatograma do indivíduo BN4 (Bannach)



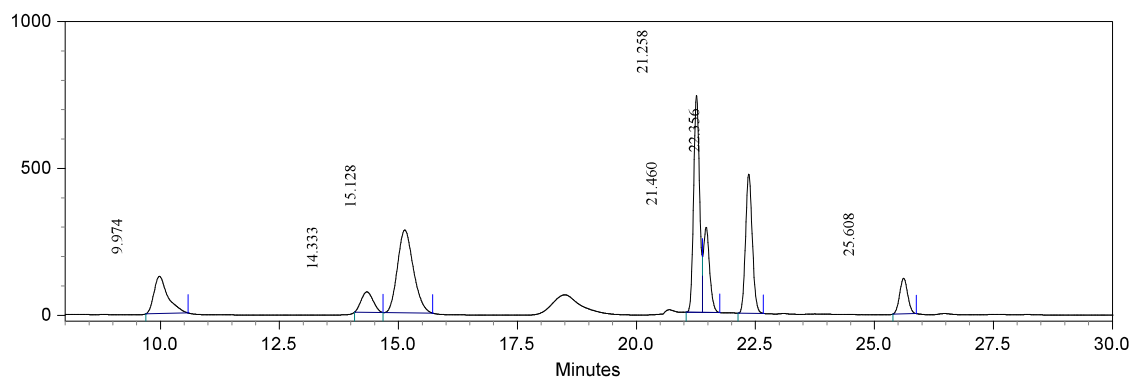
Cromatograma do indivíduo BN5 (Bannach)



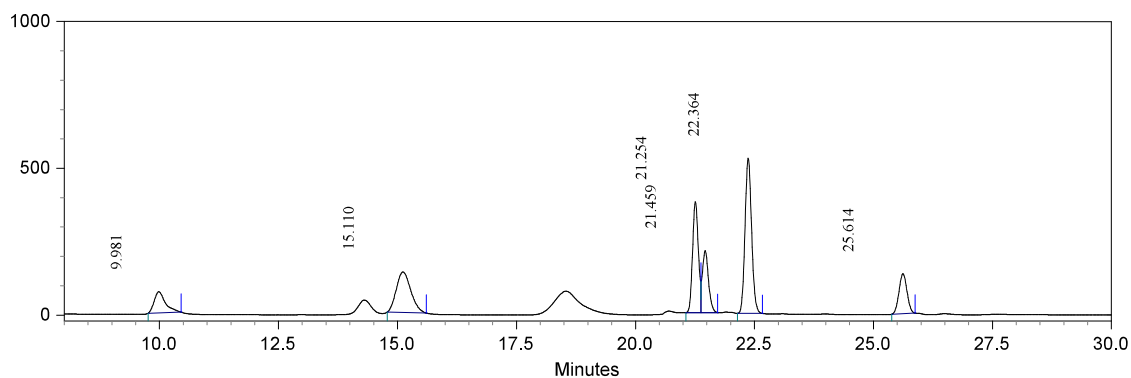
Cromatograma do indivíduo BN6 (Bannach)



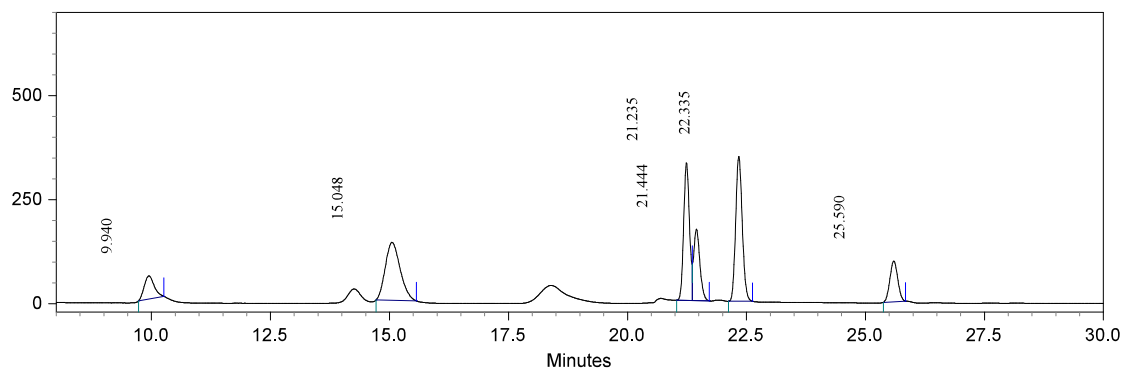
Cromatograma do indivíduo CA1 (Carlinda)



