



Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
Ambiental

Jaqueline Alonso da Silva

**Análises químicas, morfológicas, anatômicas e genéticas comparativas
entre três morfotipos (formas) de *Aristolochia gibertii***

Professor Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira
ORIENTADOR

Dourados

2022

Jaqueline Alonso da Silva

**Análises químicas, morfológicas, anatômicas e genéticas comparativas
entre três morfotipos de *Aristolochia gibertii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira
Área de concentração: Tecnologia Ambiental

Dourados

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

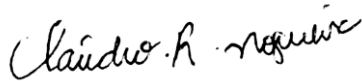
S586a	<p>Silva, Jaqueline Alonso da. Análises químicas, morfológicas, anatômicas e genéticas comparativas entre três morfotipos (formas) de <i>Aristolochia gibertii</i>. / Jaqueline Alonso da Silva. – Dourados, MS : UFGD, 2022.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Polimorfismo. 2. Morfoanatomia. 3. Quimiotipos. 4. DNA. 5. Barcode. I. Título.</p>
-------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

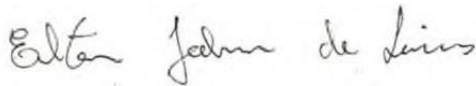
©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "**Análises químicas, morfológicas, anatômicas e genéticas comparativas entre três morfotipos (formas) de *Aristolochia gibertii***", de autoria de **JAQUELINE ALONSO DA SILVA**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira
Presidente da Banca Examinadora



Prof. Dr. Elton John de Lório
Membro Examinador (USP)



Prof.^a. Dr.^a. Lidilhone Hamerski
Membro Examinador (UFRJ)



Prof.^a. Dr.^a. Jannaina Velasques da Costa Pinto
Membro Examinador (UFSB)

Dourados/MS, 05 de setembro de 2022.

Resumo

Análises químicas, morfológicas, anatômicas e genéticas comparativas entre três formas de *Aristolochia gibertii*

Como parte de nossa busca contínua por compostos bioativos de espécies aristoloquiáceas, verificamos que *Aristolochia gibertii* Hook. apresenta potencial antiplasmódico, antimicrobiano, citotóxico/antitumoral, larvicida e inseticida. Esta planta não é endêmica do Brasil e diferenças morfológicas conspícuas têm sido observadas entre os indivíduos desta espécie. Embora *Aristolochia* spp. sejam um grupo amplamente avaliado sob diferentes pontos de vista, incluindo químico, filogenético, morfológico, estudos comparativos focados abaixo do nível de espécies são escassos. Como o esclarecimento de questões inerentes a essa lacuna é relevante no âmbito da inovação tecnológica e da distribuição e diversificação de plantas, o objetivo deste trabalho foi realizar análises químicas, morfológicas, anatômicas e genéticas comparativas entre três formas de *A. gibertii*, cultivada na UFGD e originária de três localidades geográficas distintas (F1 Mato Grosso; F2 Selvíria- MS; F3 Dourados-MS). F1 é um exemplar típico de *A. gibertii* e foi utilizado como referência. As folhas foram colhidas e imediatamente secas com sílica gel. Essas amostras foram submetidas a procedimentos de extração de DNA, seguido de etapas de amplificação e sequenciamento de dois genes cloroplastidiais – *rbcL* e *matK*. A primeira *rbcL* concluiu 100% de identificação entre as formas, demonstrando para dúvidas futuras que apesar da morfologia diferente pertencem à mesma espécie, enquanto a sequência *matK*, que segundo vários autores é uma região que pode variar, permitiu confirmar F1 a F3 como *A. gibertii*, com base nos resultados de similaridade obtidos na plataforma BOLD Systems e na exclusão de espécies classificadas que diferem morfológicamente de *A. gibertii*. Na análise da região *matK* observamos 17 sítios variáveis entre as formas, confirmando nossa hipótese de que além de diferenças morfológicas das flores a genética também apresenta variações, assim como na parte anatômica. Por meio da microscopia, foi possível identificar algumas diferenças como nas células epidérmicas das folhas de F3, os quais têm paredes anticlinais onduladas no lado adaxial e sinuosas no lado abaxial, enquanto as outras duas formas têm paredes retas em ambos os lados. A F1 apresentou características mais distintas das demais formas, apresentando cristais como drusas entre outras.

A F2 tem uma composição química quase idêntica àquela de F1, corroborando os achados morfológicos que levaram à proposta de que F1-F3 são a mesma espécie. Diferenças morfológicas significativas foram observadas entre F1-F3, principalmente em relação ao tamanho da flor e proporção do comprimento entre o lábio superior e inferior. Cerca de 2 g de folhas de cada forma foram extraídas com hexanos-EtOAc 1:1 e MeOH, sucessivamente, para dar 6 extratos, que foram analisados por RMN e UHPLC-MS/MS. Diterpenoides e kusunoquina foram encontrados como marcadores químicos de *A. gibertii*. Essa lignana de dibenzilbutirolactona foi encontrada em todas as amostras. Curiosamente, o ácido colavênico não foi detectado em F3, embora fosse o principal diterpenoide em F1 e F2. As outras semelhanças químicas e diferenças entre F1 e F3. Assim, nossos resultados preliminares indicaram que F1 a F3 são todos *A. gibertii*, que diferem não apenas morfológicamente, mas do ponto de vista genético e em termos de perfil químico.

Palavras - chave: polimorfismo, morfoanatomia, quimiotipos, DNA barcode.

ABSTRACT

Comparative chemical, morphological, anatomical, and genetic analyses between three forms from *Aristolochia gibertii*

As part of our ongoing search for bioactive compounds from aristolochiaceous species, we verified that *Aristolochia gibertii* Hook. exhibit antiplasmodial, antimicrobial, cytotoxic/antitumoral, larvicidal, and insecticidal potentials. This plant is not endemic to Brazil and conspicuous morphological differences have been observed between individuals of this species. Although *Aristolochia* spp. are a group widely assessed from different points of view, including chemical, phylogenetic, morphologic ones, comparative studies focused below species level are scarce. Since clarifying issues inherent to this gap are relevant within scope of both technological innovation and plant distribution and diversification, the aim of this work was to perform comparative chemical, morphological, anatomical, and genetic analyses between three forms (F1-F3) from *A. gibertii*, cultivated at the UFGD and originally from three separate geographic localities (F1 Mato Grosso; F2 Selvíria-MS; F3 Dourados-MS). F1 is a typical exemplar of *A. gibertii* and it was used as reference. Leaves were harvested and immediately dried using silica gel. These samples were subjected to procedures of DNA extraction, and it was followed by amplification and sequencing steps of two chloroplast genes – *rcbL* and *matK*. The first *rcbL* concluded 100% identification between the forms, demonstrating for future doubts that despite different morphology they belong to the same species, while the *matK* sequence, which according to several authors is a region that can vary, allowed us to confirm F1 and F3 as *A. gibertii*, based on similarity results obtained on the BOLD Systems platform and on the exclusion of classified species that morphologically differ from *A. gibertii*. In the analysis of the *matK* region, we observed 17 variable sites between the presents, confirming our hypothesis that in addition to morphological differences in the flowers and genetic variations, as well as in the anatomical part. Through microscopy, it was possible to identify some differences as other epidermal cells of leaves in F3 have wavy anticlinal walls on the adaxial side and sinuous on the abaxial side, while the two have straight walls on both sides. The F1 presented characteristics different from the other forms, presenting characteristics more like druses among others.

The F2 had a chemical composition almost identical to that of F1, corroborating the morphological findings which led to the proposal that F1-F3 are the same species. Significant morphological differences were observed between F1-F3, mainly in relation

to the size of the flower and length proportion between their upper and lower lips. About 2 g of leaves of each form were extracted with hexanes-EtOAc 1:1 and MeOH, successively, to give 6 extracts, which were analysed by NMR and UHPLC-MS/MS. Diterpenoids and kusunokinin were found as chemical markers of *A. gibertii*. This dibenzylbutyrolactone lignan was found in all specimens. Curiously, kolavenic acid was not detected in F3, albeit it was the major diterpenoid in F1 and F2. The other chemical similarities and differences between F1 to F3. Thus, our preliminary results indicated that F1 to F3 are all *A. gibertii*, which differ not only morphologically but from a genetic perspective and in terms of chemical profile.

Keywords: polymorphism, morphoanatomy, chemotypes, DNA barcoding.

Sumário

1	Introdução	9
2	Revisão de literatura	14
2.1	Aristolochiaceae	14
2.2	Variabilidade Intraespecífica	15
2.3	Morfologia	17
2.4	Anatomia	19
2.5	Genética	20
2.6	Química	25
3	Objetivos	28
3.1	Geral	28
3.2	Específico	28
4	Metodologia	29
4.1	Morfologia	29
4.1.1	Morfometria	29
4.2	Anatomia	29
4.3	Genética	30
4.3.1	Coleta das amostras	30
4.3.2	Extração do DNA	30
4.3.3	Amplificação e sequenciamento das amostras	30
4.3.4	Alinhamento das sequências e análises	31
4.4	Química	32
4.4.1	Procedimentos experimentais gerais	32
4.3.4	Material vegetal e identificação	32
4.3.5	Extração	32
4.3.6	Análises de RMN	32
4.3.7	Análises UHPLC-MS/MS	33
5	Resultados e Discussão	34
5.1	Morfologia	34
5.1.1	Análise Morfométrica	34
5.2	Anatomia	38

5.2.1	Análise microscópica	38
5.2.2	Análise histoquímica	46
5.3	Genética	49
5.3.1	Identificação das sequências pelo GenBank e BLAST	49
5.3.2	Análise das sequências do gene <i>matK</i> e <i>rbcL</i>	49
5.3.3	Análise comparativa dos dendrogramas	56
5.4	Química	58
5.4.1	Compostos de RMN de ^1H e de ^{13}C e UHPLC-MS/MS	58
5.4.2	Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C	58
5.4.3	Análise dos compostos	60
6	Considerações Finais	73
7	Referências	75

Lista de Figuras

Figura 1. Três flores das respectivas formas de <i>Aristolochia gibertii</i> , F1 (Mato Grosso), F2 (Selvária), F3 (Dourados) respectivamente.	36
Figura 2. Flores da Forma 1 (Mato Grosso) de <i>Aristolochia gibertii</i> .	37
Figura 3. Flores da Forma 2 (Selvária) de <i>Aristolochia gibertii</i> .	37
Figura 4. Flores da Forma 3 (Dourados) de <i>Aristolochia gibertii</i> .	37
Figura 5. Micromorfologia de <i>Aristolochia gibertii</i> – folhas em vista de superfície.	40
Figura 6. Microscopia de folhas (lâmina, nervura central e pecíolo) de <i>Aristolochia gibertii</i> em corte transversal.	42
Figura 7. Microscopia de caules de <i>Aristolochia gibertii</i> em corte transversal.	44
Figura 8. Imagem FESEM e espectro EDS da forma F3-D (a), F1-M (b) e F2-S (c).	46
Figura 9. Histoquímica de folhas e caules de <i>Aristolochia gibertii</i> .	47
Figura 10. Alinhamento das sequencias <i>matK</i> das três amostras e um acesso (AB060792.1) de <i>A.gibertii</i> .	53
Figura 11. Alinhamento das sequencias <i>rbcL</i> das três amostras de <i>A.gibertii</i> .	55
Figura 12. Análise de agrupamento baseada no método Neighbor-Joining com os dados das amostras (formas) de <i>Aristolochia gibertii</i> usando a região <i>matK</i> .	57
Figura 13. Substancias majoritárias encontradas nas respectivas formas de <i>A. gibertii</i> .	60
Figura. 14: Cromatograma com correção de linha de base de varredura completa (CLBs) dos extratos E1 a E3 no modo ESI positivo. a) CLB de E1, b) CLB de E2, c) CLB de E3, e d) sobreposição dos CLBs de E1 a E3.	69
Figura. 15: Cromatograma com correção de linha de base de varredura completa (CLBs) dos extratos E1 a E3 no modo ESI negativo. a) CLB de E1, b) CLB de E2, c) CLB de E3, e d) sobreposição dos CLBs de E1 a E3.	70
Figura.16: Cromatograma com correção de linha de base de varredura completa (CLBs) dos extratos E4 a E6 no modo ESI positivo. a) CLB de E4, b) CLB de E5, c) CLB de E6, e d) sobreposição dos CLBs de E4 a E6.	71

Figura. 17: Cromatograma com correção de linha de base de varredura completa (CLB's) dos extratos E4 a E6 no modo ESI negativo. a) CLB de E4, b) CLB de E5, c) CLB de E6, e d) sobreposição dos CLB's de E4 a E6.

Índice de Tabelas

Tabela 1. Morfometria das três Formas de <i>A.gibertii</i>	35
Tabela 2. Relação do comprimento dos lábios superior/inferior das três formas de <i>A. gibertii</i>	36
Tabela 3. Características micromorfológicas comparativas entre as formas de <i>Aristolochia gibertii</i>	39
Tabela 4. Probabilidade de substituições nucleotídicas (linhas x colunas), em valores percentuais, calculados para o gene <i>matK</i> das três amostras e um acesso (AB060792.1) de <i>A.gibertii</i> , de acordo com o modelo de substituição de T92 Tamura 3-parameter (Tamura <i>et al.</i> , 2021).	51
Tabela 5. Probabilidade de substituições nucleotídicas (linhas x colunas), em valores percentuais, calculados para o gene <i>rbcL</i> das três amostras e um acesso (AB060792.1) de <i>A.gibertii</i> , de acordo com o modelo de substituição de T92 Tamura 3-parameter (Tamura <i>et al.</i> , 2021).	52
Tabela 6. Comparação das distâncias pareadas “Pairwise” entre as sequencias barcodes de <i>matK</i> das formas de <i>A. gibertii</i> . A similaridade foi calculada para um determinado par de amostras, esse é expresso em porcentagem e destacada na cédula abaixo.	56
Tabela 7. Relação comparativa dos compostos químicos entre as formas de <i>A. gibertii</i> .	65
Tabela 8. Constituintes químicos encontrados nos extratos E1 a E6 por meio de análises UHPLC-ESI-MS/MS.	66

1 Introdução

A diversidade de plantas sempre foi alvo de grande interesse para a humanidade ao longo dos tempos, principalmente pelas inúmeras variedades e formas distintas que existem na natureza (SNELL; BECKMAN; FRICKE; LOISELLE *et al.*, 2019).

Os efeitos reguladores desta mudança natural de diversidade, que existe entre diferentes espécies, conduzem a uma macroevolução das plantas, seja em origem ou extinção acima do nível de espécie, através da seleção natural, e esta diversidade de desenvolvimento está implícito à taxonomia e filogenia das plantas descritas hoje (SALAZAR; NAVARRO-CERRILLO; CRUZ; VILLAR, 2018).

Além disso, existe uma considerável variação de desenvolvimento em muitos indivíduos de uma mesma espécie, refletindo uma microevolução que ocorre dentro de populações através de mutação, deriva, seleção natural e fluxo gênico, o que pode refletir a adaptação a diferentes ambientes e é a origem da especiação das plantas (ZABOTTI; LEITE; DELLA JUSTINA, 2021). Os indivíduos de uma espécie podem diferir em atributos como tamanho, comportamento ou características fisiológicas, variações essas que são substanciais para adaptação e sobrevivência (BEZERRA, 2020), os animais muitas vezes podem se mudar para condições menos competitivas para sobreviver, uma semente deve germinar e se estabelecer onde cai (JONES, 1967).

Os fatores abióticos e a seletividade ambiental imposta pelo ecossistema às plantas fazem com essas tenham que se adaptar a novas restrições ou simplesmente as mudanças que lhe são impostas. Essas adaptações promovem variações na expressão de alguns caracteres, esses podem ser vistos em níveis fenotípicos, fisiológicos, morfológicos ou traços comportamentais, constituindo assim características funcionais que irão influenciar nas suas estratégias ecológicas, de reprodução e sobrevivência, o que pode ocorrer a nível interespecífico e intraespecífico (LÁZARO-NOGAL; MATESANZ; GODOY; PÉREZ-TRAUTMAN *et al.*, 2015; SALAZAR; NAVARRO-CERRILLO; CRUZ; VILLAR, 2018).

As plantas são organismos sésseis que dependem de vetores para que a polinização e a dispersão aconteçam, eles podem ser abióticos como ar e água ou bióticos como as moscas (HOELTGEBAUM, 2017). A relação entre as plantas e seus polinizadores possuem uma forte interação co-evolutiva, através do tempo dentro das Angiospermas, essa relação já foi descrita como sendo um dos principais impulsionadores que levaram a

grande e rápida diversificação do grupo no planeta (FENSTER; ARMBRUSTER; WILSON; DUDASH *et al.*, 2004; VAN DER NIET; JOHNSON; EVOLUTION, 2012).

Os caracteres florais apresentam um importante papel no contexto das inúmeras variedades e formas existentes hoje no mundo, a flor além de ser o órgão reprodutivo da planta, ela também oferece recursos como pólen, néctar, óleos e resinas, para atrair seus potenciais polinizadores (BARÔNIO; DA CUNHA GUIMARÃES; DE OLIVEIRA; MELO *et al.*, 2018; FAEGRI; VAN DER PIJL, 2013; RECH; AGOSTINI; OLIVEIRA; MACHADO, 2014). Distintas formas morfológicas de flores viabilizam uma maior precisão na transferência de pólen entre flores, dado o ajuste morfológico estabelecido com os polinizadores (ARMBRUSTER, 2014; CARDOSO; VIANA; MATIAS; FURTADO *et al.*, 2018). Assim variadas estratégias reprodutivas são expressas em razão da otimização da reprodução cruzada destas plantas, principalmente naquelas que exibem demandas conflitantes neste processo (HOELTGEBAUM, 2017). Espécies do gênero *Aristolochia* exibem uma série de estratégias reprodutivas que evoluíram independentemente, por exemplo, termogênese, ressupinação e polinização por armadilha, devido à disposição estratégica de seus tricomas que se dispõem para o interior ao redor do ginostêmio, para prender o polinizador temporariamente na flor (FERNANDEZ; FERRERAS; FARRELL; DE MEDEIROS *et al.*, 2019).

Muitas espécies de *Aristolochia* são similares morfológicamente, tornando sua identificação no campo mais árdua, além da diferença morfológica encontrada entre as espécies desse gênero, existe também as diferenças morfológicas entre os indivíduos de uma mesma espécie, e por estas plantas serem usadas indiscriminadamente em mercados populares sem a devida identificação botânica, para os mais diversos fins, até mesmo medicinal, se faz necessário um estudo mais específico a nível infragenérico para uma melhor classificação, compreensão e identificação destas espécies (MAGALHÃES, 2019). Isso é, talvez, surpreendente, dado que a variação de características entre os indivíduos de uma população pode alterar as interações com outras espécies e, portanto, deve ser a chave para entender a dinâmica de uma comunidade (UMAÑA; ZHANG; CAO; LIN *et al.*, 2018).

Sobre o conhecimento acerca desse tema existe pouco estudo na literatura, a maioria dos trabalhos que levam em consideração as diferenças intraespecíficas nas espécies de plantas acabam por focar em vertentes como ecologia funcional desses morfotipos no ambiente, seus efeitos na sobrevivência das populações, e na interação com a comunidade, na química se destaca por exemplo a comparação e identificação de

constituintes químicos de óleos essenciais, e quando falamos do gênero *Aristolochia* a nível infragenerico os trabalhos se tornam ainda mais escassos (MARTINS; MASSARA; BARROSO, 2020).

Francisco (FRANCISCO; MESSIANO; LOPES; TININIS *et al.*, 2008) investigaram a variabilidade intraespecífica mediante análise de dados obtidos de óleos essenciais para classificar e identificar 10 espécies do gênero *Aristolochia*, os pesquisadores também compararam os resultados com a morfologia e a taxonomia do gênero para obterem evidências de possível significância quimiotaxonômica, eles obtiveram resultados significativos e ainda conseguiram isolar uma substância ainda não descrita na época a filigenina em *A. malmeana*.

Alguns autores como Hoehne, Neinhuis, Ohi-Tom e Fernandes (FERNANDES; SILVA; LOPES; DE ALMEIDA *et al.*, 2021; HOEHNE, 1942; NEINHUIS; WANKE; HILU; MÜLLER *et al.*, 2005; OHI-TOMA; SUGAWARA; MURATA; WANKE *et al.*, 2006), destacam que existe uma preocupação quanto ao perigo potencial de medicamentos tradicionais à base de folhas e caules de espécies da família Aristolochiaceae, visto que o próprio nome da família vem a ser: *aristos* = melhor; *lochios* = descarga uterina pós-parto ou expulsão da placenta (HOEHNE, 1942). Muitas espécies de *Aristolochia*, são conhecidas como ‘papo-de-peru’, ‘cipó-mil-homens’, ou simplesmente ‘milome’, essas, muitas vezes são utilizadas para tratar dor de estômago e intestino, além de serem utilizadas para induzir o parto, ou abortos. Por conta dos malefícios causados à saúde pelo uso de chás a base de espécies de *Aristolochia* a OMS (Organização Mundial de Saúde) proibiu o uso dos princípios ativos dessas plantas, mas ainda é possível cultivar a planta e encontrá-la à venda (FREITAS; ALVES-ARAÚJO, 2017).

Apesar da problemática na questão da saúde pública, os constituintes químicos da família Aristolochiaceae, como as lignanas, têm demonstrado diferentes atividades biológicas importantes ao longo do tempo, como demonstrado em alguns trabalhos da área. Lopes (LOPES; SILVA; VAROTTI; ROSÁRIO *et al.*, 2007) com atividade antimalárica de compostos isolados de *Holostylis reniformis* Duque. (Aristolochiaceae) que demonstrou um alto grau de resposta contra o parasita *Plasmodium falciparum*. Pereira (PEREIRA; AVILA; DO CARMO; SIQUEIRA *et al.*, 2018) com avaliação do potencial do extrato metanólico, de frações e substâncias isoladas de *Aristolochia triangularis* Cham. para verificar a atividade antimicrobiana/antimicobacteriana, onde todos os extratos testados apresentaram um grau promissor de atividade

antimicobacteriana, principalmente contra *Mycobacterium abscessos*. Nascimento (NASCIMENTO; MURATA; BORTOLI; LOPES, 2004) com bioensaios para determinar a atividade inseticida de extratos etanólicos e acetona de *Aristolochia pubescens* Willd. contra *Anticarsia gemmatalis* (lagarta-da-soja), nele foi determinado que o extrato acetônico apresentou a maior atividade, sendo um potencial produto bioinseticidas. Uma pesquisa similar foi conduzida por Messiano (MESSIANO; VIEIRA; MACHADO; LOPES *et al.*, 2008) que avaliaram a atividade inseticida de extratos hexânicos de raízes e folhas de *Aristolochia malmeana* contra *Anticarsia gemmatalis*. Constataram que o extrato da raiz foi o mais ativo e este causou 50% de mortalidade larval. De Pascoli & Lopes (DE PASCOLI; NASCIMENTO; LOPES, 2006) isolaram *cis*-cubebina, *trans*-cubebina e bicubebina de *A. pubescens* e *A. lagesiana*. A cubebina é um tipo de lignana que já foi reconhecida por reduzir a viabilidade larval em *Anticarsia gemmatalis*, por dar origem a insetos adultos malformados e por sua atividade anti-alimentar (HARMATHA; DINAN, 2003; NASCIMENTO; MURATA; BORTOLI; LOPES, 2004). Os extratos brutos e as substâncias de *Aristolochia cymbifera* já foram avaliados quanto a sua atividade *in vitro* contra *Schistosoma mansoni*, e estes exibiram efeitos antiesquistossomóticos que foram letais para todos os vermes machos e fêmeas e do potencial promissor dos compostos contra os parasitas adultos (COSTA; ZUZA DA SILVA; COSTA; SILVA *et al.*, 2020).

Dentro do gênero *Aristolochia* existe um grande potencial biológico nas mais amplas perspectivas de estudo como supracitado, e para se explorar com maior eficiência e de forma racional o potencial das espécies, faz-se necessário uma maior clareza sobre a genética e a variação dos compostos químicos, e suas particularidades nos níveis infragenéricos dentro da pluralidade dos morfotipos nas inúmeras espécies de *Aristolochia*, para assim ter maior controle e identificação das variedades.

Essas formas ou morfotipos podem ser avaliados de forma genética, química, anatômica e morfológica para tentar assim, averiguar mais diferenças ou similaridades dos caracteres. Pois para se pensar num produto natural é necessário um detalhamento e consistência na composição química e constância da produção de metabólitos, pois esses podem variar por inúmeros fatores já descritos na literatura como temperatura, altitude, condição hídrica, exposição solar, tempo de vida, entre outros (ERNST; SILVA; SILVA; VÊNIO *et al.*, 2014; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; WOLFENDER; RUDAZ; HAE CHOI; KYONG KIM, 2013). Além desses, os morfotipos também acabam por alterar essa produção e constância dos

compostos químicos, entre indivíduos de uma mesma espécie, toda variação morfológica é, em última análise, de natureza química (JONES, 1967).

Assim, à luz da crescente produção pelo conhecimento e exploração racional das espécies da família Aristolochiaceae no âmbito agropecuário, fitoterapêutico ou em produtos étnico farmacológicos, e pelas particularidades como a dificuldade de identificação das espécies e seus morfotipos, ou também chamados de Formas nesse trabalho, além da circunstância taxonômica, e o número insuficiente de trabalhos sobre *Aristolochia gibertii*. O objetivo do trabalho foi investigar a variabilidade intraespecífica dos indivíduos originais de três populações, de regiões geográficas distantes, Forma 1 da localidade de Mato Grosso, Forma 2 da localidade de Selviria- MS e Forma 3 da localidade de Dourados-MS, da espécie *Aristolochia gibertii* que estão sendo cultivados sob condições semi-controladas no Jardim de Plantas Medicinais da Universidade Federal da Grande Dourados, por meio de estudos morfológicos, anatômicos, genéticos e químicos.

2 Revisão de literatura

2.1 Aristolochiaceae

Dentro do grupo das Angiosperma temos o clado designado como Magnoliidae, que de acordo com o APG IV (GROUP; CHASE; CHRISTENHUSZ; FAY *et al.*, 2016) possui quatro ordens que são: Magnoliales, Laurales, Piperales, Canellales. Dentro da ordem Piperales estão inseridas três famílias: Sauraceae, Piperaceae, Aristolochiaceae. Recentemente, a família Aristolochiaceae passou a incorporar as famílias Asaraceae, Hydnoraceae e Lactoridaceae, que agora passam a ser subfamílias dentro de Aristolochiaceae. Essa mudança gerou muitas discussões, mas alguns autores especialistas da ordem Piperales discordam.

O APG IV tomou esta decisão com base em uma pesquisa com especialistas em taxonomia de angiospermas, abordando vários aspectos da classificação (CHRISTENHUSZ; VORONTSOVA; FAY; CHASE, 2015). Porém de acordo com trabalhos recentes de filogenômica de Jost (JOST; SAMAIN; MARQUES; GRAHAM *et al.*, 2021) Asaraceae são irmãs do clado de Aristolochiaceae e Lactoridaceae, sendo todas as famílias então monofiléticas, a reconstrução da árvore baseada nos *locus* nucleares mostrou o clado Lactoridaceae e Asaraceae, sendo irmão de Aristolochiaceae e não como subfamílias, tornando a ordem Piperales monofilético.

Horner (HORNER; SAMAIN; WAGNER; WANKE, 2015) também classificou Piperales como possuindo seis famílias com morfologias distintas, todas as quais estudos anteriores haviam se recuperado como monofiléticas. Agrupando a ordem Piperales em seis famílias distintas e 16 gêneros sendo elas **Piperaceae** (*Piper*, *Peperomia*, *Manekia*, *Verhuellia* e *Zippelia*) **Saururaceae** (*Anemopsis*, *Gymnotheca*, *Houttuynia*, e *Saururus*) essas anteriores não possuem perianto, **Aristolochiaceae** (*Aristolochia*, *Thottea*), **Asaraceae** (*Asarum*, *Saruma*), **Hydnoraceae** (*Prosopanche* e *Hydnora*) e **Lactoridaceae** (*Lactoris*) essas anteriores possuem perianto (JOST; SAMAIN; MARQUES; GRAHAM *et al.*, 2021).

Piperales é uma das maiores ordens do grupo das angiospermas, compreendendo mais de 4.200 espécies em 16 gêneros com ocorrência em ambientes tropicais e temperados (HORNER; SAMAIN; WAGNER; WANKE, 2015; JOST; SAMAIN; MARQUES; GRAHAM *et al.*, 2021).

A família Aristolochiaceae compreende dois gêneros que são *Aristolochia* e *Thottea*, Aristolochiaceae (Piperales) é constituída por aproximadamente 600 espécies,

das quais 560 pertencem ao gênero *Aristolochia* (GONZÁLEZ; MONZÓN-SIERRA, 2022; GONZÁLEZ; PABÓN-MORA, 2017; GONZÁLEZ, 2012), sendo o Brasil representado por 83 espécies, 39 delas na Mata Atlântica, que é um dos hotspots para o gênero, 35 espécies na Amazonia, 36 espécies no Cerrado (BARROS; SILVA-ARIAS; FREGONEZI; TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2015; FERNANDES; SILVA; LOPES; DE ALMEIDA *et al.*, 2021; FREITAS; ALVES-ARAÚJO, 2017). *Aristolochia* está distribuído em sua maioria na região tropical e subtropical, com exceções ocorrendo no Canadá, Escandinávia e Japão (KUO; LI; WU; MEDICINE, 2012). O gênero *Aristolochia* é dividido em três subgêneros: *Aristolochia* subg. *Aristolochia* L., *A.* subg. *Pararistolochia* Hutch & Dalz. e *A.* subg. *Siphisia* Raf. Hoehne, 1942

A espécie em questão do trabalho se encontra na família Aristolochiaceae de acordo com González e González & Stevenson (GONZÁLEZ; STEVENSON, 2002; GONZÁLEZ; PLANTS, 1999), subfamília Aristolochioideae, gênero *Aristolochia*, subgênero *Aristolochia* L, seção *Gymnolobus*, subseção *Hexandrae*, serie *Hexandrae*, subsérie *Hexandrae*, *Aristolochia giberti*.

As características morfológicas que alocam a espécie nesse grupo são, no subgênero *Aristolochia* a presença de perianto 1-2 lobado, com 5-6 lobos estigmáticos, presença de tricomas no interior do tubo e fruto deiscente. Seção *Gymnolobus*, subseção *Hexandrae* possuir 6 carpelos e 6 estames, a série *Hexandrae* é caracterizada pela presença de inflorescências em racemo ou, frequentemente, apenas uma flor isolada, pecíolos e pedúnculos sem zona basal de abscisão, frutos com septos inteiros e sementes não aladas ou 1-aladas, a subsérie *Hexandrae* tem flores axilares, isoladas e bracteadas (GONZÁLEZ, 1991; GONZÁLEZ, 1998; GONZÁLEZ, 1997; GONZÁLEZ GARAVITO, 1990)

2.2 Variabilidade Intraespecífica

Na variação intraespecífica ou variabilidade intraespecífica de atributos funcionais (intraspecific trait variation - ITV) a variabilidade individual do espécime é uma importante fonte de variabilidade funcional na comunidade de plantas (VIOLLE; NAVAS; VILE; KAZAKOU *et al.*, 2007). O reconhecimento do indivíduo e sua importância dentro da sua população é necessária para a compreensão das inferências no ecossistema dessa variabilidade funcional intraespecífica (VFI), dos processos ecológicos

e evolutivos, e assim delinear e entender melhor o emaranhado de relações intra e interespecíficas (SIEFERT; VIOLLE; CHALMANDRIER; ALBERT *et al.*, 2015). A variação intraespecífica dos atributos funcionais é importante para a estruturação das comunidades, pois a variação nos atributos funcionais pode levar a diferentes demandas de recursos e contribuir para a coexistência de espécies em uma comunidade (ALBERT; THUILLER; YOCCOZ; SOUDANT *et al.*, 2010).

A variabilidade intraespecífica é o resultado da variação genética e da plasticidade fenotípica. Essas variações podem ser em relação a morfologia como tamanho e estruturas, fisiologia ou comportamento dos indivíduos, e esses caracteres são propriedades funcionais que exercem papel direto ou indireto no desenvolvimento individual de crescimento populacional e reprodutivo e também nas relações com outras espécies (MCGILL; ENQUIST; WEIHER; WESTOBY *et al.*, 2006; VIOLLE; NAVAS; VILE; KAZAKOU *et al.*, 2007).

O interesse na VFI está ligado à sua relação com o nicho ecológico das espécies, esta relação tem várias implicações para os processos ecológicos e evolutivos. Entre os efeitos que têm sido estudados em plantas, sua relação com a amplitude de nicho (HART; SCHREIBER; LEVINE, 2016; VIOLLE; ENQUIST; MCGILL; JIANG *et al.*, 2012), seu papel na capacidade das espécies de ocorrer em diferentes ambientes e condições abióticas e também na determinação da dimensão e da distribuição geográfica (HERMANT; PRINZING; VERNON; CONVEY *et al.*, 2013; SULTAN, 2001).

As variações intraespecíficas são reflexos de duas possíveis estratégias: competição intraespecífica e competição interespecífica (UMAÑA; ZHANG; CAO; LIN *et al.*, 2015). Mas essa variação também pode ocorrer por conta de uma adaptação local, que leva à alteração de valores individuais de caracteres em resposta as interações bióticas e a pressões abióticas ou a ambos (UMAÑA; ZHANG; CAO; LIN *et al.*, 2018).

Em VFI, a área foliar é o atributo funcional mais útil e fácil de se caracterizar, depois vem a altura das plantas, concentração de nitrogênio das folhas e o conteúdo de matéria seca foliar (NOBRE, 2021). O autor Wright (WRIGHT; REICH; WESTOBY; ACKERLY *et al.*, 2004) descreveu a existência de um espectro econômico global da folha em que as relações generalizáveis entre os atributos da folha são estabelecidas para as plantas. Perfis econômicos de folhas demonstram uma troca típica de planta: a capacidade de crescer rapidamente versus o uso mais conservador dos recursos disponíveis, então a caracterização funcional da folha é muito útil para identificar diferentes estratégias de

utilização dos recursos vegetais (WRIGHT; REICH; WESTOBY; ACKERLY *et al.*, 2004).

Os estudos acerca da variabilidade intraespecífica dentro do gênero *Aristolochia* é de grande interesse taxonômico, devido aos casos já descritos na literatura, como das espécies *Aristolochia malmeana* Hoehne, *Aristolochia esperanzae* variedade *major* (Hassler) Ahumada e *Aristolochia loefgrenii* Hoehne, antes, essas espécies foram descritas como distintas uma das outras, porém trabalhos subsequentes demonstraram que essas são na verdade heterotipos, formas de *Aristolochia esperanzae* Kuntze (LORENZO; PERRET; AHUMADA, 2010; LUBER; TULER; LEITE; CHRIST *et al.*, 2016), outra descrição é o da *Aristolochia trilobata* que tem inúmeros sinônimos como *Aristolochia appendiculata*, *A. caracasana*, *A. caudata*, *A. macroura*, *A. trifida*, *A. triloba*, *Howardia macroura* e *Howardia trifida*, antes espécies separadas, um trabalho recente de Gonzalez (GONZÁLEZ; MONZÓN-SIERRA, 2022) colocou *A. surinamensis* também como sinonímia de *Aristolochia trilobata*, esses são alguns exemplos dentre vários já descritos na literatura e não apenas com o gênero em questão, demonstrando que trabalhos que levam apenas em consideração a morfologia diferenciada dos indivíduos não são suficientes para fazer uma descrição inequívoca de espécie, pois se tratando de plantas, principalmente do grupo das angiospermas, existe uma grande plasticidade fenotípica entre as populações que deve ser considerada e melhor estudada.

2.3 Morfologia

Aristolochiaceae Juss. pertence as dicotiledôneas basais (Magnoliidae), e estas são caracterizadas por serem trepadeiras como *A. gibertii*, ervas, subarbustos ou arbustos, possuem caules suberosos, inflorescências em tirso, racemos com entrenós das flores ripídios e unifloras, flores dispostas em inflorescências multifloras, habitualmente com raízes ou rizomas espessados (GONZÁLEZ; PABÓN-MORA, 2017; GONZÁLEZ, 2012). Apresenta ampla área de distribuição em regiões tropicais, que inclui países como Bolívia, Paraguai, Argentina e no Brasil, neste último com ocorrência nos estados de Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e São Paulo, sendo achadas em matas de cerrado, margens de estradas, reservas e rios (FERNANDES; SILVA; LOPES; DE ALMEIDA *et al.*, 2021).

A identificação dos espécimes da família Aristolochiaceae é usualmente feito através das flores por conta de sua morfologia diferenciada, em específico para o gênero de maior riqueza de espécies, *Aristolochia*, quando comparado ao gênero *Thottea*, e o *Saruma* (Asaraceae) (JOST; SAMAIN; MARQUES; GRAHAM *et al.*, 2021), que apresentam flores bem mais simples e menos especializadas (WANG; MA; ZHU, 2020).

A família apresenta características morfológicas únicas quanto ao mecanismo de polinização, sendo seus polinizadores pequenos dípteros e insetos necrófagos como moscas varejeiras e afins (HOEHNE, 1927), por exemplo, suas sementes numerosas, às vezes aladas, planas ou côncavo-convexas, ovóides, elipsóides, rombóides ou triangulares, frequentemente com superfície verrucosa (MASSONI; FOREST; SAUQUET; EVOLUTION, 2014).

As flores de *Aristolochia* são de diferentes tamanhos, cor, especialização epidérmica e forma do perianto. Suas flores são solitárias nas axilas das folhas, que se origina entre a folha e o caule, em inflorescências paucifloras, monoclamídeas, apresentam apenas sépalas, monóica (apresenta os dois verticilos férteis androceu e gineceu), protóginas, as estruturas femininas amadurecem antes das estruturas reprodutivas masculinas, importante evolutivamente pois impede que a planta faça autofecundação, tem androceu e gineceu em coluna. Suas flores zigomorfas, possui simetria bilateral, perianto supero e acima do ovário, sua coloração é amarelada, com nervuras e venulações avermelhadas, manchas esparsas e de mesma coloração (CAPELLARI JR, 1991; GONZÁLEZ GARAVITO, 1990).

Seu perianto é bilabiado, na inserção do colo fortemente curvado em ângulo agudo, ao todo de 6-9 cm. de comprimento, um utrículo ou bojo (onde se aloja o ginostêmio) obovoide, assimétrico, de 2,5-3,5 cm. de comprimento na inserção do colo papiforme salientado (ARAÚJO; ALVES, 2013; FREITAS; ALVES-ARAÚJO, 2017; FREITAS; GONZÁLEZ; ALVES-ARAÚJO, 2019; HOEHNE, 1942; HOEHNE, 1927; NASCIMENTO, 2008).

O formato tubular característica das flores do gênero *Aristolochia* tem uma relação direta com o mecanismo de “armadilha”, que serve para capturar os insetos, que realizam a polinização, é análoga à forma que as flores da família Nepenthaceae, uma família de plantas carnívoras angiospérmicas pertencente à ordem *Caryophyllales* (METUSALA; AL FARISHY; JEBB, 2020), assumem para a captura de insetos como mecanismo de nutrição, pois são plantas carnívoras (FERNANDES; SILVA; LOPES; DE ALMEIDA *et al.*, 2021).

O polinizador, ao encontrar a flor de *Aristolochia*, tem o limbo do perianto como superfície de pouso para só então adentrar o tubo ornado internamente com vários tricomas rígidos, voltados para dentro, que também têm a finalidade de favorecer o acesso dos polinizadores ao interior do perianto, o que permite a entrada do polinizador, mas impede seu caminho de volta ao exterior da flor. Uma vez percorrida a região do tubo, o polinizador terá acesso aos verticilos reprodutivos que estão alojados na porção dilatada do perianto tubular, o utrículo (OELSCHLÄGEL; GORB; WANKE; NEINHUIS, 2009).