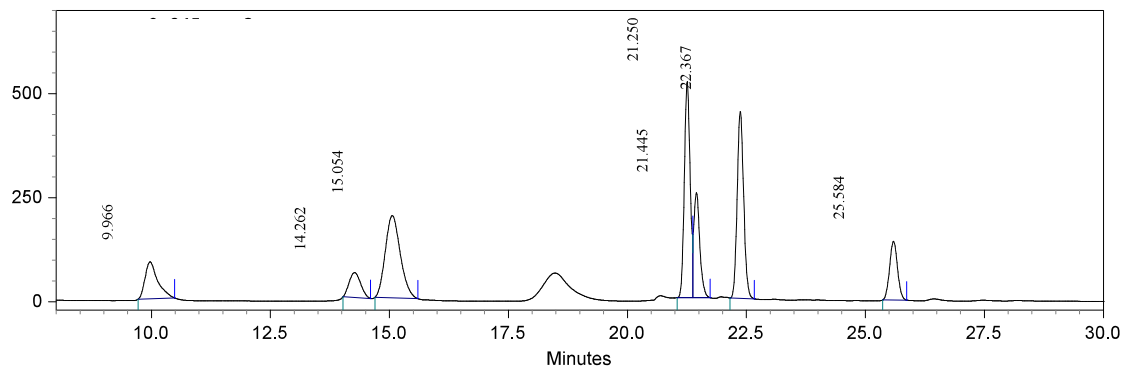
Cromatograma do indivíduo CL1 (Colider)



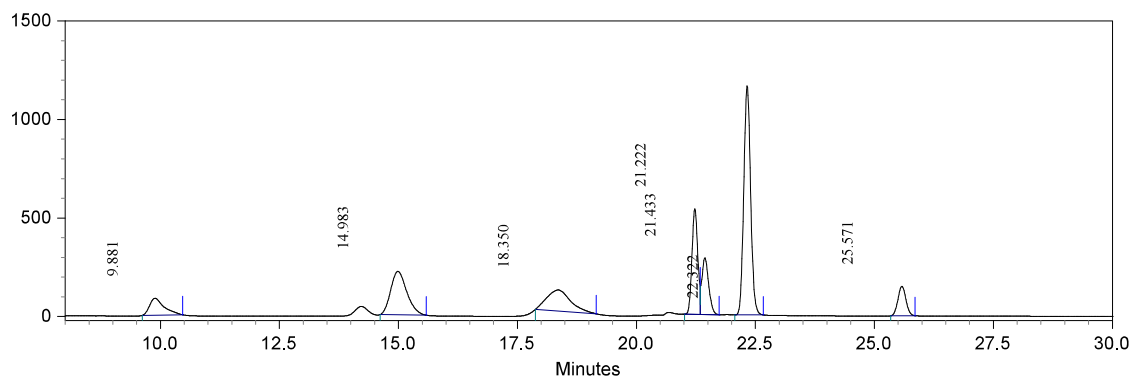
Cromatograma do indivíduo RB1 (Rio Branco)



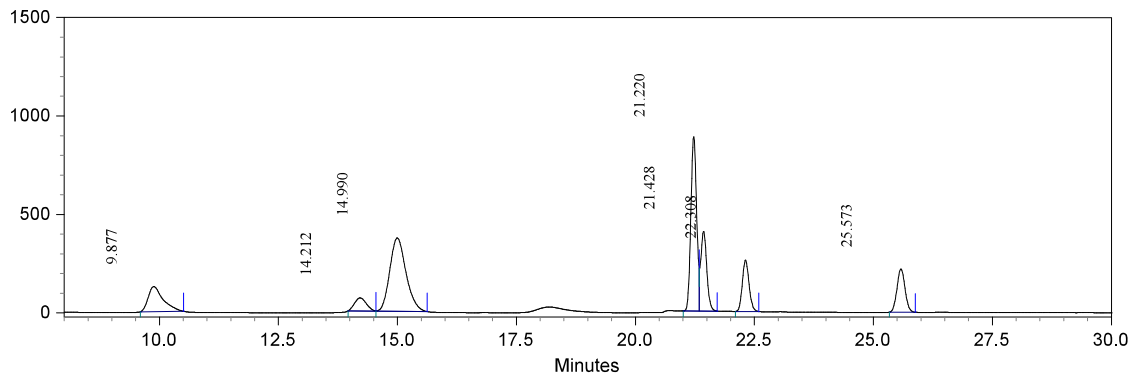
Cromatograma do indivíduo XA1 (Xapuri)



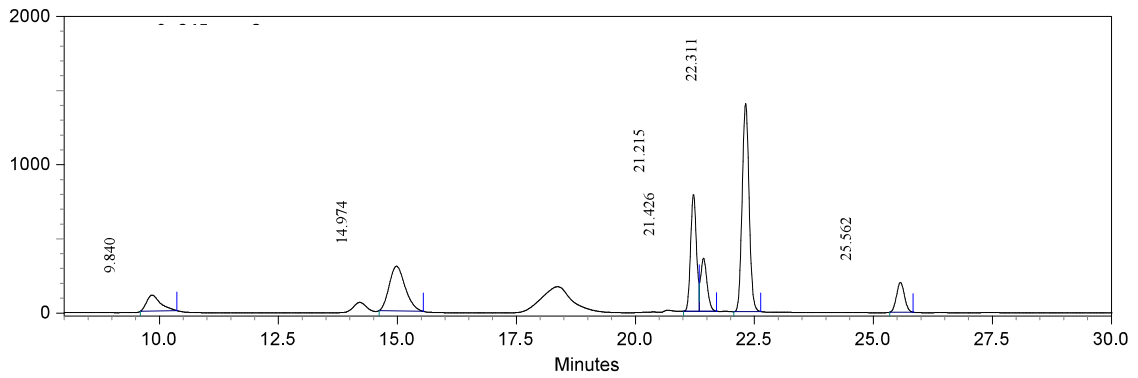
Cromatograma do indivíduo XA2 (Xapuri)



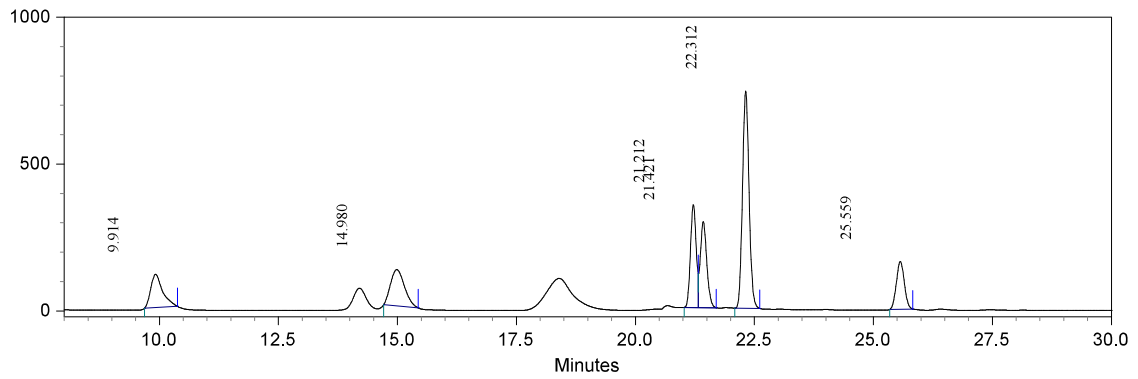
Cromatograma do indivíduo XA3 (Xapurí)



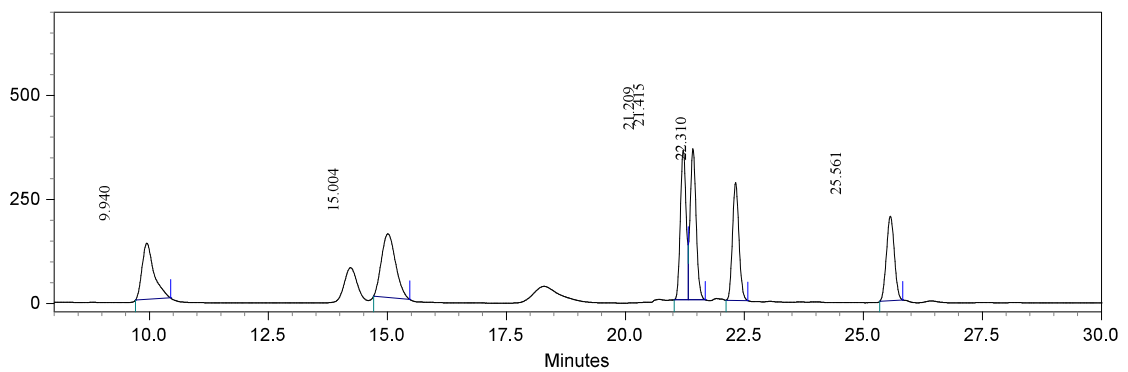
Cromatograma do indivíduo SA1 (Santana)