Aristolochia gibertii é caracterizada como uma trepadeira (planta volúvel que se apoia em outras) com raízes espessadas, seus caules são suberificados quando maduros e cobertos de uma camada de córtex rimoso alvacentos, possuem pseudo-estípulas grandes, uma característica distinta dentro do gênero *Aristolochia*, suas folhas são simples, alternas, com 7 nervuras partindo da base, onduladas e membranosas, ou seja, finas, resistentes e flexíveis, amplexicaules (porção da folha que abraça o caule sem cercá-lo totalmente) de 2-4 cm. de comprimento e igual à largura dos pecíolos patentes, mais ou menos do comprimento do limbo foliar (HOEHNE, 1927).

2.4 Anatomia

A anatomia vegetal é uma ferramenta muito importante, no conhecimento *a priori* de uma espécie, além da descrição anatômica, também pode auxiliar na elucidação de informações relacionadas ao armazenamento e secreção de metabólitos secundários através dos dados obtidos (MARQUES; AZEVEDO, 2019). Por exemplo, a caracterização anatômica por meio de análises macroscópicas (morfologia externa) e microscópicas (anatomia interna) de órgãos como folhas pode contribuir para informações taxonômicas para famílias, principalmente quando as informações sobre as espécies são escassas (BOTELHO-FILHO; IZUMI; VIEIRA; DE PAIVA BERTOLI *et al.*, 2020).

A folha é o principal órgão fotossintezante das plantas e desempenha diversas outras funções de suma importância. Esse órgão possui grande facilidade em se adaptar, apresentando assim uma variedade inimaginável de formas e de estruturas, tornando-se uma importante fonte de caracteres taxonômicos (DOS SANTOS; DOS SANTOS LIRA; DA SILVA; DOS SANTOS *et al.*, 2021). Em geral, a folha é uma expansão do caule que forma uma estrutura laminar, na qual está presente um sistema fotossintético que tem

como função maximizar a captação de luz. Esse sistema também aparece em outras partes da planta, mas a folha é a mais eficaz nessa função (FREITAS; ALVES-ARAÚJO, 2017).

Possui crescimento limitado, coloração verde e, na maioria das vezes, apresenta inserções nos nós. Esse órgão se origina na gêmula do embrião da semente e tem como função, além da produção de alimento (fotossíntese), a transpiração da planta através dos estômatos, assim como a respiração. Funções secundárias são observadas como proteção das gemas, reserva de nutrientes ou na captura deste, como no caso das plantas carnívoras (BOTELHO-FILHO; IZUMI; VIEIRA; DE PAIVA BERTOLI *et al.*, 2020).

As folhas completas são compostas por três estruturas: limbo, nervura central, parte que promove a condução da seiva produzida na folha para as outras partes da planta, e o pecíolo parte da folha que prende o limbo ao caule (FREITAS; ALVES-ARAÚJO, 2017).

O gênero *Aristolochia* L. tem sistemas radiculares fibrosos, aromáticos, sendo a raiz principal globosa, ovóide, alongada, cilíndrica, fusiforme ou napiforme (DAVIS; KHAN, 1961). Com hastes lenhosas ou herbáceas, sua lâmina é inteira, oblongo a acuminado, com nervuras palmadas, com cinco a sete nervuras principais. As folhas de *Aristolochia* apresentam formato variado, mais comumente encontrado é o do tipo oval a cordado, e raramente lobado, as plantas desse gênero possuem pseudoestípulas que são perfis modificados que fornecem proteção a base do pecíolo (ABREU; GIULIETTI, 2016). As folhas possuem uma nervura principal e duas ou quatro secundárias partindo da base, do par externo dessas nervuras secundárias, partem ainda mais uma nervura de cada, esse padrão é uma característica diagnóstica para as espécies (FREITAS; ALVES-ARAÚJO, 2017).

2.5 Genética

O DNA barcoding é um método de identificação de espécies baseado na extração de DNA a partir de uma amostra de tecido, e essa ferramenta de investigação ajudou a expandir a capacidade diagnóstica de novas espécies, e no delineamento ecológico da biodiversidade (ERICKSON; SPOUGE; RESCH; WEIGT *et al.*, 2008; KRESS; WURDACK; ZIMMER; WEIGT *et al.*, 2005). O DNA barcoding possui duas etapas básicas: Construção de uma biblioteca de códigos de DNA, de espécies conhecidas, e uma correspondência da sequência de códigos de DNA de uma amostra de um espécime desconhecido com os códigos de DNA existentes nessa biblioteca de identificação

(SARMA; TANTI, 2017). Para que o DNA barcoding seja executado de forma eficiente a variação da sequência de DNA deve ser alta o suficiente entre as espécies para que possam ser discriminadas entre si. Entretanto, deve ser baixo o suficiente dentro das espécies para que haja um limite claro entre variações genéticas intra e interespecíficas definido (LAHAYE; VAN DER BANK; BOGARIN; WARNER *et al.*, 2008).

O DNA barcoding consiste em uma ou mais sequências curtas padronizadas do genoma entre 400 e 800 pb de comprimento que, em teoria, pode ser facilmente isolado, amplificado com a ajuda da reação em cadeia da polimerase (PCR) e depois sequenciada para a análise de uma espécie (ABBAS; TJOLLI, 2020). Com os avanços na genética molecular, tecnologia de sequenciação e bioinformática, o DNA barcoding permitiu aos pesquisadores detectar com rapidez e precisão espécies conhecidas e recuperar informações sobre as mesmas, se tornando uma ferramenta vital para os taxonomistas. A genética molecular é então uma abordagem promissora quando se trata de identificação de espécies, porque supera as dificuldades encontradas nos métodos de identificação baseados apenas na morfologia (PLANT, 2009).

Além de sua aplicabilidade na identificação de novas espécies a técnica do DNA barcoding é utilizada nos campos da biologia evolutiva, biogeografia, conservação, bio-indústria, epidemiologia, agrônomo, indústria alimentar, ciências forenses, entre outras (VELASQUES; CRISPIM; VASCONCELOS; BAJAY *et al.*, 2021).

O conceito de DNA barcoding foi inicialmente aplicado aos animais com o DNA mitocondrial (COI) e DNA nuclear (ITS), e nas plantas as regiões genéticas do genoma foram DNA cloroplástico plastídeos (*rbcL*, *trnL-F*, *matK*, *psbA*, *trnH* e *psbK*) e um nuclear (ITS) foram regiões genéticas que se tornaram o código de barras padrão de escolha na maioria das aplicações para plantas e fungos (KRESS; WURDACK; ZIMMER; WEIGT *et al.*, 2005).

Na literatura os autores estimam que existam 380.000 espécies de plantas que estão divididas em angiospermas, gimnospermas, briófitas e pteridófitas. O gene mitocondrial CO1 (citocromo c oxidase subunidade 1), utilizado como marcador na identificação dos animais, teve uma evolução muito lenta nas plantas, os mitogenomas vegetais evoluem cerca de 100 vezes mais lentamente do que o genoma mitocondrial animal, e além disso é muito maior cerca de 180-600 kb podendo chegar a 11 Mb quando comparado ao genoma mitocondrial animal que varia apenas de 13-20 kb de pares de base, se tornando assim ineficaz para ser utilizado como marcador de vegetais, sendo

necessário então procurar um código de DNA universal mais específico para plantas (CHASE; SALAMIN; WILKINSON; DUNWELL *et al.*, 2005).

As plantas apresentam muitos desafios quando falamos de codificação de genes, desde que existem muitos problemas para se desenvolver marcadores universais eficazes, pois quanto mais diversificada a flora mais problemas de universalização e padronização vai existir. Além disto, as espécies vegetais podem sofrer hibridização, que pode ser intraespecífica (envolvendo indivíduos da mesma espécie) ou interespecífica (envolvendo indivíduos de espécies diferentes), tendo também possíveis casos de especiação recente (formação de novas espécies) através da poliploidia (um ou mais genomas no mesmo núcleo) (CHARLESWORTH, 2006).

O DNA barcoding de plantas apresenta quatro regiões essenciais codificantes, o *rbcL*, *matK*, *rpoB* e *rpoC1*, e mais três regiões suplementares não codificantes, *atpF-atpH*, *trnH-psbA* e *psbK-psbI*, e um nuclear ribossomal *ITS* ou *ITS2*. Esses marcadores têm se mostrado eficazes na discriminação a nível de identificação e caracterização de espécies (TRIVEDI; REHMAN; SAGGU; PANNEERSELVAM *et al.*, 2020).

As plantas possuem além do mitogenoma, o genoma plastidial (cloroplasto) que é aproximadamente 10x maior que o genoma mitocondrial de animais, e evolui 4x mais rápido que o mitogenoma vegetal, mas ainda assim, muito mais lento que o mitogenoma animal. Além do genoma plastidial, as plantas também possuem o DNA ribossomal 35S composto por várias subunidades, sendo a *ITS* a mais utilizada para DNA barcoding.

No trabalho de Ohi-Toma (OHI-TOMA; SUGAWARA; MURATA; WANKE *et al.*, 2006) os autores construíram a filogenia da *Aristolochia* sl. utilizando as regiões dos genes *rbcl* e *matK* do cloroplasto e fitocromo A (*phyA*) nuclear, e examinaram especialmente as relações filogenéticas dos quatro grupos propostos por González & Stevenson (GONZÁLEZ; STEVENSON, 2002) estes últimos autores fizeram uma análise filogenética da subfamília Aristolochioideae (Aristolochiaceae) e chegaram à conclusão que essa subfamília possui duas tribos (Tribo Bragantiae Klotzsch e Tribo Aristolochieae), e duas subtribos dentro de Aristolochieae (Subtribo Isotrematinae H. Huber e Subtribo Aristolochiinae), baseando-se nas análises dos três genes, as árvores filogenéticas obtidas indicaram que *Aristolochia* sl. é um grupo monofilético e irmã de *Thottea*, consistindo em duas principais linhagens as subtribos Aristolochiinae e Isotrematinae, que também havia sido sugerida por Kubitzki (KUBITZKI; ROHWER; BITTRICH, 2013). O gene *matK* é uma região de codificação que tem um comprimento de 1500-1600 bp na maioria das angiospermas e está localizada dentro do domínio V do

trnK e ele foi o que melhor demonstrou congruência a estrutura proposta pelos autores com os dois grupos (Aristolochiinae e Isotrematinae).

O gene *rbcl* foi proposto por alguns pesquisadores como Chase *et al.*, (2007) & Newmaster *et al.*, (2006), essa região possui uma grande quantidade de informações mais de 10.000 sequências de *rbcl* no GenBank.

Em 2005 o pesquisador Kress (KRESS; WURDACK; ZIMMER; WEIGT *et al.*, 2005) propôs originalmente que o *trnH-psbA* (comprimento médio de 418 pb) era uma região de plastídio de maior potencial de discriminação em nível de espécie pois demonstrava uma boa amplificação em plantas terrestres e com um único par de primers, cerca de 93% para angiospermas, do que qualquer outro *locus* que eles haviam analisado e que assim adequado para identificação de plantas. Kress & Erickson (KRESS; ERICKSON, 2007) propuseram combinar o original *trnH-psbA* de Kress (KRESS; WURDACK; ZIMMER; WEIGT *et al.*, 2005) com *rbcL*, seguindo análises de Newmaster (NEWMMASTER; FAZEKAS; RAGUPATHY, 2006) o *rbcl* é o gene mais bem caracterizado, com a melhoria dos primers ele se torna facilmente recuperável em plantas terrestres e é adequado para a recuperação de sequências bidirecionais de alta qualidade. Embora não seja a região mais variável, é um componente frequente das combinações multilocais de melhor desempenho para a discriminação de espécies. Em contraste, Chase (CHASE; COWAN; HOLLINGSWORTH; VAN DEN BERG *et al.*, 2007) fez uma proposta para combinar *rpoC1*, *rpoB*, e *matK* ou *rpoC1*, *matK*, e *trnH-psbA*, enquanto Taberlet (TABERLET; COISSAC; POMPANON; GIELLY *et al.*, 2007) sugeriu o *trnL* intron como um código de barras adequado da planta.

O pesquisador Kim (KIM; YI; KIM; CHO, 2017) e seu grupo sequenciou os cloroplastos de nove plantas, incluindo sete espécies de *Ginseng*, descobrindo várias regiões que forneciam assinaturas de espécies únicas. O grupo decidiu por um código de barras de três regiões - um gene e dois espaçadores – que poderia discriminar plantas com flores pertencentes a 10 outros gêneros, o gene foi o *matK*.

Um DNA barcode adequado deve apresentar alta divergência interespecífica, mas baixa divergência intraespecífica. A maior divergência interespecífica de acordo com o trabalho de Lahaye (LAHAYE; VAN DER BANK; BOGARIN; WARNER *et al.*, 2008) foi fornecida pela região *trnH-psbA*, e o próximo código de barras mais variável em nível interespecífico foi o *matK*. A região gênica *matK* mostra níveis muito mais altos de variação de sequência do que outras regiões e assim fornece uma melhor discriminação de espécies (YU; WANG; YU; SCHINNERL *et al.*, 2021). O *matK* é um código de barras

de DNA universal preferivelmente usado para plantas com flores, já o *trnH-psbA* é uma região que executa quase igualmente bem, embora seu padrão de evolução molecular seja complexo.

Os autores então propõem que *rbcl*, *trnH-psbA* é usado como uma alternativa para *matK* ou um código de barras complementar para *matK*. Usando *matK* sozinho ou em combinação com *rbcl*, *trnH-psbA*, os autores conseguiram alcançar uma monofilia de cerca de 90% de identificação correta das espécies (LAHAYE; VAN DER BANK; BOGARIN; WARNER *et al.*, 2008).

Erickson (ERICKSON; SPOUGE; RESCH; WEIGT *et al.*, 2008), em seu trabalho de 2008, propôs alguns cálculos estatísticos que eles denominaram de “probabilidade de identificação correta” (PCI), pois o objetivo do DNA barcoding não é inferir monofilia, porém os autores notaram que a atribuição inequívoca de sequências a uma espécie ainda é possível, mesmo com ambiguidades na estimativa de homologia, e, portanto, monofilia. Os autores conduziram a análise do PCI, fazendo uma reanálise dos dados de Lahaye (LAHAYE; VAN DER BANK; BOGARIN; WARNER *et al.*, 2008) usando dados de dois marcadores de código de barras o *matK* e *trnH-psbA*. Concluíram que uma estimativa de atribuição inequívoca de espécies com códigos de barras de plantas provavelmente estava na faixa de 60% -70%. Já em seu outro trabalho Kress & Erickson (KRESS; ERICKSON, 2007) observaram que não mais do que 87% das espécies poderiam ser inequivocamente identificadas. De modo similar, Hollingsworth (HOLLINGSWORTH; ANDRA CLARK; FORREST; RICHARDSON *et al.*, 2009) também apontam para um nível semelhante de atribuição inequívoca em quase 60% usando apenas o *matK*.

Dechbumroong (DECHBUMROONG; AUMNOUYPOL; DENDUANGBORIPANT; SUKRONG, 2018) fizeram um trabalho baseado na autenticação correta de produtos naturais, especificamente do gênero *Aristolochia*, utilizando o DNA barcoding. Este método pode fornecer a identificação precisa de amostras de plantas que não são distinguíveis pela morfologia ou pelo nome Códigos de barras de DNA baseados em cinco regiões candidatas (*rbcl*, *matK*, *ITS*, *trnH-psbA* e *trnL-trnF*) já foram estabelecidas para a identificação do *Aristolochia* plantas medicinais. O grau de variação de sequência entre as amostras fora classificado em *ITS2* com alta variação (28,98%) entre as onze espécies de *Aristolochia*, muito maiores do que *trnH-psbA* (11,56%), *matK* (11,15%) e *rbcL* (3,29%).

O conjunto de dados combinado de sequências *ITS2*, *matK* e *trnH-psbA* foram analisadas. Ambas as árvores ML topologias semelhantes e revelou que todos

Aristolochia os táxons foram monofileticamente agrupados com um valor de bootstrap de 100%. As características morfológicas confirmaram que todos os espécimes vegetais pertenciam ao subgênero *Aristolochia*. Ambas as filogenias moleculares indicaram uma divisão entre dois clados principais, potencialmente seguindo a sugestão taxonômica anterior de González (GONZÁLEZ, 1991).

Os resultados da análise filogenética de ambos os *Aristolochia* cloroplasto e genomas de DNA nuclear concordam bem com as filogenias publicadas anteriormente de *matK* e *trnEU-trnF* (NEINHUIS; WANKE; HILU; MÜLLER *et al.*, 2005; OHI-TOMA; SUGAWARA; MURATA; WANKE *et al.*, 2006).

2.6 Química

As plantas sintetizam uma grande quantidade de componentes orgânicos que podem ser encontrados em dois grupos: os metabólitos primários e os metabólitos especiais. Os metabólitos secundários demonstram ter uma interface química entre as plantas e o ambiente (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os metabólitos especiais podem apresentar inúmeras funções biológicas de suma importância para as plantas, e podem estes estarem relacionados a defesa e proteção contra herbívoros e patógenos, atrativos para possíveis polinizadores, ou como autores de competição entre plantas, e de simbiose plantas-microrganismo (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Por conta dessas propriedades, os metabólitos secundários podem ter capacidade medicinal para os seres humanos, por exemplo, produtos especiais (secundários) relacionados a defesa da planta através de citotoxicidade para patógenos, podem ser utilizados para a produção de medicamentos antimicrobianos em humanos (MONTANARI; BOLZANI, 2001; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

A crescente busca pela compreensão dos metabólitos secundários oriundos dos mais diversos organismos vegetais resultou no crescimento da metabolômica nas últimas décadas, sobretudo através dos estudos farmacológicos e biológicos (ERNST; SILVA; SILVA; VÊNCIO *et al.*, 2014). Acredita-se que existem cerca de 2 milhões de espécies no globo terrestre, das quais o Brasil detém aproximadamente de 15 a 20% da biodiversidade (BURGEL; MACHADO). Atualmente, estima-se que 170.000 metabólitos secundários estão descritos na literatura, uma quantidade expressiva, porém

que ainda deve ser ampliada, visto que apenas 10% da flora mundial foi avaliada por estudos químicos ou biológicos (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Os avanços provindos da metabolômica permitem prever quais são os metabólitos específicos para determinadas espécies vegetais, ou até mesmo alguns gêneros (DOS SANTOS; MACEDO; DO VALE; SILVA *et al.*, 2017; MARTUCCI; DE VOS; CAROLLO; GOBBO-NETO, 2014). A família *Sapindaceae*, por exemplo, é caracterizada pela produção de saponinas (PRAKASH, 2014). Através do estudo de metabólitos é possível compreender as relações ecológicas que se constituem através da interação de organismos vegetais com o meio ambiente, agentes patogênicos, herbívoros, e os estímulos físicos e químicos (WOLFENDER; RUDAZ; HAE CHOI; KYONG KIM, 2013).

As plantas da família Aristolochiaceae principalmente do gênero *Aristolochia* são bastante conhecidas pelos ácidos aristolóquicos (AAs), alguns medicamentos usados na medicina homeopática, com base nessas ervas e seus componentes, foram relacionados ao desenvolvimento de carcinomas uroteliais e problemas de nefro toxicidade (WU; SUN; WANG; ZHAO *et al.*, 2015). Porém nos últimos anos de pesquisa o gênero *Aristolochia* tem gerado grande interesse devido à abundância de metabólitos secundários, terpenos e alcalóides, sendo reconhecidas como potenciais fontes para produção de inseticidas botânicos pois as espécies dessa família apresentam toxicidade incomum para insetos não especializados (KLITZKE; BROWN JR, 2000; VIEIRA; PASCOLI; DE BORTOLI; LOPES, 2021). antimalárico (MATHEW; MTEWAB; AJAYIB; DEYNO *et al.*, 2020), estudos pré-clínicos demonstraram notável atividade que suportam o uso convencional da planta *Aristolochia indica* como antiveneno, antifertilidade, agente antimicrobiano e anti-inflamatório (PADHY, 2021), o potencial citotóxico de *Aristolochia foetida* contra células cancerígenas (LERMA-HERRERA; BEIZA-GRANADOS; OCHOA-ZARZOSA; LÓPEZ-MEZA *et al.*, 2021), entre outros.