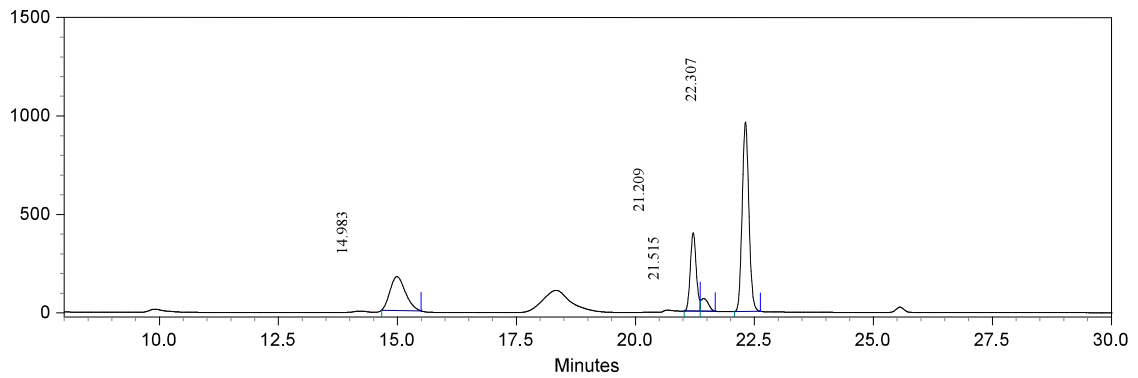
Cromatograma do indivíduo SI1 (Sinop)



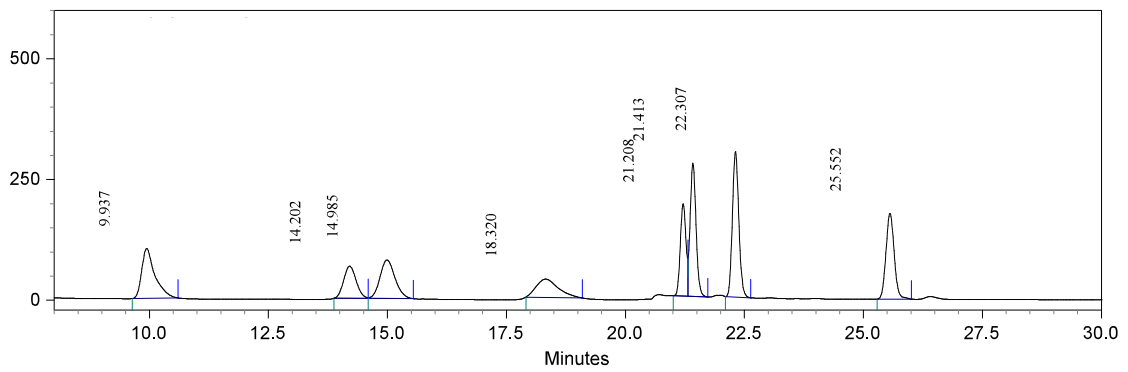
Cromatograma do indivíduo SI2 (Sinop)



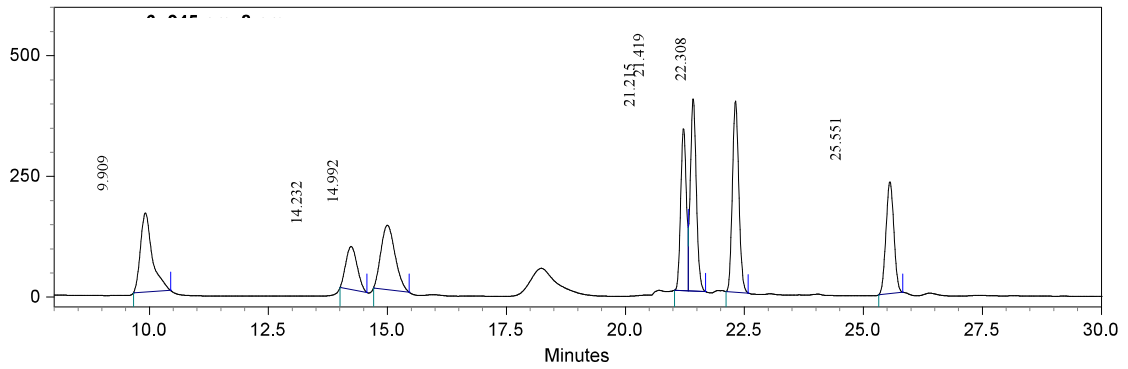
Cromatograma do indivíduo TA1 (Tarauacá)