Os estudos biológicos realizados com constituintes isolados de espécies da família Aristolochiaceae, sobretudo o gênero *Aristolochia* (KUO; LI; WU; MEDICINE, 2012), têm resultado na descoberta de substâncias com atividades bastante promissoras para o controle de insetos, as quais apresentam potencial para serem utilizadas tanto na agricultura, quanto na aplicação doméstica (LOPES; NASCIMENTO; SILVA; DA, 2001; MESSIANO; VIEIRA; MACHADO; LOPES *et al.*, 2008).

Vários constituintes já foram identificados no gênero *Aristolochia*, destacando a ocorrência de cerca de ácidos e ésteres aristolóquicos, aristolactamas, aporfina,

protoberberinas, isoquinolinas, benzilisoquinolinas, amidas, flavonóides, lignanas, éteres bifenílicos, cumarinas, tetralonas, terpenóides, benzenóides, esteróides e outros (KUROKI; WU; MEDICINE, 2012).

Os ácidos aristolóquicos (ácido 3,4- metilenodioxil-10-nitro-fenantrênico-1) são típicos constituintes das espécies do gênero *Aristolochia*, e esses ácidos são encontrados nas espécies da família Aristolochiaceae, mas além dele várias outras substâncias isoladas desta família possuem atividade biológica. Entre elas a alantoína, por possuir atividade anti-inflamatória, antipsoríase e cicatrizante, sendo também utilizada no tratamento do vitiligo, e a (-)-cubebina, por apresentar atividade anti-inflamatória (MARCHESINI; PRADO; MESSIANO; MACHADO *et al.*, 2009).

3 Objetivos

3.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi realizar análises biológicas e químicas comparativas entre três formas de *Aristolochia gibertii* provenientes de localidades geográficas distintas.

3.2 Específico

- Realizar análises morfométricas das flores dos três morfotipos de *Aristolochia gibertii* secas depositadas em exsiccatas.
- Analisar a micromorfologia e histoquímica das folhas e caules frescos dos três morfotipos de *Aristolochia gibertii*.
- Alinhar e comparar as sequências de DNA barcode da região *matK* e *rbcL* dos três morfotipos de *Aristolochia gibertii*
- Obter extratos dos três morfotipos de *Aristolochia gibertii* e caracterizá-los por RMN de ^1H e de ^{13}C e UHPLC-MS/MS, com o intuito de efetuar uma análise química de identificação e comparação entre as formas.

4 Metodologia

4.1 Morfologia

4.1.1 Morfometria

As amostras foram coletadas e identificadas pelo Dr. Joelcio Freitas, e suas exsiccatas foram depositadas no Herbário Mello Leitão, registo - MBML-Herbário 55050 e MBML-Herbário 55051. A chave para identificação das espécies com ocorrência no Estado de Mato Grosso foi realizada com base em bibliografia especializada e consulta às descrições originais das espécies (FREITAS; ALVES-ARAÚJO, 2017; FREITAS; GONZÁLEZ; ALVES-ARAÚJO, 2019; GONZÁLEZ GARAVITO, 1990; HOEHNE, 1942). As descrições morfológicas foram realizadas com base nas amostras de flores (para o estudo foram utilizadas 3 flores representantes da Forma 1 Mato Grosso, 3 flores representantes da Forma 2 Selviria -MS e 2 flores representantes da Forma 3 Dourados – MS), cada flor foi coletada de um indivíduo particular da respectiva Forma da região geográfica, de *Aristolochia gibertii*, que foram colhidas do Jardim de Plantas Medicinais da Universidade Federal da Grande Dourados, onde são cultivadas sob condições semi-controladas em Dourados, MS, Brasil, e depositadas em exsiccatas para preservação das estruturas florais, e futura identificação. Esses materiais foram coletados e examinados com a análise morfológica dos órgãos vegetativos e reprodutivos, de material seco com auxílio de um paquímetro.

As flores das formas (1, 2 e 3) foram mensuradas acerca do seu comprimento e largura, em cm, dos lábios inferiores e superiores, assim como o utrículo e o tubo, o acúmen do lábio superior foi apenas medido seu comprimento.

4.2 Anatomia

Foram utilizadas folhas e caules frescos, saudáveis e completamente expandidos de três formas de *Aristolochia gibertii* Hook para a realização das análises microscópicas e histoquímicas. A micromorfologia e histoquímica das folhas foram realizadas utilizando-se reagentes padrão, microscopia eletrônica de varredura por emissão de luz e campo, além de espectroscopia de raios-X por dispersão de energia. Os métodos empregados para análise de microscopia eletrônica de varredura por emissão de luz e

campo (FESEM) de folhas e caules das três formas de *A. gibertii* são totalmente detalhados no artigo de Brito (DE BRITO; SABEDOTTI; FLORES; RAMAN *et al.*, 2021)

4.3 Genética

4.3.1 Coleta das amostras

Foram coletadas folhas frescas das plantas, dos três morfotipos de *A. gibertii* Hook, Forma 1 (Mato Grosso), Forma 2 (Selviria) e Forma 3 (Dourados) cultivadas sob condições semi-controladas no Jardim de Plantas Mediciniais da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil. Após a coleta essas folhas foram imediatamente armazenadas em frascos com *beads* de sílica gel e enviadas ao laboratório de consultoria EcoMol para os demais procedimentos.

4.3.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído de material foliar seco por meio do protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Resumidamente, as folhas secas foram mantidas em sílica-gel e maceradas com esferas metálicas por 3 min em macerador Qiagen TissueLyser®. Para a extração foram utilizados tubos de 2 mL contendo o material macerado e o tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; CTAB 2%; EDTA 20mM; PVP 1%; proteinase K 20mg/mL e β -mercaptoetanol 2%). As amostras ficaram na solução de extração em Banho-Maria a 65 °C por 45 min e os tubos foram homogeneizados a cada 10 min. Depois do aquecimento as amostras ficaram em descanso até atingirem a temperatura ambiente e foi acrescentado 800 μ l de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas em agitador vórtex até ficaram com coloração leitosa e levadas para centrifugação por 10 min a 12.000 rpm.

4.3.3 Amplificação e sequenciamento das amostras

Para a identificação específica das amostras, foram amplificados os genes *rbcL* (região barcode ~ 550 pb) e *MatK* (região barcode ~ 841 pb) (CBOL, 2009). No PCR foi usado os seguintes primers: *rbcL* (*rbcLa_* Forward- ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC e *rbcLa_* Reverse- GTAAAATCAAGTCCCACCRG); *matK* (3F_KIM Avançar- CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG e 1R_KIM Reverso- ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC). A reação de PCR foi realizada em volume

de 15 µL contendo: 2 × de PCRBIO Ultra Mix (PCR Biosystems, Londres, Reino Unido), 10 pmol de cada primer e 30-45 ng de DNA extraído. O programa térmico de PCR foi o seguinte: 95 °C por 3 min seguido de 35 (para *matK*) ou 40 (para *rbcL*) ciclos a 95 °C por 30 s, 50 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, e 72 °C por 10 min.

A F2 e F3 foram submetidas a uma purificação com *beads* magnéticas (*Agencourt AMPure XP* – BECKMAN COULTER), por conta de inibidores que foram removidos com sucesso, conforme amplificação subsequente dos genes *rbcL* e *Matk*.

Uma vez amplificadas todas as amostras, os produtos de PCR foram purificados com *beads* magnéticas (*Agencourt AMPure XP* – BECKMAN COULTER). A reação de sequenciamento foi realizada com o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). Os produtos da reação foram purificados por meio de uma precipitação com Etanol/EDTA/Acetato de Sódio, de acordo com protocolo sugerido pelo mesmo fabricante. Por fim, foi realizado o sequenciamento automático bidirecional (*forward e reverse*) por eletroforese capilar (Sanger) no equipamento ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4.3.4 Alinhamento das seqüências e análises

As etapas de sequenciamento automático bidirecional de Sanger foram realizadas por eletroforese capilar. As seqüências *forward e reverse* das amostras D, M e S foram editadas no Chromas (versão 2.6.6) e depois alinhadas usando o programa de montagem Cap3 contig. As fitas consenso obtidas foram comparadas com as disponíveis nas bases de dados GenBank e Barcode of Life Data Systems visando a identificação em nível de espécie. Sugestões improváveis do ponto de vista morfológico foram desconsideradas independentemente de sua posição no ranking de semelhanças. As árvores de distanciamento genético entre as formas foram geradas no programa MEGA X® (Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 11 /Tamura K, Stecher G, and Kumar S 2021), a tabela de similaridade nucleotídica das formas foram geradas no programa SeaView (Multiplatform GUI for molecular phylogeny).

4.4 Química

4.4.1 Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN unidimensionais foram adquiridos em um espectrômetro Bruker® Ascend™ 300 (7,05 T). Os sinais de solvente residual (CHCl_3 : 7,26 ppm; $\text{CD}_3\text{SOCD}_2\text{H}$: 2,50 ppm) e solvente deuterado (CDCl_3 : 77,0 ppm; DMSO-d_6 : 39,52 ppm) foram usados como referências internas para experimentos de ^1H e ^{13}C NMR, respectivamente; δ são relatados em relação ao TMS. Os espectros ESI-HRMS foram obtidos usando um sistema Agilent 6545 Q-TOF LC/MS.

4.4.2 Material vegetal e identificação

As plantas, três morfotipos de *A. gibertii* Hook. (Forma 1 Mato Grosso, Forma 2 Selviria e Forma 3 Dourados; Fig.1), foram identificados pelo Dr. Joelcio Freitas, e espécimes comprovantes (MBML 53233; MBML 55051; e MBML 55050, respectivamente) foram depositados no herbário do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão (MBML), na cidade de Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil. Autorização IBAMA número 51842. Cadastro de acesso para pesquisas sobre a biodiversidade brasileira: SisGen/MMA AF7C7F6. Espécimes adultos (três de cada morfotipo) de F1 a F3, cultivados no Jardim de Plantas Mediciniais da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil, e originários de três localidades geográficas distintas, foram utilizados para todos experimentos.

4.4.3 Extração

Folhas secas (50°C por 48 horas) e em pó (1,8 g) de cada forma de *A. gibertii* foram extraídas separadamente (uma vez por solvente) por sonicação (90 min) com 100 mL de hexanos-EtOAc (1:1 v/v; grau HPLC; LiChrosolv®) e 100 mL de metanol (grau HPLC; JTBaker®), sucessivamente, para dar um total de seis extratos (E1-E6). Três extratos de hexanos-AcOEt [F1-F3 deram E1 (77,3 mg; 4,3%), E2 (74,1 mg; 4,1%) e E3 (114,5 mg; 6,4%), respectivamente] e três metanólicos [F1-F3 deram E4 (180,0 mg; 10%), extratos E5 (121,8 mg; 6,8%) e E6, respectivamente.

4.4.4 Análises de RMN

Duas porções (10,0 mg para ^1H e 45,0 mg para ^{13}C) de cada extrato foram usadas para as análises de RMN. E1 a E3 foram dissolvidos individualmente em 0,75 mL de CDCl_3 (99,8% D), e os outros foram dissolvidos separadamente em igual volume de DMSO-d_6 (99,9% D). As amostras foram analisadas usando tubos de RMN de 5 mm a 298 K. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C consistiam em 256 e 60.000 varreduras, respectivamente. Os dados de RMN foram processados em MNova 14.2.2 (Mestrelab Research) e TopSpin 3.6.2 (Bruker®).

4.4.5 Análises UHPLC-MS/MS

Os extratos E1 a E6 foram analisados por UHPLC-ESI-MS. Extratos menos polares (E1 a E3) foram inicialmente dissolvidos em isopropanol (grau HPLC; HiPerSolv CHROMANORM) para dar soluções a 1.000 ppm, que foram diluídas dez vezes usando $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 1:1 (v/v). Os extratos metanólicos (E4 a E6) por sua vez foram dissolvidos diretamente com $\text{ACN-H}_2\text{O}$ 1:1 (v/v). As amostras (todas a 100 ppm) assim obtidas foram analisadas usando uma coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (Rapid Resolution HD 2,1×50 mm, 1,8 μm , PartNumber: 959757-902); a taxa de fluxo, a temperatura da coluna e o volume de injeção foram de 0,3 mL/min, 33 °C e 3 μL , respectivamente.

A fase móvel foi composta por água contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). O programa de eluição foi: 0 a 14 min para 5 a 100% B (gradiente linear); 14 a 16 min 100% B (eluição isocrática). Os parâmetros operacionais foram: tensão capilar, 3.000 V; tensão do skimmer, 65 V; temperatura do gás seco, 320 °C; gás de secagem, 12,0 L.min⁻¹; pressão do gás do nebulizador, 35 psi; fluxo de gás de bainha, 10 L.min⁻¹; temperatura do gás de revestimento, 300 °C; Taxa de varredura MS1, 3 espectros por segundo; Taxa de varredura MS2, 5 espectros por segundo. Os espectros de massa foram adquiridos nos modos negativo e positivo na faixa de m/z 100 a 1.500 para MS1 e 70 a 1.500 para MS2. Todos os dados foram processados no software MassHunter versão B.08.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), e suas análises foram auxiliadas pelas seguintes ferramentas: MS-DIAL, MS-FINDER, Feature Based Molecular Networking (FBMN) e Cytoscape 3.82. Programas.

5 Resultados e discussão

5.1 Morfologia

5.1.1 Análise morfométrica

As diferenças observadas, em vários anos de campo, entre as flores dos indivíduos da espécie de *A.gibertii*, nas diferentes populações em regiões geográficas distintas de ocorrência da espécie, despertaram o interesse em sua análise experimental mais aprofundada. Para esse trabalho adotamos o nome “Forma” como sinônimo de morfotipos, para a representação da diferença morfológica das formas das flores, que a princípio gerou questionamentos acerca de outras possíveis diferenças sobre esses morfotipos, para nos referimos as 3 populações de *A.gibertii* estudadas. As formas F1, F2 e F3 são visivelmente distintas, essas características denominadas organolépticas, são aquelas determináveis pelos órgãos dos sentidos, sem a necessidade do uso de instrumental. As principais características observadas são: cor, odor, gosto, textura, brilho, entre outras características observáveis a olho nu. Um aspecto importante a ser considerado ao analisar características organolépticas é que existe subjetividade na sua avaliação devido às diferenças de sensibilidade entre os observadores, necessitando assim de análise experimental como a morfometria (BARBOSA; DA SILVA; MOSCATTO, 2021).

Na tabela 1 há para cada forma uma linha de "medidas totais" que incluem os valores mínimos e máximos observados do lábio superior, nas medidas tomadas dos exemplares de cada forma, F1 apresentado 3,25-5,25 cm (comprimento) x 0,8-1,37 cm (largura), F2 4,55-5,34 cm (comprimento) x 0,66-0,8 cm (largura), sendo essa a que mais se destaca pela diferença de comprimento em relação as demais formas, F3 2,1-2,3 cm (comprimento) x 0,6-0,7 cm (largura), essa última menor, em relação ao comprimento de seu lábio superior, diferindo-se de F1 em 2,01 cm e de F2 em 2,68 cm. O mesmo se dá em relação ao acúmen presente no ápice desse lábio, que é bem maior em F1 com 0,7 - 1,3 cm (comprimento) e F2 com 0,4-1,05 (comprimento), F3 apresentando menor valor de 0,1 cm (comprimento) (Fig. 1, 2, 3 e 4).

Tabela 1. Morfometria das três Formas de *A.gibertii*

Formas de <i>Aristolochia gibertii</i>	Lábio superior	Acúmen do ápice do lábio superior	Lábio inferior	Utrículo	Tubo
Forma 1 (Mato Grosso)	5,25 x 1,37	1,3 cm	3 x 1,1 cm	4,6 x 2,7 cm	1,2 cm
	4,15 x 0,9 cm	0,9 cm	2,45 x 1,3 cm	3,31 x 1,66 cm	1,43 cm
	3,25 x 0,8 cm	0,7 cm	2,3 x 1,3 cm	3,3 x 1,65 cm	1,65 cm
Medidas totais	3,25-5,25 x 0,8-1,37 cm	0,7-1,3 cm	2,3-3 x 1,1-1,3 cm	3,3-4,6 x 1,65-2,7 cm	1,2-1,65 cm
Forma 2 (Selviria)	5,34 x 0,7 cm	1,05 cm	2,1 x 0,57 cm	2,5 x 1,40 cm	1,7 cm
	4,55 x 0,8 cm	0,65 cm	1,6 x 0,75 cm	1,89 x 1 cm	1,78 cm
	4,75 x 0,66 cm	0,4 cm	1,2 x 0,64 cm	1,8 x 0,87 cm	1,4 cm
Medidas totais	4,55-5,34 x 0,66-0,8 cm	0,4-1,05 cm	1,2-2,1 x 0,57-0,75 cm	1,8-2,5 x 0,87-1,40 cm	1,4-1,78 cm
Forma 3 (Dourados)	2,3 x 0,7 cm	0,1 cm	2,1 x 1,16 cm	1,7 x 0,86 cm	1,25 cm
	2,1 x 0,6 cm	0,1 cm	1,84 x 1 cm	1,75 x 1 cm	1,6 cm
Medidas totais	2,1-2,3 x 0,6-0,7cm	0,1 cm	1,84-2,1 x 0,86-1 cm	1,7-1,75 x 0,86-1 cm	1,25-1,6 cm

*os valores em negrito, são substancialmente diferentes, se destacam dos demais dados.

Na tabela 2 o valor obtido se deu através da divisão do menor/menor comprimento do lábio superior, pelo menor/menor comprimento do lábio inferior, quanto mais próximo o valor é de 1, mais homogêneo é o tamanho de ambos os lábios. Foi observado que a relação de tamanho dos lábios é mais homogênea na F3 (1,09 – 1,14 cm) do que na F1 (1,41-1,75 cm), e mais discrepante em relação aos valores de F2 (2,59 – 3,79 cm).

Quando observado apenas os valores do lábio inferior (tabela 1) de F1(2,3-3 x 1,1-1,3 cm), esse apresenta um comprimento um pouco maior, em relação a F2 (1,8-2,5 x 0,87-1,40 cm) e F3 (1,7-1,75 x 0,86-1 cm). Assim como para o utrículo também, onde F1 (3,3-4,6 x 1,65-2,27 cm) apresenta maiores medidas totais em relação a F2 (1,8-2,5 x 0,87-1,40 cm) e F3 (1,7-1,75 x 0,86-1 cm). Em relação ao comprimento do tubo, F2 (1,4-1,78 cm) se destaque das demais, enquanto F1(1,2-1,65 cm) e F3 (1,25-1,6 cm) apresentam valores similares.

Tabela 2. Relação do comprimento dos lábios superior/inferior das três formas de *A. gibertii*

Formas	Relação Lábio superior/ Lábio inferior
Forma 1	1,41 - 1,75
Forma 2	2,59 - 3,79
Forma 3	1,09 - 1,14

Figura 1. Três flores das respectivas formas de *Aristolochia gibertii*, F1 (Mato Grosso), F2 (Selvíria), F3 (Dourados) respectivamente da esquerda para direita.



Fonte: Autor.

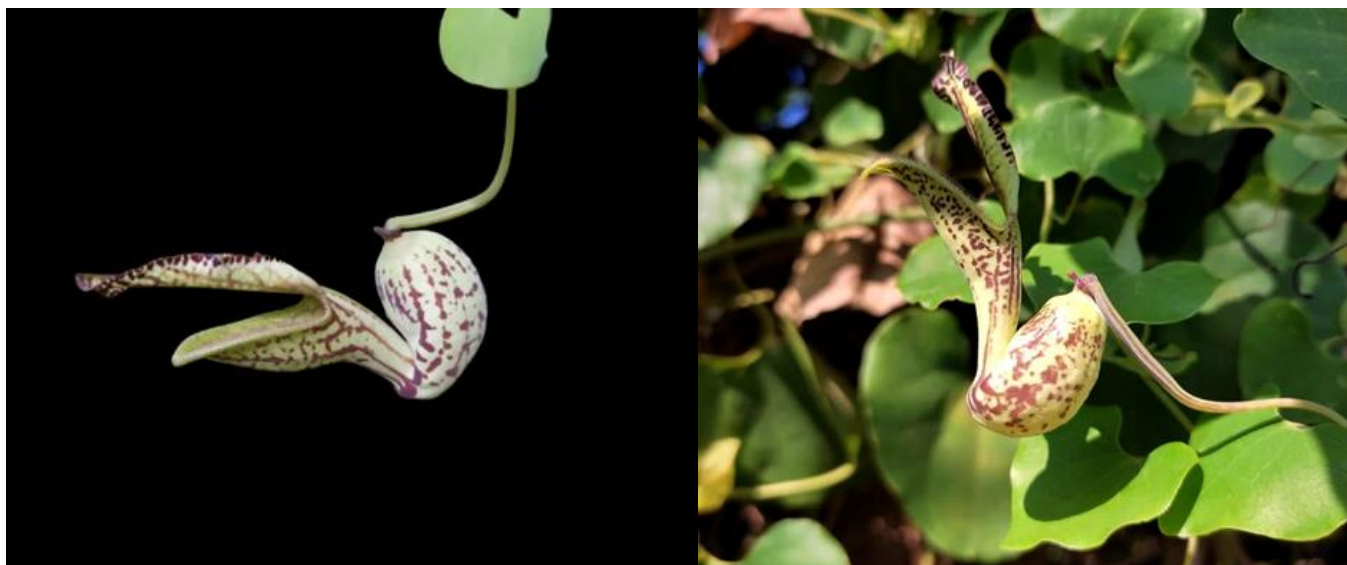
Figura 2. Flores da Forma 1 (Mato Grosso) de *Aristolochia gibertii*



Figura 3. Flores da Forma 2 (selvária) de *Aristolochia gibertii*



Figura 4. Flores da Forma 3 (dourados) de *Aristolochia gibertii*



Fonte: Autor

5.2 Anatomia

5.2.3 Análise microscópica

No presente trabalho, as principais características morfoanômicas de três formas de *A. gibertii* são investigadas e comparadas. As principais características que suportam a diferenciação estão resumidas na Tabela 3. As paredes celulares anticlinais eram onduladas na epiderme adaxial (Fig. 5a) e sinuosas na abaxial (Fig. 5i) da F3 D. Paredes celulares anticlinais retas foram encontradas em ambos os lados da F1- M (Fig. 5b, j) e F2- S (Fig. 5c, g, k). Essas características podem ajudar a diferenciar a F3-D das demais.

As folhas das três formas eram hipoestomáticas com estômatos anomocíticos (Fig. 5i-k) que sempre afundavam dentro das células epidérmicas circundantes. As ceras epicuticulares foram observadas como plaquetas irregulares (Fig. 5d, f, h, p, q, r) e varetas com sulcos transversais em ambas as superfícies foliares nas três formas (Fig. 5r). Mahfoud e colaboradores afirmaram que dois tipos diferentes de cera estão presentes na superfície adaxial das folhas do gênero *Aristolochia*, varetas com sulcos transversais e plaquetas de cera (MAHFOUD; WANKE; NEINHUIS, 2018).

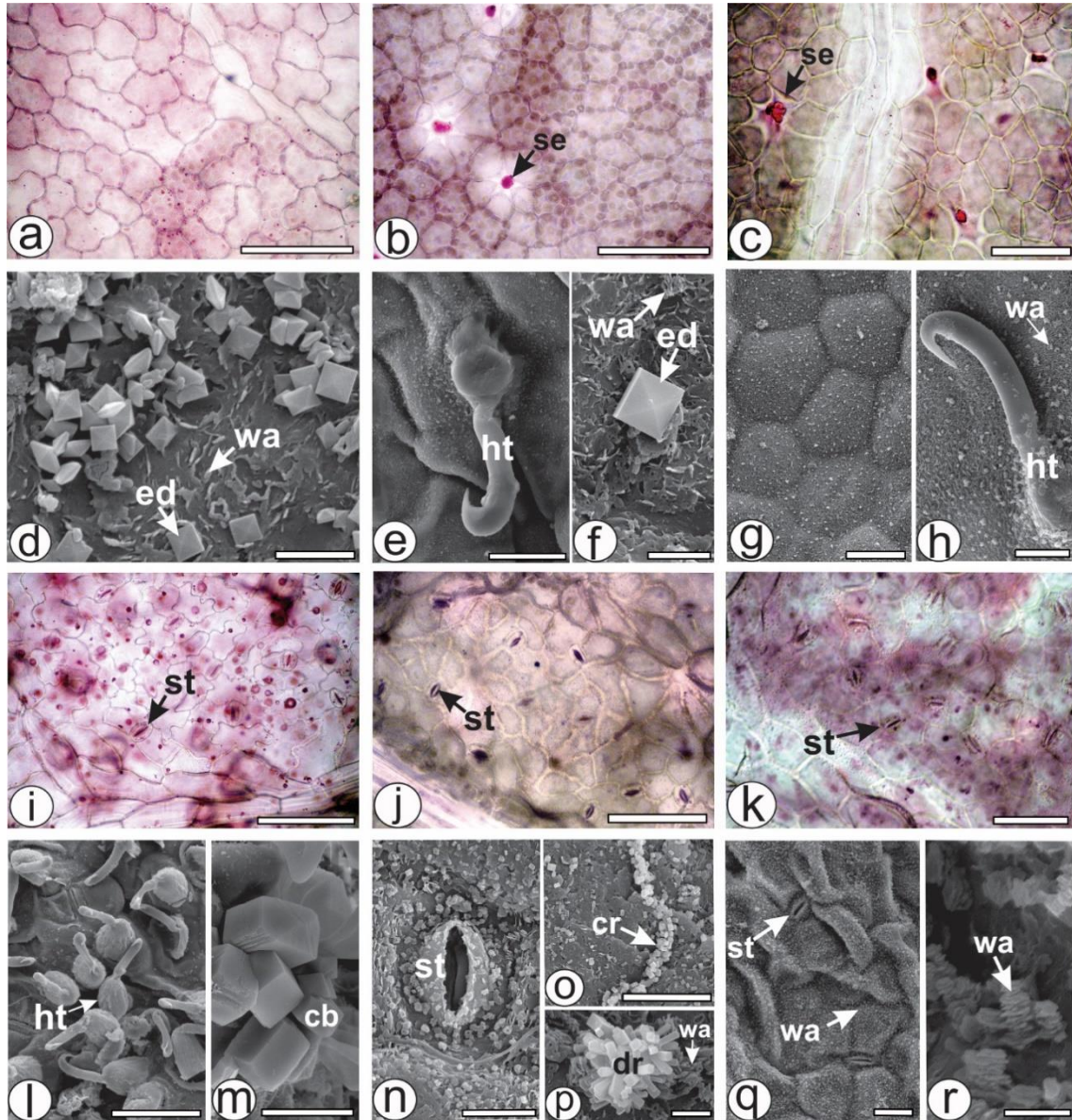
Tabela 3. Características micromorfológicas comparativas entre as formas de *Aristolochia gibertii*

Características micromorfológicas	Formas de <i>Aristolochia gibertii</i>		
	F1 (Mato Grosso)	F2 (Selvíria)	F3 (Dourados)
Paredes celulares epidérmicas anticlinais	Reto (em ambos os lados)	Reto (em ambos os lados)	Ondulado (adaxial), sinuoso (abaxial)
Ocorrência dos estômatos	Hipomático	Hipomático	Hipomático
Tipos de estômatos	Anomocítico	Anomocítico	Anomocítico
Presença e tipo de ceras epicuticulares	Rodlets com sulcos transversais e plaquetas irregulares em ambos os lados	Rodlets com sulcos transversais e plaquetas irregulares em ambos os lados	Rodlets com sulcos transversais e plaquetas irregulares em ambos os lados
Cristais de dipirâmides quadrados alongados na epiderme (lado adaxial)	Presente	Ausente	Presente
Dipirâmides quadradas muito alongadas e filhotes (lado abaxial).	Presente	Ausente	Presente
Cristais organizados em linhas no lado abaxial	Presente	Ausente	Ausente
Drusas na epiderme (lado abaxial)	Presente	Ausente	Ausente
Tricoma em forma de gancho	Poucos tricomas em ambos os lados	Poucos tricomas em ambos os lados	Poucos tricomas no lado adaxial e vários no lado abaxial
Mesofilo (com número de camadas paliçadas/esponjosas/paliçadas)	Dorsiventral	Dorsiventral	Dorsiventral
Forma da nervura central	Biconvexa	Biconvexa	Ligeiramente côncavo-convexo
Colênquima angular na nervura central	Várias camadas em ambos os lados	Várias camadas em ambos os lados	1-2 camadas no lado adaxial
Sistema vascular na nervura central	Um feixe vascular colateral no centro	Um feixe vascular colateral no centro	Um feixe vascular colateral no centro
Anel esclerenquimático na nervura central	Presente	Ausente	Ausente
Cristais na nervura central	Drusas, cuneiformes e formas bipiramidais quadradas	Ausente	Ausente
Forma do pecíolo	Quase plano-convexo	Quase plano-convexo	Quase plano-convexo
Forma da haste	oval	circular	circular
Número de feixes vasculares	15 feixes	5 feixes grandes e 4-5 pequenos	5 feixes grandes e 4-5 pequenos
Tipo de cristais	Dipirâmides e drusas simples	Dipirâmides simples, dipirâmides quadradas alongadas e muito alongadas e drusas	Dipirâmides quadradas alongadas

Cristais estão presentes em ambas as superfícies das folhas da F3- D e F1-M como segue, dipirâmides quadradas alongadas são encontradas na F3- D (Fig. 5d) e M (Fig. 5f); dipirâmides quadradas muito alongadas e filhotes estão presentes no lado abaxial da forma D (Fig. 5m). Na F1- M, esses três tipos de cristais estão organizados em linhas

(Fig. 5o) e/ou formando aglomerados como drusas no lado abaxial da F1-M (Fig. 5p). Não foram observados cristais na epiderme na F2- S.

Figura 5. Micromorfologia de *Aristolochia gibertii* – folhas em vista de superfície.

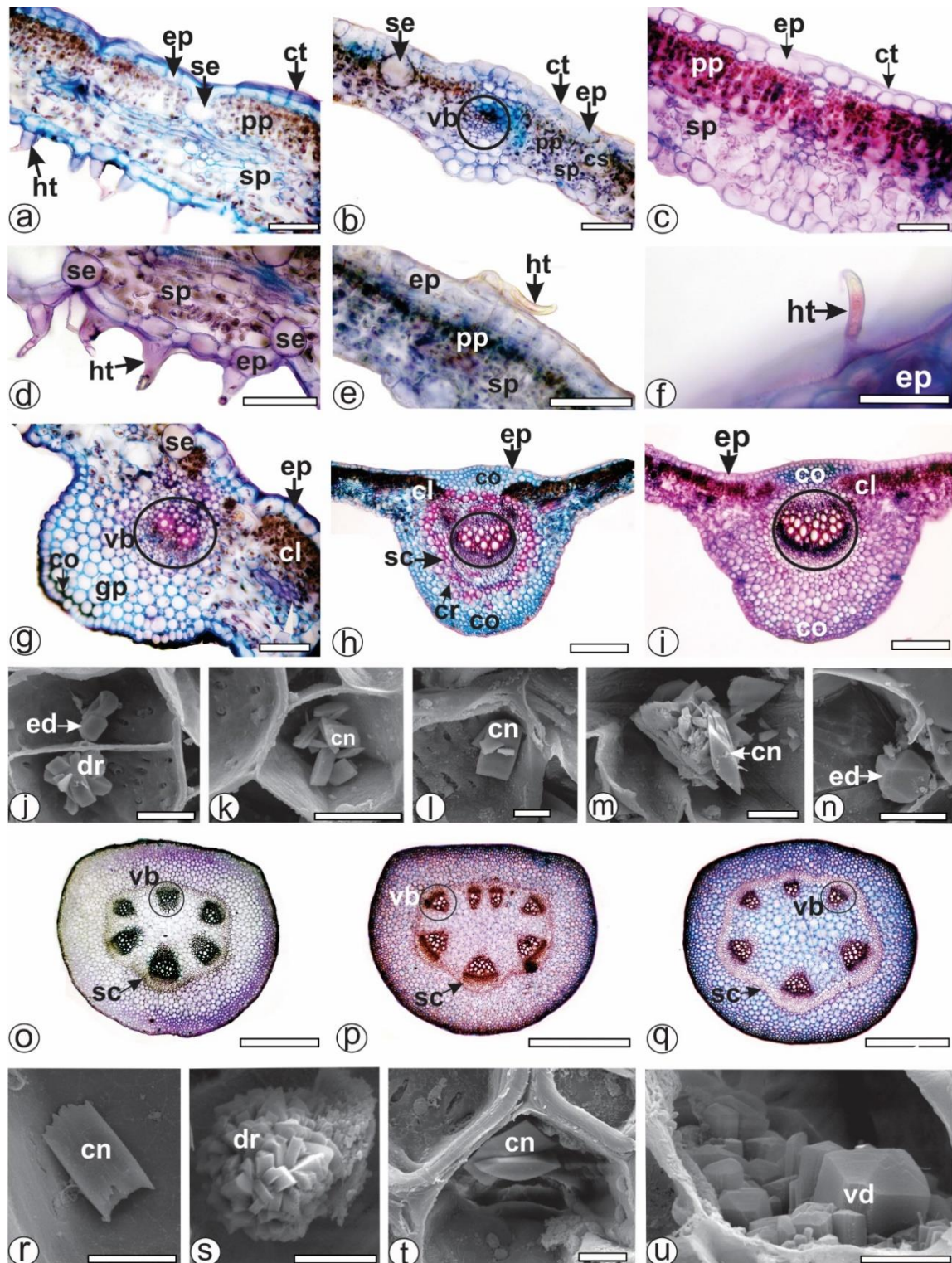


Respectivamente (a, d, i, l, m: F3- D; b, e, f, j, n, o, p: F1- M; c, g, h, k, q, r: F2- S). (a-c, i-k: microscopia de luz; d-h: FESEM). (cr, cristal; ct, cutícula; cu, cubos; dr, drusa; ed, dipirâmide quadrada alongada; ht, tricoma em forma de gancho; se, dipirâmide simples, st, estômatos; wa, cera epicuticular). Barra de escala: a-c, i-k, l = 50 μ m; e, g, q = 20 μ m; h, m-o = 10 μ m; d, f, r = 2 μ m; p = 1 μ m.

Os tricomas em forma de gancho têm pelo menos 2 células, com uma célula longa e curva formando o gancho e uma célula de base ampla unicelular esparsamente espalhada

em ambas as superfícies nas três formas (Fig. 5e, 5h, 5l, 6a, 6d) e densamente distribuída no lado abaxial da F3- D de *A. gibertii* (Fig. 5l, 6a, 6d). Esse recurso mostrou-se importante para diferenciá-lo das demais formas. Mahfoud afirma que a variação nos tricomas é uma característica útil para fins taxonômicos dentro de alguns clados do gênero *Aristolochia* (MAHFOUD; WANKE; NEINHUIS, 2018). Os tricomas em forma de gancho foram amplamente relatados por vários autores (BOTELHO-FILHO; IZUMI; VIEIRA; DE PAIVA BERTOLI *et al.*, 2020; MAHFOUD; WANKE; NEINHUIS, 2018; SUDHAKARAN, 2016).

Figura 6. Microscopia de folhas (lâmina, nervura central e pecíolo) de *Aristolochia gibertii* em corte transversal.



Respectivamente (a, d, g, o, r: F3- D; b, e, h, j-n, p, s, t: F1-M; c, f, i, q, u: F2- S. (ai, oq: microscopia de luz; jn, ru: FESEM). (af: lâmina; gn: nervura central; ou: pecíolo). (cl, clorênquima; co, colênquima; cn, cuneiforme; cr, cristal; ct, cutícula; dr, drusa; ed, dipirâmide quadrada alongada, ep, epiderme; gp, parênquima moído; ht, tricoma em

forma de gancho; ph, floema; pp, parênquima paliçádico; sc: anel esclerenquimático; se, célula secretora; sp: parênquima esponjoso; vb, feixe vascular; vd, dipirâmide quadrada muito alongada, xy, xilema). Barra de escala: o,q = 500 µm; h, i = 200 µm; a,e, g = 50 µm; j, k, m = 20 µm; l, n, rt = 10 µm; u = 5 µm.

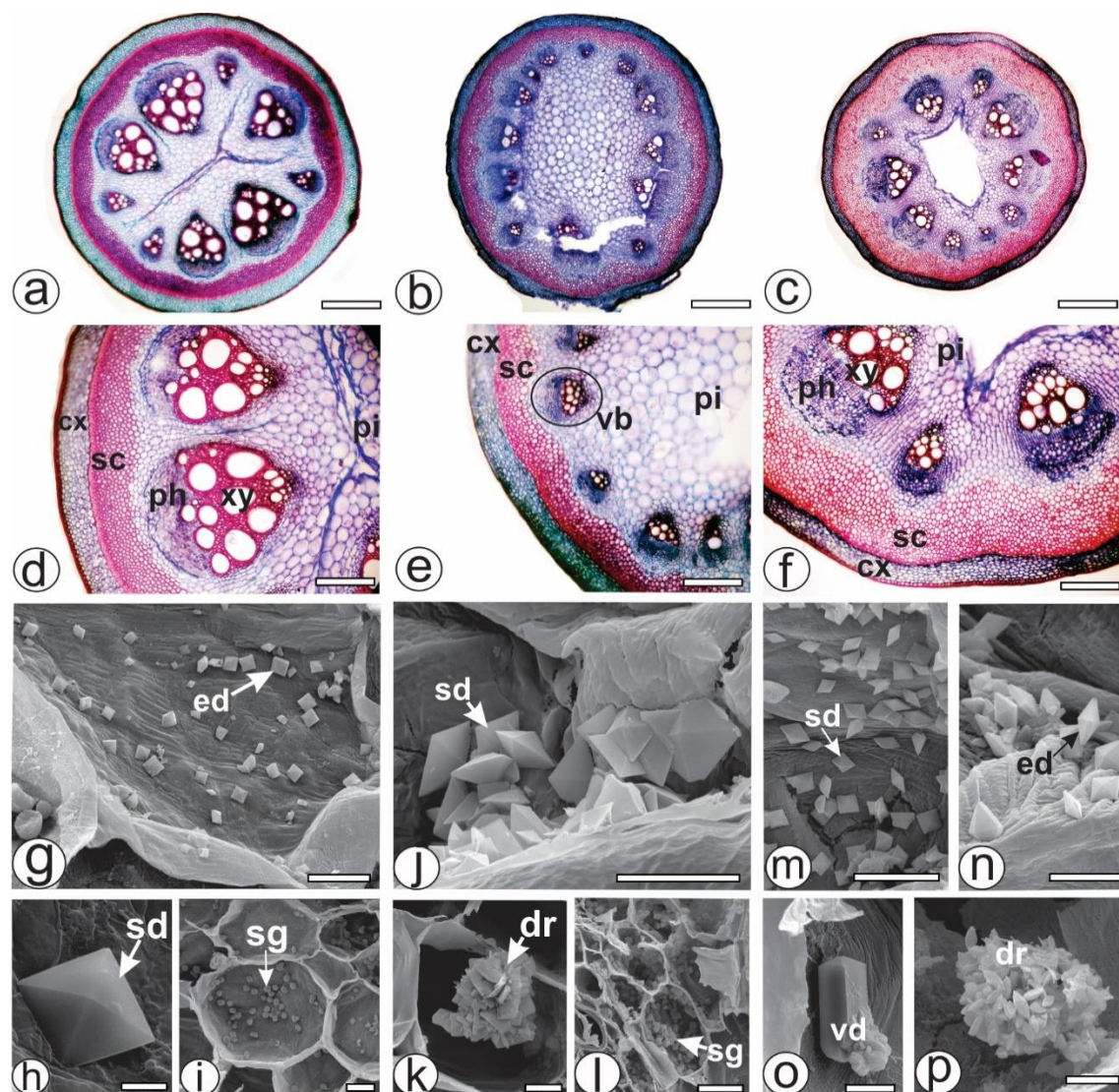
Considerando a lâmina foliar e comparando com as três formas em corte transversal, a epiderme é monocamada recoberta por cutícula fina em ambos os lados (Fig. 6a-c). As três formas de seção foliar de *A. gibertii* mostraram um arranjo mesofilo dorsiventral (Fig. 6a-e). Não apresentavam paliçada típica nem parênquima esponjoso típico; ainda, alguns espaços intercelulares apareceram no lado abaxial do mesofilo. Células secretoras aparecem em ambos os lados da folha (Fig. 6b), ligeiramente afundadas a partir do nível das células epidérmicas inferiores (Fig. 6d). Seções em vista frontal revelaram arranjo em forma de roseta das células epidérmicas ao redor de cada célula secretora e seu conteúdo lipofílico pôde ser distinguido (Fig. 6b, c). Essas características foram relatadas por Christodoulakis para *A. baetica* L (CHRISTODOULAKIS; KOTSIRONI; TSAFANTAKIS; STEFI *et al.*, 2019).