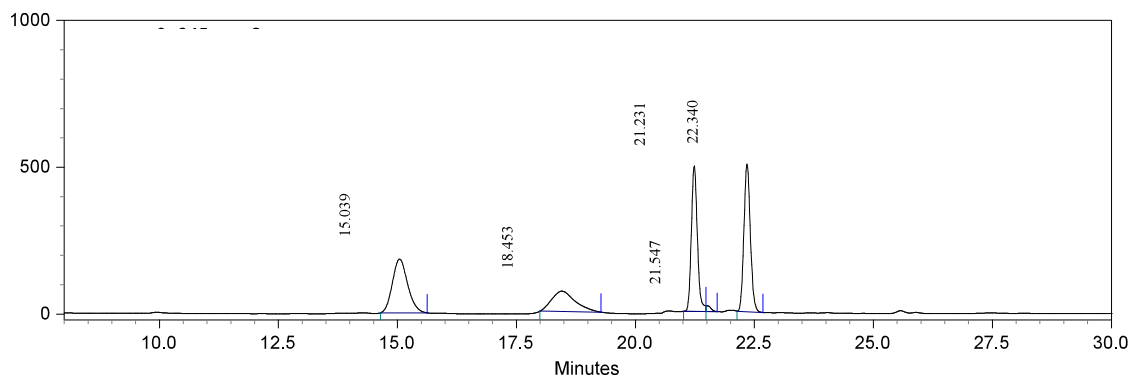
Cromatograma do indivíduo AT1 (Alta Floresta)



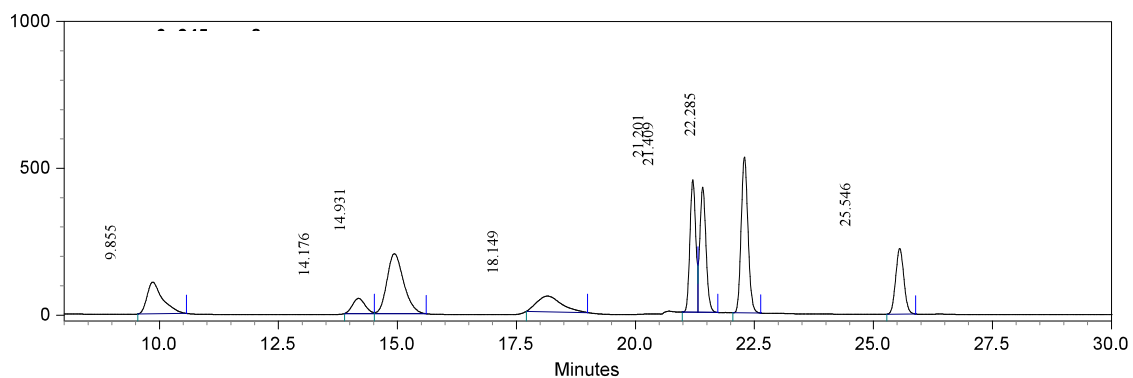
Cromatograma do indivíduo AT2 (Alta Floresta)



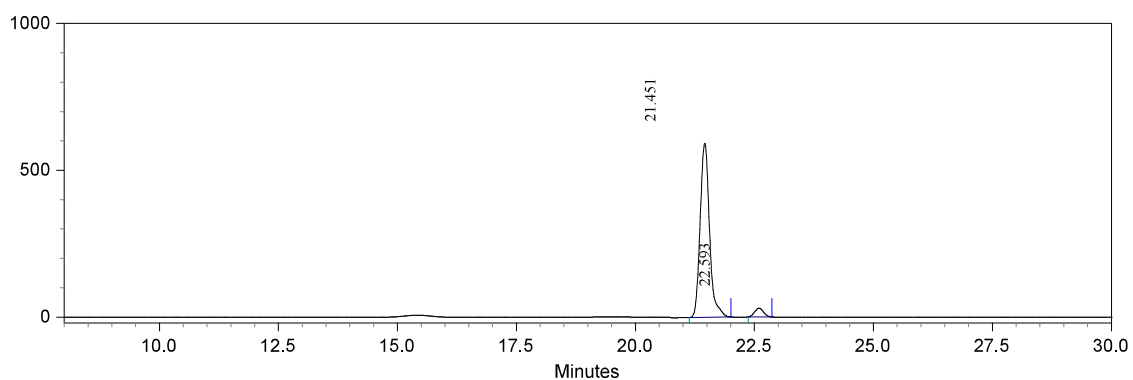
Cromatograma do indivíduo BC1 (Boca do Acre)



Cromatograma do indivíduo FE1 (Feijó)



Cromatograma do indivíduo ISOMITRAFILINA



Cromatograma do indivíduo MITRAFILINA