A F3- D apresentou nervura central, em corte transversal, de formato levemente côncavo-convexo (Fig. 6g), enquanto a F1-M e F2-S apresentaram contornos biconvexos (Fig. 6h, 6i). A epiderme foi unicamada seguida por algumas camadas de colênquima angular subepidérmico em ambos os lados da F1-M e F2-S (Fig. 6h, 6i) e 1-2 camadas no lado adaxial da forma D (Fig. 6g). Algumas células secretoras podem estar presentes. O clorênquima da lâmina é projetado na nervura central na região superior. O parênquima fundamental é constituído por parênquima densamente arranjado sem qualquer espaço intercelular (Fig. 6g-i). O sistema vascular foi representado por um feixe vascular colateral (Fig. 6g-i). Apenas a F1- M apresentou vários cristais como drusas (Fig. 6j), cuneiformes (Fig. 6k-m) e dipirâmides quadradas alongadas (Fig. 6n) no parênquima fundamental próximo ao anel esclerenquimático (Fig. 6h).

O pecíolo de três formas, seccionado transversalmente na porção medial, tinha formato quase plano-convexo (Fig. 6o-q). As células epidérmicas eram arredondadas e recobertas por uma cutícula espessa. Havia várias camadas de colênquima angular subepidérmico. Várias células secretoras, semelhantes às encontradas na lâmina foliar, foram observadas. O sistema vascular era colateral e era representado por 5 feixes organizados em arco aberto e 1-2 feixes dorsais. Um anel esclerenquimático contínuo, com células em diferentes níveis de lignificação, contíguo ao sistema vascular (Fig. 6o-

q). Cuneiformes (Fig. 6r, t), drusas (Fig. 6s), cristais de dipirâmides quadrados alongados e muito alongados (Fig. 6u) foram observados no parênquima fundamental. Embora o contorno do pecíolo seja uma característica diagnóstica, existem poucos estudos envolvendo a anatomia do pecíolo das espécies *Aristolochia*. Além disso, considerando vários tipos de cristais de oxalato de cálcio nas espécies de *Aristolochia*, mais estudos são necessários para determinar os morfotipos e padrões dos cristais no gênero.

Figura 7. Microscopia de caules de *Aristolochia gibertii* em corte transversal



Respectivamente (a, d, g-i: F3-D; b, e, j-l: F1- M; c, f, m-p: F2- S.). (a-f: microscopia de luz; g-p: FESEM). (cx, córtex; dr, drusa; ed, dipirâmide quadrada alongada; ph, floema; pi, medula; sc, anel esclerenquimático; sd, dipirâmide simples; sg, grãos de amido; vb, feixe vascular; vd, dipirâmide quadrada muito alongada; xy, xilema). Barra de escala: a-c = 400 μ m; d-f = 200 μ m; i, l = 20 μ m; g, m = 10 μ m; j, k, o, n, p = 5 μ m; h = 2 μ m.

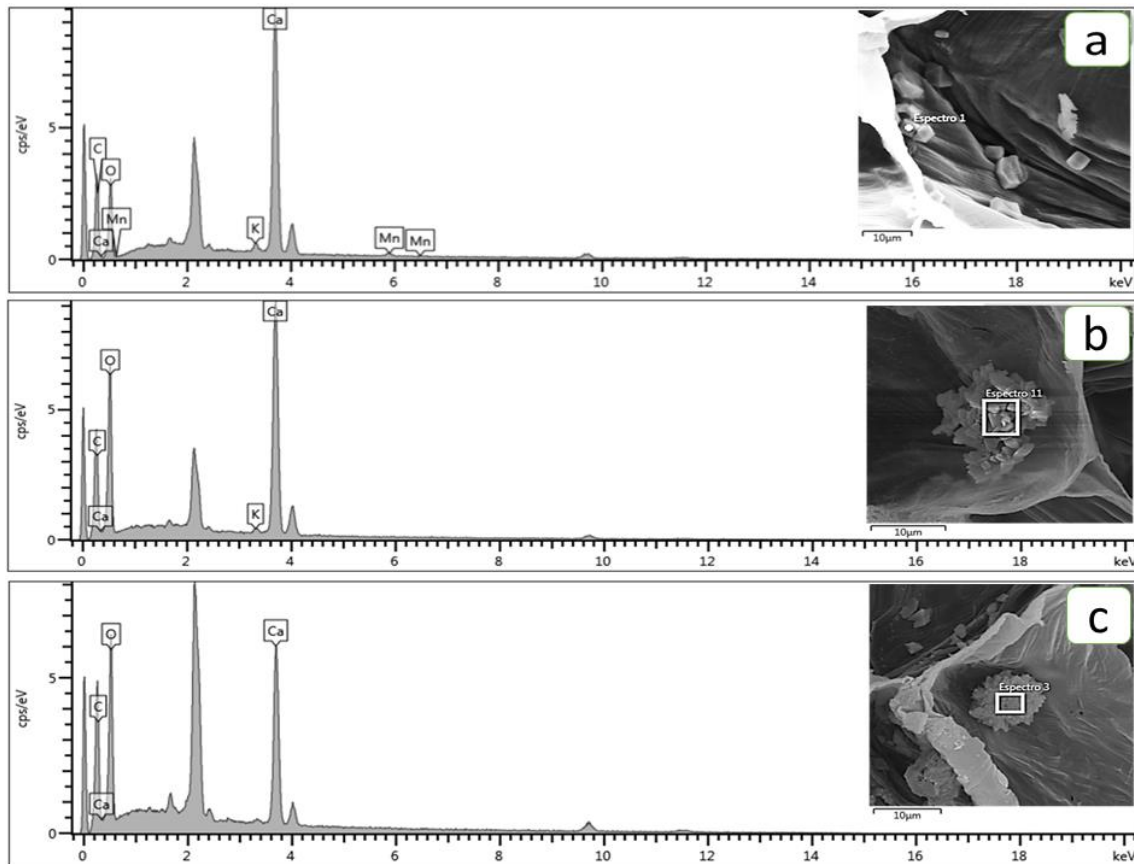
Em crescimento secundário incipiente, o caule em seção transversal apresentou formato circular na F1- M (Fig. 7b) e F2- S (Fig. 7c) e formato oval na F3-D (Fig. 7a). A epiderme era unisseriada e recoberta por uma cutícula espessa nas três formas. O córtex era formado por várias camadas de células parenquimáticas e um anel contínuo de fibras perivasculares que mostra um aumento da espessura da parede celular em direção à periferia. Nas três formas, um anel de feixes vasculares colaterais abertos, encerrando uma medula parenquimatosa. No entanto, as formas eram diferentes em vários feixes vasculares como segue, 5 grandes e 4-5 pequenos feixes na F3- D (Fig. 7a) e F2-S (Fig. 7c), e cerca de 15 feixes na F1- M (Fig. 7b). Câmbio foi distinto entre floema e xilema. Células secretoras, contendo material lipofílico, foram encontradas no córtex e próximas aos feixes vasculares. A medula era composta por células parenquimáticas de paredes finas e idioblastos com grãos de amido (Fig. 7i, l) e cristais. Cristais como dipirâmides quadradas alongadas foram encontrados na forma D (Fig. 7g, h) e S (Fig. 7n), dipirâmides simples (Fig. 7j, 7m) e drusas (Fig. 7j, 7p) foram observadas na F1- M e F2-S, enquanto dipirâmides quadradas muito alongadas foram encontradas apenas na F2- S (Fig. 7o). O conjunto de tipos de cristais é diagnóstico para as três formas do presente estudo.

A ocorrência de cristais em plantas é frequente e pode se formar em qualquer órgão ou tecido. Ocorrem tipicamente nos caules e folhas, mas podem ser depositados em diferentes tecidos e células, como dentro das células epidérmicas (DE BRITO; SABEDOTTI; FLORES; RAMAN *et al.*, 2021), externamente à epiderme (LORENÇONE; GUARNIER; PALOZI; ROMÃO *et al.*, 2021), no mesofilo (FORMAGIO; VILEGAS; VOLOBUFF; KASSUYA *et al.*, 2022), e no córtex e medula (D'ALMEIDA; MONTEIRO; RAMAN; REHMAN *et al.*, 2021) do caule. Apresentam uma grande diversidade de morfologias, como drusas, estilóides, areia cristalina e prismas de diferentes formas e são úteis no diagnóstico da espécie. Cristais em espécies de *Aristolochia* foram raramente mencionados, apenas para a raiz de *A. indica* alguns microcristais aparecendo como pequenos prismas alongados presentes em algumas células corticais e de raios (FAISAL; SHRIDHAR; KUMAR, 2015).

Os espectros das microanálises qualitativas de raios X dos cristais nas três formas de *A. gibertii* apresentaram grandes picos de cálcio, carbono e oxigênio (Fig. 8), sugerindo que esses cristais eram compostos de oxalato de cálcio. Em famílias de plantas superiores, a composição química dos cristais é geralmente oxalato de cálcio. Quando há excesso de cálcio, ele pode ser precipitado como carbonato, fosfato, silicato, oxalato e citrato

(BERTOCCO; MIGACZ; SANTOS; FRANCO *et al.*, 2017; WEINER; DOVE; GEOCHEMISTRY, 2003).

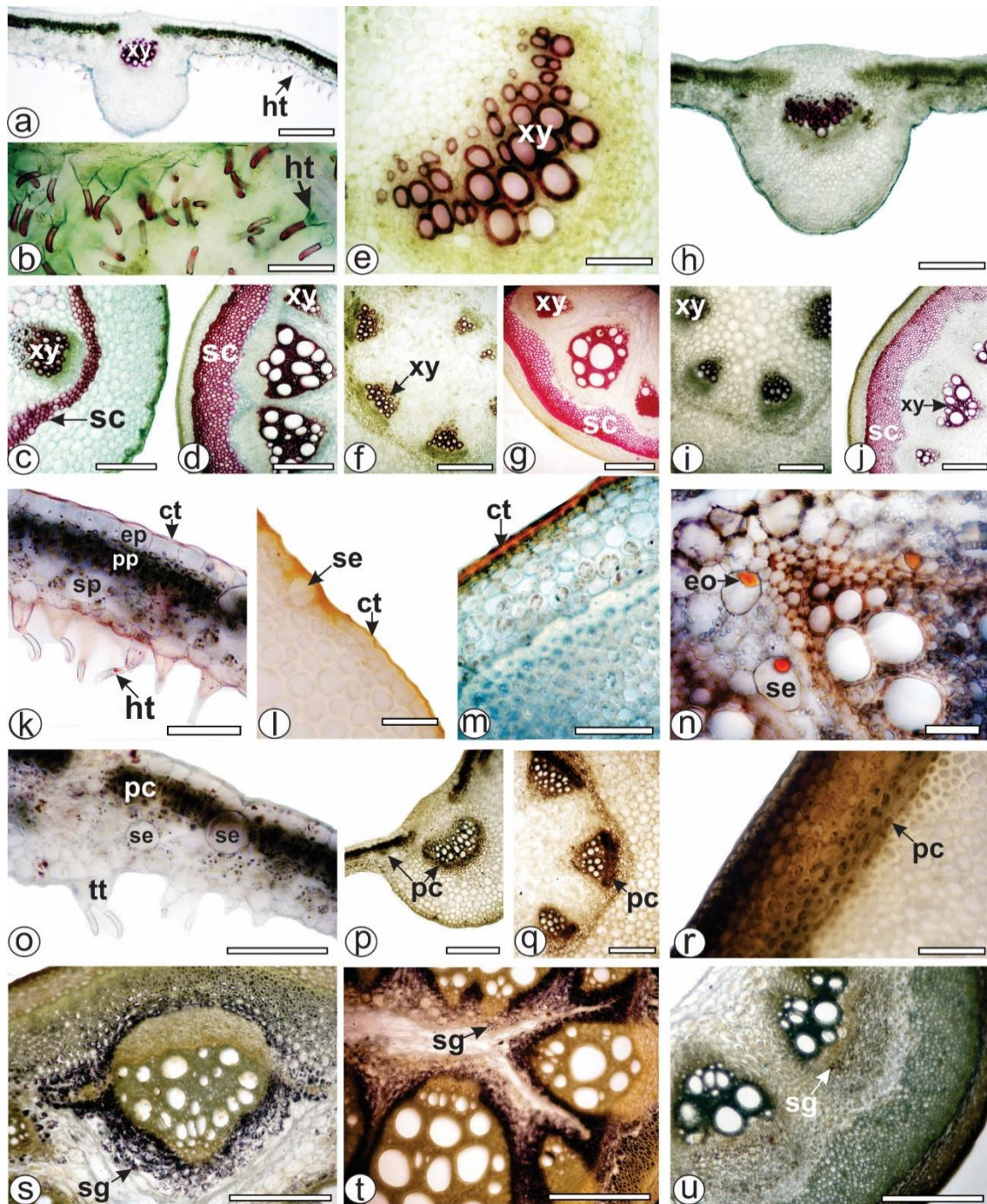
Figura 8. Imagem FESEM e espectro EDS da F3- D (a), F1-M (b) e F2-S (c).



5.2.4 Análise histoquímica

No presente estudo, elementos lignificados reagiram positivamente com floroglucinol/HCl nas células apicais dos tricomas em forma de gancho (Fig. 9a, b), além do xilema nas folhas e caules (Fig. 9a, c) nas três formas de *A. gibertii*. Além disso, o anel de esclerênquima reagiu com este reagente no caule (Fig. 9d, g, j), porém em diferentes estágios de lignificação no pecíolo (Fig. 9c).

Figura 9. Histoquímica de folhas e caules de *Aristolochia gibertii*.



Respectivamente (a-d, k-o, s: F3- D; e-g, p, q, t: F1- M; h-j, r, u: F2- S). (b: vista frontal da epiderme; a, e, h, p: nervura central; c, f, i, l, q: pecíolo; d, g, j, m, n, r-u: caule). (a-j: reagente floroglucinol/HCl; k-n: Sudão III; o, p: solução de cloreto férrico; q, r: dicromato de potássio; s-u: solução de iodo). (ct, cutícula; dr, drusa; ep, epiderme; gp, parênquima moído; ht, tricoma em forma de gancho; pc, compostos fenólicos, ph, floema; pp, parênquima paliádico; sc: anel esclerenquimatoso; se, célula secretora; sg, grãos de amido; sp: parênquima esponjoso; vb, feixe vascular; xy, xilema). Barra de escala: c, d, f-j, s, t, u = 400 μ m; a, h = 200 μ m; m = 100 μ m; b, e, k, l, n, o-r = 50 μ m.

As três formas evidenciaram material lipofílico nas ceras epicuticulares, cutículas e nas células secretoras das folhas e caules (Fig. 9k-o). Esses depósitos são comuns a várias espécies de *Aristolochia* (CHRISTODOULAKIS; KOTSIRONI; TSAFANTAKIS; STEFI *et al.*, 2019; JAIME; BARBOZA; VATTUONE, 2006).

Nas três formas de *A. gibertii*, os componentes fenólicos foram destacados usando soluções de cloreto férrico (Fig. 9p, q) e dicromato de potássio (Fig. 9r, s). Eles foram encontrados no parênquima paliádico do limbo foliar, no floema das folhas e caules (Fig. 9c) e no córtex do caule (Fig. 9s). Christodoulakis utilizando os mesmos reagentes utilizados no presente estudo, relataram que *A. baetica* não apresentou a presença de compostos fenólicos (CHRISTODOULAKIS; KOTSIRONI; TSAFANTAKIS; STEFI *et al.*, 2019).

Grãos de amido só foram encontrados em abundância ao redor dos feixes vasculares do caule da F3- D (Fig. 9t) e M (Fig. 9u), porém em pequena quantidade no tecido floema na F2- S (Fig. 9v). Eles eram pequenos e arredondados e encontrados solitários ou em pares.

Embora as anatomias básicas dessas formas sejam mais ou menos semelhantes, elas também apresentam diferenças distintas em algumas características que podem ser usadas como marcadores para a identificação das formas. Por exemplo, as células epidérmicas das folhas na forma D têm paredes anticlinais onduladas no lado adaxial e sinuosas no lado abaxial, enquanto as outras duas formas têm paredes retas em ambos os lados. Esta forma também pode ser distinguida das demais pela presença de tricomas em forma de gancho na face abaxial das folhas, de nervura central levemente côncava-convexa e de dipirâmides quadradas alongadas nos caules. Nenhuma das outras formas tem esses recursos. As análises histoquímicas confirmaram a presença de compostos lipofílicos e fenólicos, grãos de amido e elementos lignificados.

5.3 Genética

5.3.1 Identificação das sequências pelo GenBank e BLAST

Foi utilizado o sistema proposto no “Projeto do Código de Barras da Vida” (The Barcode of Life Project), iniciado em 2003 no Canadá, que consiste em um sistema único e universal com o objetivo de identificar todos os organismos em nível específico, baseado em uma abordagem molecular padronizada, utilizando-se sequências de regiões específicas do DNA (LEESE; SANDER; BUCHNER; ELBRECHT *et al.*, 2021). Avaliadas quanto a sua capacidade de reconhecimento genérico e específico, através do método de distância genética e pela busca BLAST®

As sequências *matK* das três formas de *A.gibertii* foram submetidas aos hits da busca BLAST® (ALTSCHUL; GISH; MILLER; MYERS *et al.*, 1990). As sequências das formas também foram confrontadas com as depositadas no GenBank®, e acabaram por chegar no mesmo resultado, a busca correspondia a espécie “esperada” a identificação, *A.gibertii*. Quando a melhor resposta correspondia a várias espécies (com o mesmo score ou superior), incluindo a espécie *A.gibertii*, a identificação se dava pela diferença em sua morfologia das demais espécies elencadas. O score encontrado em ambas plataformas, BLAST® e GenBank®, para a F1 foi de 98,97%, F2 foi de 98,98% e F3 foi de 98,71%. Os autores Kress, Hollingsworth e Kelly (HOLLINGSWORTH; ANDRA CLARK; FORREST; RICHARDSON *et al.*, 2009; KELLY; AMEKA; CHASE, 2010; KRESS; ERICKSON; JONES; SWENSON *et al.*, 2009), após realizarem suas respectivas pesquisas concluíram que o marcador *matK* sozinho é suficiente para a identificação a nível de espécie, o que para nossa pesquisa foi essencial.

5.3.2 Análise das sequências do gene *matK* e *rbcL*

Todas as amostras (Forma 1, 2 e 3) amplificadas por PCR foram sequenciadas, nas fitas *forward* e *reverse*, tanto para o gene *matK*, quanto para o *rbcL*, todas geraram eletroferogramas de boa qualidade para o gene *rbcL* e o gene *matK*. O comprimento das sequências *barcodes* obtidas das formas 1, 2 e 3 (indivíduos) de *Aristolochia gibertii* foi, em média de 841pb para *matK* e 618 para *rbcL*, se enquadrando no comprimento recomendado para as Angiospermas (FAZEKAS; BURGESS; KESANAKURTI; GRAHAM *et al.*, 2008; KRESS; ERICKSON, 2012).

As sequências *forward* e *reverse* foram editadas e as fitas consenso obtidas utilizando-se o programa Chromas (versão 2.6.6). O tamanho do fragmento gerado para *matK* foi cerca de 924 pb, porém todas as extremidades de ambas as regiões foram eliminadas, restando 781 pb para análise, para o *rbcL* o tamanho de fragmento gerado foi de 618 pb, mas foram analisados apenas 602 pb, depois essas foram alinhadas usando o programa de montagem Cap3 contig. gerando as fitas consenso.

Numerosos marcadores, individualmente ou em combinação, foram sugeridos para DNA barcoding de plantas (CHASE; COWAN; HOLLINGSWORTH; VAN DEN BERG *et al.*, 2007; KRESS; ERICKSON, 2007; LAHAYE; VAN DER BANK; BOGARIN; WARNER *et al.*, 2008; NEWMASTER; FAZEKAS; RAGUPATHY, 2006), nesse estudo utilizamos em combinação o *matk* + *rbcl*.

A partir do alinhamento das sequências das amostras, Forma 1 (Mato Grosso), Forma 2 (Selviria), Forma 3 (Dourados) e o acesso AB060792.1 do BLASTn® de *A.gibertii*, as mesmas foram comparadas, foi observado ao todo 17 sítios variáveis para o gene *matK*, sendo eles: 194, 197, 285, 288, 329, 339, 381, 446, 464, 509, 544, 550, 551, 562, 564, 576 e 588 (Fig. 10), o que representa em torno de 1,92 % de variação intraespecífica das amostras. Foram encontrados 1 gap (inserção-deleção) entre as sequências, sítio 194.

O CBOL (PLANT, 2009) recomenda a combinação de *matK* + *rbcL* para identificação de plantas, pois essa combinação abrange uma maior universalidade, qualidade da sequência, discriminação e custo. Por conta disso as análises realizadas nesse trabalho foram feitas com base nessas duas regiões.

As frequências de nucleotídeos do gene *matK* das amostras analisadas são: 30,56% (A), 35,70% (T), 17,63% (C) e 16,11% (G). As razões de taxa de transição/transversão são $k1 = 14,275$ (purinas) e $k2 = 0,912$ (pirimidinas). A tendência geral de transição/transversão é $R = 3,054$, onde $R = [A*G*k1 + T*C*k2]/[(A+G)*(T+C)]$. Esta análise envolveu 4 sequências de nucleotídeos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de deleção em pares). Havia um total de 776 posições no conjunto de dados final (Tabela 4).

Tabela 4. Probabilidade de substituições nucleotídicas (linhas x colunas), em valores percentuais, calculados para o gene *matK* das três amostras e um acesso (AB060792.1) de *A.gibertii*, de acordo com o modelo de substituição de T92 Tamura 3-parameter (Tamura *et al.*, 2021).

Estimativa da Probabilidade Máxima Composta do Padrão de Substituição de Nucleotídeos (<i>matK</i>)				
	A	T	C	G
A	–	3.9	1.93	25.13
T	3.34	–	1.76	1.76
C	3.34	3.56	–	1.76
G	47.69	3.9	1.93	–

* Cada entrada mostra a probabilidade de substituição (r) de uma base (linha) para outra base (coluna). Para simplificar, a soma dos valores de r é igual a 100. As taxas de substituições transicionais diferentes são mostradas em negrito e as de substituições transversais são mostradas em itálico.

O gene *rbcL* em toda sua extensão, total de 602 pb, nas amostras de *A. gibertii* analisadas não apresentaram nenhuma diferença todos os sítios foram conservados. As frequências nucleotídicas do gene *rbcL* das amostras analisadas são: 27,48% (A), 29,10% (T), 20,49% (C) e 22,93% (G) (Fig. 11). As razões de taxa de transição/transversão são $k1 = 0$ (purinas) e $k2 = 0$ (pirimidinas). O viés geral de transição/transversão é $R = 0$, onde $R = [A * G * k1 + T * C * k2] / [(A + G) * (T + C)]$. Esta análise envolveu 3 sequências de nucleótidos (Tabela 5).

Tabela 5. Probabilidade de substituições nucleotídicas (linhas x colunas), em valores percentuais, calculados para o gene *rbcL* das três amostras e um acesso (AB060792.1) de *A.gibertii*, de acordo com o modelo de substituição de T92 Tamura 3-parameter (Tamura *et al.*, 2021).

Estimativa da Probabilidade Máxima Composta do Padrão de Substituição de Nucleotídeos (<i>rbcL</i>)				
	A	T	C	G
A	–	<i>14.55</i>	<i>10.24</i>	0
T	<i>13.74</i>	–	0	<i>11.47</i>
C	<i>13.74</i>	0	–	<i>11.47</i>
G	0	<i>14.55</i>	<i>10.24</i>	–

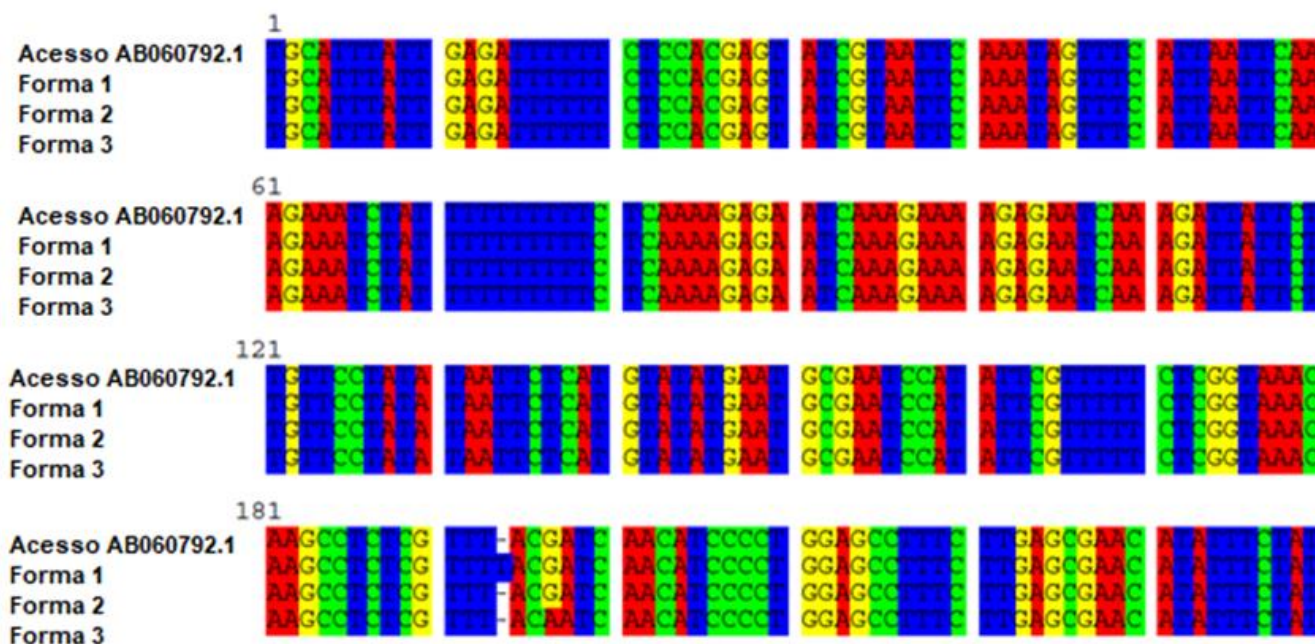
*Cada entrada mostra a probabilidade de substituição (r) de uma base (linha) para outra base (coluna). Para simplificar, a soma dos valores de r é igual a 100. As taxas de substituições transicionais diferentes são mostradas em **negrito** e as de substituições transversais são mostradas em *itálico*

Dentre as sequências estudadas, o gene *matK* foi o que apresentou a maior capacidade de discriminação nucleotídica das amostras em relação ao *rbcL*, destacando uma variação intraespecífica já esperada devido a diferença morfológica encontrada nas flores que das formas 1, 2 e 3. No caso do *matK* conseguimos utilizar a sequência do acesso AB060792.1 do BLASTn® para melhorar a comparação das nossas amostras e ampliar os resultados. No entanto, o número limitado de sequências de DNA dessa espécie de planta, em qualquer região específica, no banco de dados como GenBank tem restringido o desenvolvimento de identificação por DNA *barcoding* para *Aristolochia gibertii* e outras espécies do gênero, para a região *matK* foram encontradas apenas uma sequência depositada do autor Jin Murata (MURATA; OHI; WU; DARNAEDI *et al.*, 2001) que foi o acesso a qual utilizamos para comparação com as nossas amostras, já para a região *rbcL* não foi encontrado nenhum acesso no banco de dados GenBank.

Entre as regiões de plastídios, o *rbcL* é o gene mais bem caracterizado em relação ao *matK* de acordo com CBOL (PLANT, 2009). Para Fazekas, (FAZEKAS; BURGESS; KESANAKURTI; GRAHAM *et al.*, 2008) as melhorias no projeto do primer o tornam facilmente recuperável em plantas terrestres e é adequado para a recuperação de sequências bidirecionais de alta qualidade. Kress & Erickson relatam que embora seja uma região boa para identificação a nível de espécie não é a região mais variável (KRESS; ERICKSON, 2007), como podemos identificar no estudo, pois enquanto o *matK*

apresentou variações nos sítios nucleotídicos, o *rbcL* não mostrou nenhuma variação, o que comprova que ambas as amostras são pertencentes a mesma espécie, pois ele é um componente frequente das combinações multilocais de melhor desempenho para a discriminação de espécies (KRESS; WURDACK; ZIMMER; WEIGT *et al.*, 2005). Estes resultados condizem com os níveis de resolução apresentados pelo *matK*, de acordo com (FORD; AYRES; TOOMEY; HAIDER *et al.*, 2009) esta é uma região plastidial codificante que apresenta altas taxas de evolução e que já está estabelecida, justamente devido ao seu alto grau de variação em níveis hierárquicos inferiores. Diversos artigos apontam para esse poder discriminatório em diferentes grupos de plantas. Corroborando com os autores citados Dechbumroong e colaboradores (DECHBUMROONG; AUMNOUYPOL; DENDUANGBORIPANT; SUKRONG, 2018) que em seu trabalho também observou o grau de variação de sequência entre suas amostras e chegou a seguinte classificação: ITS2 > *trnH-psbA* > *matK* > *rbcL*, as grandes inserções/exclusões no ITS2 causaram alta variação (28,98%) entre as onze espécies de *Aristolochia* muito superiores às *trnH-PSBA* (11,56%), *matK* (11,15%) e *rbcL* (3,29%). Mostrando que entre *matK* e *rbcL*, a região *matK* sempre apresenta uma maior variação.

Figura 10. Alinhamento das sequências *matK* das três amostras e um acesso (AB060792.1) de *A. gibertii*



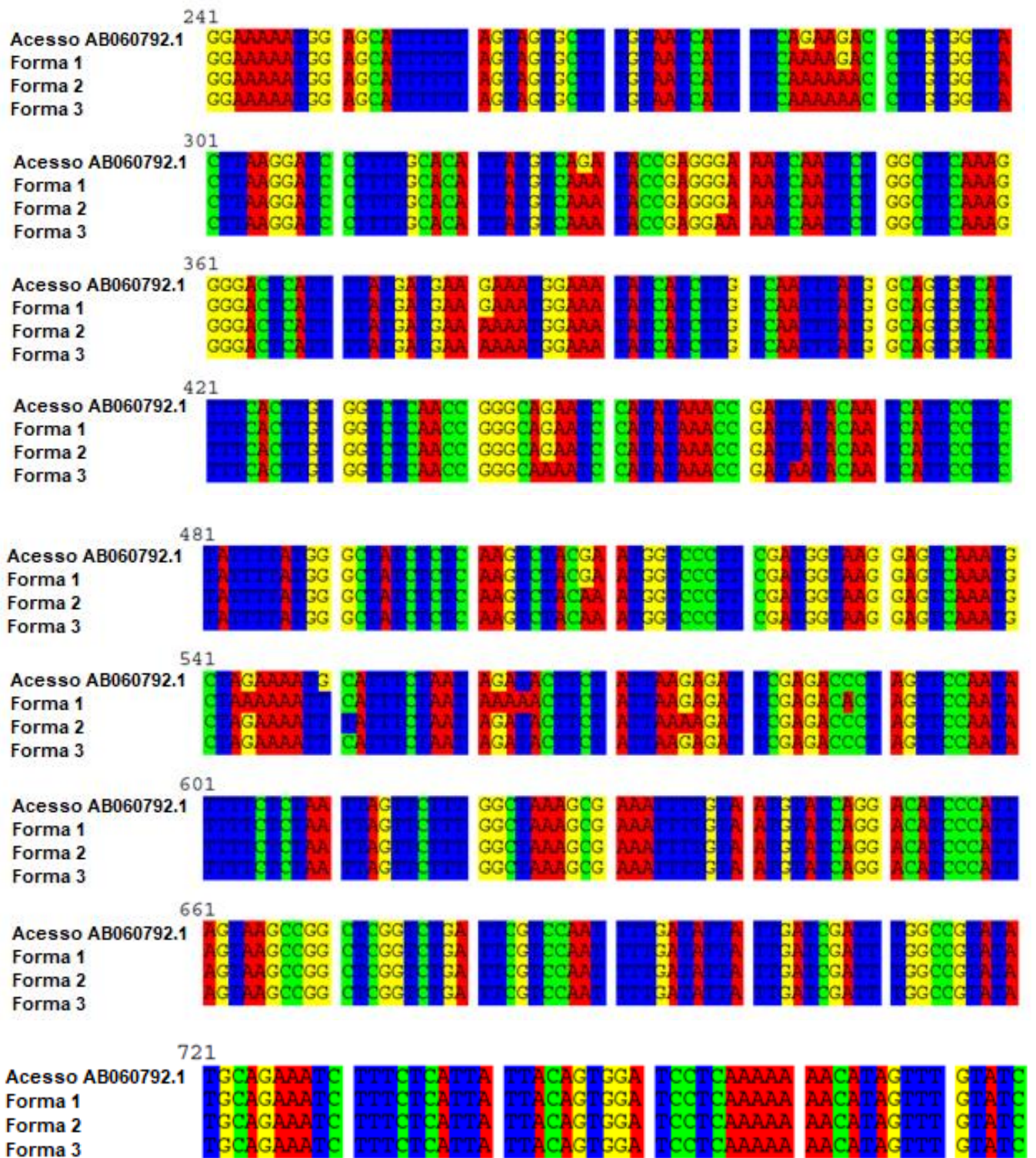
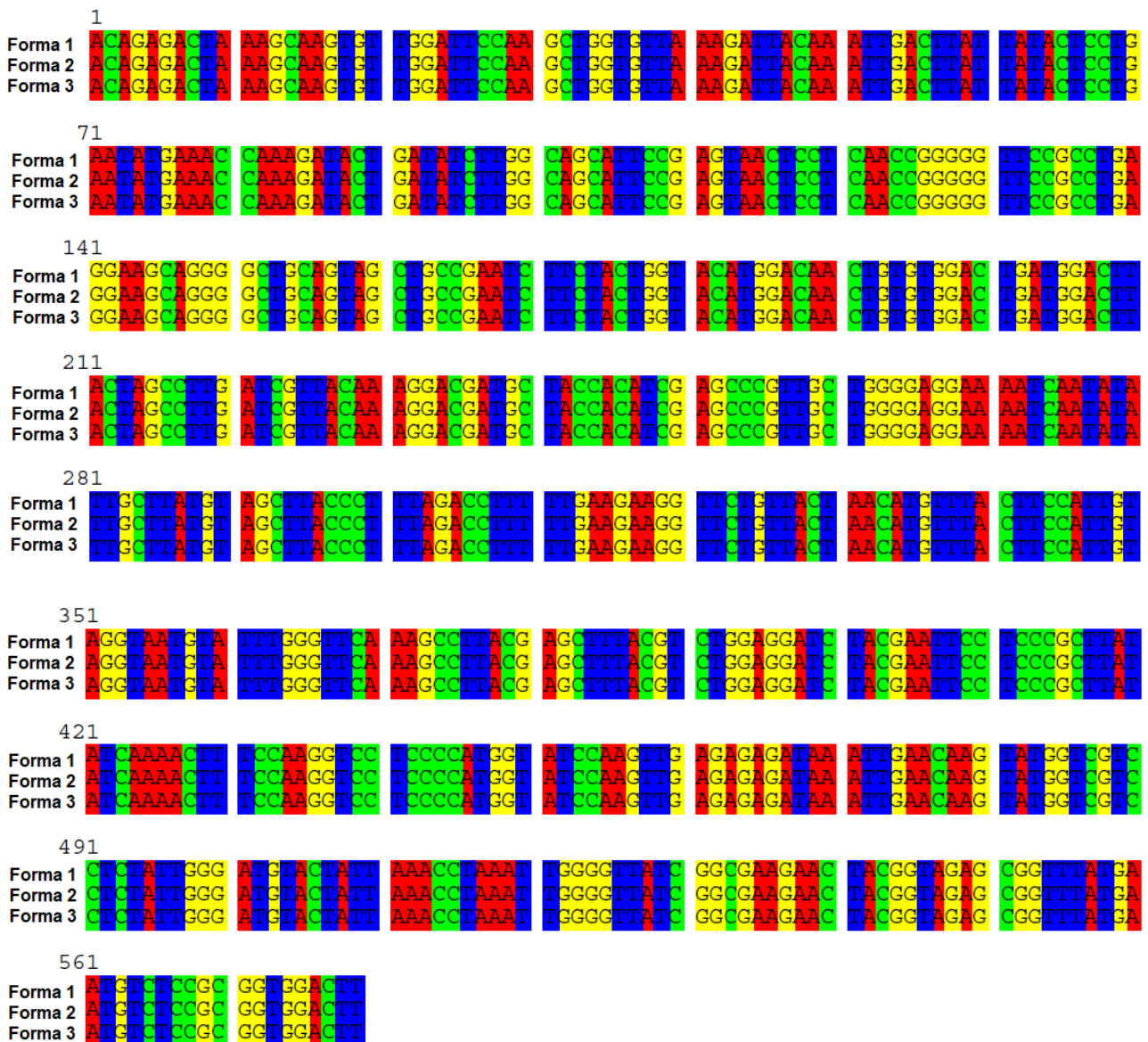


Figura 11. Alinhamento das sequências *rbcL* das três amostras de *A.gibertii*.



Para a análise de divergência entre sequências nucleotídicas, foram calculadas as (Pairwise Distance) distâncias pareadas (Tabela 6), apresentadas em percentuais de substituição de bases por sítio, considerando o modelo de substituição de T92 Tamura 3-parameter no programa MEGA version 11 (TAMURA; STECHER; KUMAR; EVOLUTION, 2021).

Tabela 6. Comparação das distâncias pareadas “Pairwise” entre as sequencias barcodes de *matK* das formas de *A. gibertii*. A similaridade foi calculada para um determinado par de amostras, esse é expresso em porcentagem e destacada na cédula abaixo.

Amostra	Acesso	Descrição	“Pairwise” similaridade em		
			GenBank	Forma1	Forma2
GenBank	AB060792.1	Disponível no BLAST e GenBank	–	–	–
Forma1	DA	Mato Grosso- MT	99.10%	–	–
Forma2	DA	Selvária-MS	98.97%	98.84%	–
Forma3	DA	Dourados -MS	98.71%	98.58%	99.22%

*Cultivado no Jardim de Plantas Medicinais da UFGD. Δ Valores encontrados usando o software MEGA11; Gaps de alinhamento foram removidas por exclusão completa. *DA: Depósito em Andamento.

Todas as formas (F1, F2 e F3) mostram um resultado satisfatório de porcentagem de similaridade em relação ao acesso do GenBank, superior a 98,71%, mostrando veracidade na identificação de *A.gibertii* sendo esse valor mínimo referente a F3 (dourados) que se mostra “mais” distante em relação as outras, além disso a F3 tem uma distância de 1,42% em relação a F1 e de 0,78% em relação a F2, o que mostra F3 mais próxima geneticamente de F2 do que de F1, que foi a que teve maior porcentagem de similaridade com o acesso do GenBank, 99,10%, se distanciando de F2 em apenas 1,16%, o que corrobora com o dendrograma de distanciamento entre as formas Neighbor-Joining (Fig. 12).

5.3.3 Análise comparativa do dendrograma

A análise de agrupamento utilizando-se o método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei., 1987), produzida no programa MEGA X® é apresentada na Figura 12.

As três sequências barcodes foram utilizadas para gerar diferentes árvores de distância genética através do programa MEGA X® (Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 11 (Tamura K, Stecher G, and Kumar S 2021) os quatro conjuntos de dados resultantes da região *matK* foram avaliados pelo método de análise Neighbour-Joining (NJ) ou Agrupamento de Vizinhos, que se baseia no princípio de evolução mínima onde para dois indivíduos serem considerados próximos é preciso que haja ocorrido o menor número de mudanças entre eles, ou seja são

agrupados de maneira a minimizar o comprimento total da árvore, isso usando o coeficiente de distância euclidiana para construção do dendrograma (Fig. 12).

O resultado desta técnica pode contribuir para a definição de um esquema de classificação ou podem sugerir um conjunto de regras para classificar novos objetos em novas classes com fins diagnósticos. Assim como as análises morfológicas e anatômicas, a genética também sustenta a hipótese de que dentre as formas de *A.gibertii*, a F1 está mais próxima de F2 do que de F3, e F2 está mais próxima de F1 do que de F3. Sendo F3 (dourados) a que mais se diferencia geneticamente das outras formas (Fig. 12).

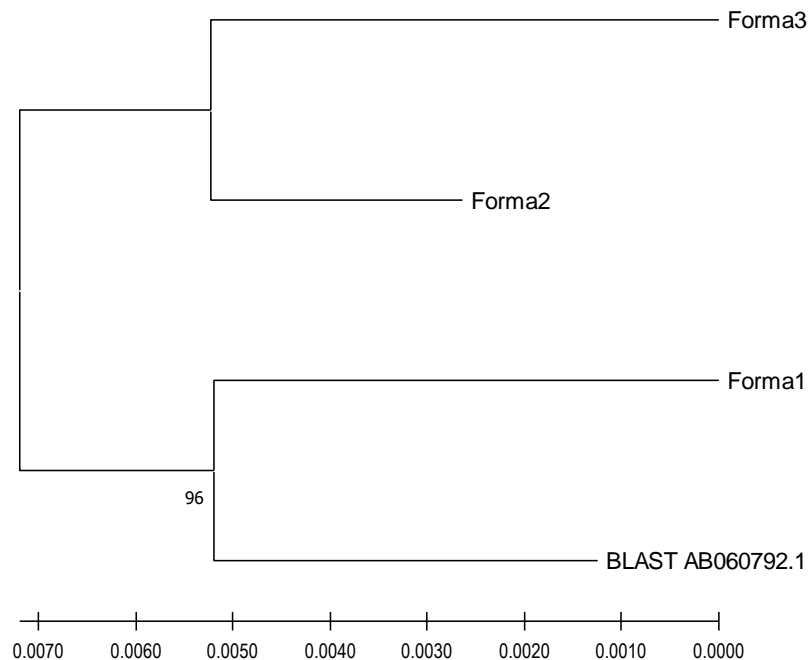


Figura 12. Análise de agrupamento baseada no método Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) com os dados das amostras (formas) de *Aristolochia gibertii* usando a região matK. As distâncias evolutivas foram definidas usando-se o modelo T92 Tamura 3-parameter (TAMURA; STECHER; KUMAR; EVOLUTION, 2021). Os números próximos dos cladogramas indicam os valores percentuais do teste de Bootstrap com 1000 repetições. Árvores não enraizadas foram realizadas no MEGA X (KUMAR; STECHER; LI; KNYAZ *et al.*, 2018).

5.4 Química

5.4.1 Compostos de RMN de ^1H e de ^{13}C e UHPLC-MS/MS

O estudo químico dos extratos metanólicos e hexânicos de folhas de *A. gibertii*, resultou na identificação de 27 substâncias, a determinação estrutural dos compostos a seguir foi efetuada com base nas análises dos dados espectrométricos de RMN de ^1H e de ^{13}C sendo eles: Ácido Colavênico (**1**), Ácido Copálico (**2**), Trigonellina (**5**) e Kusunoquinina (**22**), já os compostos de 3 a 27 foram propostos baseando-se no perfil de fragmentação delas pelo UHPLC-MS/MS, sendo eles: Dissacarídeo (Hexose-hexose) (**3**), Alantoína (**4**), Trigonelina (**5**), Magnocurarina (**6**), N-Metilcoridino ou Menisperina (**7**), Anonamina ou N,N-Dimetilcaaverina (**8**), N-Metilfibrecisina (**9**), O-Nornuciferina-N-óxido (N-Metilassimilobina-N-óxido) (**10**), 8-Hidroxi-1,2-metilenodioxiaporfina-N-óxido (**11**), Loliolide (**12**), N-Metilushinsunina ou N-Metilsteporfina (**13**), N-Metilayuthianine ou seu isômero 4-hidroxi (**14**), Anonamina ou N,N-Dimetilcaaverina (**15**), Aporeína-N-óxido (**16**), Ácido 3-[(3-metoxi-4-hidroxifenil)metil]-4-hidroxi-2-[(3,4-metilenodioxifenil)metil]-butan-1-óico (**17**), Ácido 3-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-4-hidroxi-2-[(3,4-metilenodioxifenil)metil]-butan-1-óico (**18**), Ácido 2,3-[bis(3,4-metilenodioxifenil)metil]-butan-1-óico (**19**), 3',4'-Dimetoxi-3,4-metilenodioxo-7,9'-epoxilignan-7'-ol (**20**), Epímeros interconversíveis de trans-cubebina: α -cubebina(20a)+ β -cubebina(20b) (**21**), Kusunoquinina (**22**), Hinoquinina (**23**), Ácido 2-oxocolavênico (**24**), Ácido 2-oxo-3-cleroden-15-óico (**25**), Ácido 8 β -hidroxi-labd-13(E)-en-15-óico (**26**), Ácido 8 β -hidroxi-labdan-15-óico (**27**) (Tab.7) (MARCHESINI; PRADO; MESSIANO; MACHADO *et al.*, 2009; MESSIANO; VIEIRA; MACHADO; LOPES *et al.*, 2008).

5.4.2 Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C

Ácido Colavênico (**1**)

Negativo HR-ESI-MS (probe) 3 kV, m/z : 303.2335 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (cálculo para $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_2$, 303.2324). RMN ^{13}C (75.47 MHz, CDCl_3): δ 171.7 (C-15), 164.6 (C-13), 144.4 (C-4), 120.4 (C-3), 114.7 (C-14), 46.4 (C-10), 38.7 e 38.1 (C-5 e C-9), 36.7 (C-6), 2 \times 36.2 (C-8 e C-11), 34.9 (C-12), 27.4 (C-7), 26.8 (C-2), 19.9 (C-19), 19.4 (C-16), 18.2 e 18.3 (C-1 e C-20), 18.0 (C-18), 15.9 (C-17). RMN ^1H (300.15 MHz, CDCl_3): δ 5.68 (br s, 1H, H-14),

5.19 (br s, 1H, H-3), 2.16 (s, 3H, CH_3 -16), 1.58 (br s, 3H, CH_3 -18), 0.99 (s, 3H, CH_3 -19), 0.80 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, CH_3 -17), 0.73 (s, 3H, CH_3 -20).

Ácido Copálico (2)

Negativo HR-ESI-MS (probe) 3 kV, m/z : 303.2329 $[\text{M-H}]^-$ (cálculo para $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_2$, 303.2324). RMN ^{13}C (75.47 MHz, CDCl_3): δ 171.4 (C-15), 164.1 (C-13), 148.2 (C-8), 114.6 (C-14), 106.3 (C-17), 56.1 (C-9), 55.4 (C-5), 42.0 (C-3), 40.0 (C-12), 39.7 (C-10), 39.0 (C-1), 38.2 (C-7), 2×33.6 (C-4 E C-18), 24.4 (C-6), 21.7 (C-19), 21.4 (C-11), 19.3 (C-2), 19.2 (C-16), 14.4 (C-20). RMN ^1H (300.15 MHz, CDCl_3): δ 5.68 (br s, 1H, H-14), 4.85 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, H-17_a), 4.48 (br s, 1H, H-17_b), 2.16 (s, 3H, CH_3 -16), 0.87 (s, 3H, CH_3 -18), 0.80 (s, 3H, CH_3 -19), 0.68 (s, 3H, CH_3 -20).

Trigonelina (5)

Positive HR-ESI-MS (probe) 3 kV, m/z : 138.0551 $[\text{M+H}]^+$ (calc for $\text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_2$, 138.0555). ^1H NMR (300.15 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 9.19 (s, 1H, H-2), 8.86 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-6), (8.74, d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-4), 8.00 (dd, $J = 8.0$ and 6.0 Hz, 1H, H-5), 4.36 (s, 3H, N-CH_3).

Kusunoquinina (22)

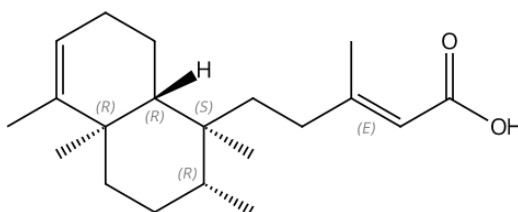
Positivo HR-ESI-MS (probe) 3 kV, m/z : 371.1498 $[\text{M+H}]^+$ (cálculo para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_6$, 371.1495). RMN ^1H (300.15 MHz, CDCl_3): δ 6.76 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-5'), 6.71 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5), 6.60 (br s, 1H, H-2), 6.47 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-2'), 5.93-5.95 (comp, 2H, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 4.15 (dd, $J = 9.4$ and 7.0 Hz, 1H, H-9'_a), 3.88 (comp, 1H, H-9'_b), 3.86 (s, 3H, OCH_3 -4'), 3.83 (s, 3H, OCH_3 -3'), 2.96 (dd, $W_{1/2} = 14.1$ and 5.0 Hz, 1H, H-7_a), 2.85 (dd, $W_{1/2} = 14.1$ and 6.8 Hz, 1H, H-7_b). RMN ^{13}C (75.47 MHz, CDCl_3): δ 178.6 (C-9), 149.0 (C-3'), 2×147.8 (C-3,4'), 146.4 (C-4), 131.3 (C-1), 130.4 (C-1'), 122.2 (C-6), 120.6 (C-6'), 111.7 (C-2'), 111.2 (C-5'), 109.4 (C-2), 108.1 (C-5), 101.0 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), 71.2 (C-9'), 55.8 (OCH_3 -4'), 55.7 (OCH_3 -3'), 46.4 (C-8), 41.2 (C-8'), 38.2 (C-7'), 34.7 (C-7).

5.4.3 Análise dos compostos

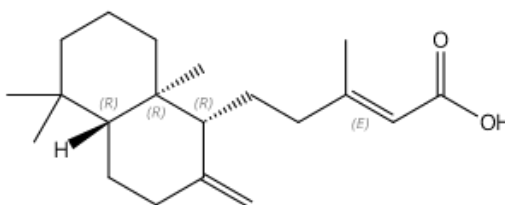
Os extratos hexânicos E1 (referente a F3 = Forma 3 Dourados), E2 (referente a F1 = Forma 1 Mato Grosso) e E3 (referente a F2 = Forma 2 Selvíria), metânicos E4 (referente a F3 = Forma 3 Dourados), E5 (referente a F1 = Forma 1 Mato Grosso) e E6 (referente a F2 = Forma 2 Selvíria).

Para cada forma (F1, F2 e F3) de *A. gibertii* foi identificada uma substância majoritária que se destacou dos demais compostos identificados, se diferenciando entre as formas. Na F1 (extratos E2 e E5) o composto foi o Ácido Colavênico (1), na F2 (extratos E3 e E6) foi o Ácido Copálico (2) e na F3 (extratos E1 e E4) a Kusunoquinina (3) (Tab. 7; Fig. 14,16).

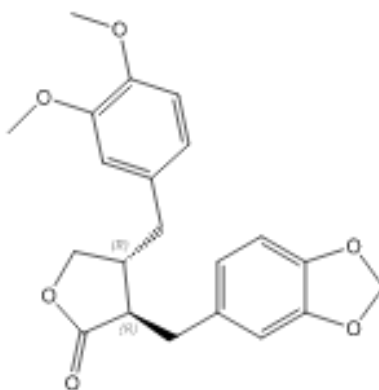
Figura 13. Substâncias majoritárias encontradas nas respectivas formas de *A. gibertii*



Ácido Colavênico (1)



Ácido Copálico (2)



Kusunoquinina (3)

O composto diterpeno clerodano, ácido colavênico, já foi descrito na literatura como sendo uma substância com potencial para inseticidas naturais das espécies do gênero *Aristolochia*, se tornando assim uma rota promissora para a descoberta de novos compostos ou preparações botânicas que podem ser usadas na proteção de cultivos contra por exemplo *Anticarsia gemmatilis* H. (Lepidoptera: Noctuidae), essa sendo a principal praga desfolhadora da cultura da soja no Brasil (ZUKERMAN-SCHPECTOR; SOUSA MADUREIRA; MESSIANO; LOPES et al., 2008).

No trabalho de Messiano (MESSIANO; VIEIRA; MACHADO; LOPES et al., 2008) os autores avaliaram a atividade inseticida do extrato bruto de hexano das raízes e folhas de *A. malmeana* contra a larva de *A. gemmatilis*, eles conseguiram uma mortalidade de 50% das larvas, foram descritos, um diterpeno clerodano, ácido Colavênico e três lignanas, kusunoquinina, hinoquinina e cubebina, foram isolados por cromatografia e procedimentos de partição e então avaliados quanto às suas atividades inseticidas individualmente ou em pares, a Kusunoquinina apresentou a maior atividade contra *A. gemmatilis*. Demonstrando que as substâncias identificadas nos extratos das formas de *A. gibertii* nesse estudo, estão de acordo com os descritos na literatura para o gênero *Aristolochia*, porém com algumas diferenças, seja na concentração do metabolito encontrado nas formas ou na existência do mesmo, por exemplo, o composto kusunoquinina (22) é uma substância majoritária da F3 (dourados), porém esse composto é encontrado em concentrações menores em F1 e F2, assim como o ácido Colavênico (1) é majoritária em F1, sendo encontrado em concentrações menores em F2 e não identificada em F3, assim como a hinoquinina (23) que foi identificada na F1 e F2 e não apareceu na F3.

Em Marchesini (MARCHESINI; PRADO; MESSIANO; MACHADO et al., 2009) eles investigaram a composição química dos extratos de folhas e caules, e também a natureza dos óleos essenciais de *A. gibertii*, eles chegaram a isolar 17 compostos do caule e 14 das folhas, dentre esses compostos foram identificados o Ácido Colavênico (1), Ácido Copálico (2), Kusunoquinina (3), Trigonelina (5), Cubebina (21), Hinoquinina (23), Ácido 8 β -hidroxi-labd-13(E)-en-15-óico (26), Ácido 8 β -hidroxi-labd-15-óico (27), e então concluíram que essa espécie é uma rica fonte de diterpenos e lignanas, e que muitos dos compostos encontrados são potenciais agentes contra diversas doenças, como a diabetes, corroborando com os compostos identificados nesse trabalho.

Estudos recentes como de Kurisawa (KURISAWA; YUKAWA; KOSHINO; ONODERA et al., 2020) mostram que o análogo do Ácido Colavênico (KAA: um

estereoisômero em C-9 e C-10 de ácido 6 β -tigloiloxicolavénico) e o próprio composto Àcido Colavénico, foram capazes de suprimir a morte celular de leveduras por fissão e permitiu a reversão dos fusos mitóticos de uma morfologia monopolar para bipolar, o que tem grande importância no desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos que tem como alvo a mitose, especificamente em células cancerosas.

Os diterpenóides com esqueleto de carbono C20 constituem o maior grupo de metabólitos terpenóides encontrados em *Aristolochia*, o primeiro tipo de diterpenóide encontrados é o de esqueleto básico de clerodano, ácido 2-Oxo-populifólico que foi relatado de *A. cymbifera* (LEITÃO; KAPLAN; GALEFFI, 1992) e ácido Colavênico em *A. brasilienses* (LOPES; BOLZANI; TREVISAN, 1987), *A. galeata* (LOPES; BOLZANI, 1988) e *A. malmeana* (MESSIANO; VIEIRA; MACHADO; LOPES et al., 2008), e ácido 2-oxocolavenico que foi identificado em *A. malmeana* (MESSIANO; VIEIRA; MACHADO; LOPES et al., 2008), sendo também observado nas formas F1, apenas traços, F2 e F3, tendo maior concentrações do composto, em *A. gibertii*.

O segundo tipo são os diterpernos labdanos sendo eles o ácido copálico relatado em *A. cymbifera* (SARTORELLI; CARVALHO; REIMAO; LORENZI et al., 2010), esse composto sendo majoritário na F2, e aparecendo em menor concentração em F1, e não observado em F3, *A. esperanzae* e *A. galeata* (LOPES; BOLZANI, 1988), e 6- β -ácido hidroxycopálico. De acordo com Kuo (KUO; LI; WU; MEDICINE, 2012) as espécies de *Aristolochia* são fontes ricas de diterpenóides caurano, eles identificaram oito diterpenóides caurano nas espécies *A. constricta*, *A. elegans* e *A. pubescens*.

O ácido copálico tem grande potencial como demonstrado no trabalho de Matos (MATOS; MAHONEY; CHAN; DAY et al., 2015) onde os autores avaliaram o desse composto que mostrou resultados promissores para a inibição da *Mycobacterium tuberculosis*. Em De Souza (DE SOUZA; LEANDRO; DA SILVA MORAES; ABRÃO et al., 2018) o ácido copálico apresentou atividade antibacteriana *in vitro* e um potencial agente inibidor de biofilme contra as bactérias anaeróbias *Peptostreptococcus anaerobius* e *Actinomyces naeslundii*.

Uma substancia interessante pelo seu potencial farmacêutico foi a alantóina, 5-ureida-hidantoína, identificada em F1 e F2, descrito na literatura como tendo atividades, entre elas: cicatrizante, hidratante, analgésico e atividade queratolítica. Por todos esses relatos, a alantoína tem sido utilizada em preparações cosméticas e farmacêuticas há mais de anos com diferentes finalidades terapêuticas e principalmente como potenciador da cicatrização de feridas (BUTTCHEVITZ, 2018; GUS' KOV; KLETSKII; KORNIENKO;

OLEKHNOVICH *et al.*, 2002; GUS' KOV; SHKURAT; MILYUTINA; PROKOF'EV *et al.*, 2001; LOOTS; JOUBERT, 1979; PEREIRA; AVILA; DO CARMO; SIQUEIRA *et al.*, 2018; SHESTOPALOV; SHKURAT; MIKASHINOVICH; KRYZHANOVSKAYA *et al.*, 2006). Araújo (ARAÚJO; GRABE-GUIMARÃES; MOSQUEIRA; CARNEIRO *et al.*, 2010) avaliou e caracterizou o perfil cicatricial induzido pela alantoína, onde ele mostrou pela primeira vez a eficácia na cicatrização induzida pela alantoína em ratos, demonstrando que essa substância é capaz de melhorar e acelerar o processo de reconstituição da pele.

Na parte da análise química observamos que dos diferentes compostos identificados, como destacado na Tab.7, alguns estavam presentes, ausentes, apresentavam apenas traços ou eram substâncias majoritárias nas Formas 1, 2 e 3, sendo essas diferenças vistas em 20 compostos, sendo eles: Ácido Colavênico (**1**), Ácido Copálico (**2**), Dissacarídeo (Hexose-hexose) (**3**), Alantoína (**4**), N-Metilfibrecisina (**9**), 8-Hidroxi-1,2-metilenodioxiaporfina-N-óxido (**11**), Loliolide (**12**), N-Metilushinsunina ou N-Metilsteporfina (**13**), N-Metilayuthianine ou seu isômero 4-hidroxi (**14**), Anononamina ou N,N-Dimetilcaaverina (**15**), Ácido 3-[(3-metoxi-4-hidroxifenil)metil]-4-hidroxi-2-[(3,4-metilenodioxifenil)metil]-butan-1-óico (**17**), Ácido 2,3-[bis(3,4-metilenodioxifenil)metil]-butan-1-óico (**19**), 3',4'-Dimetoxi-3,4-metilenodioxo-7,9'-epoxilignan-7'-ol (**20**), Epímeros interconversíveis de trans-cubebina: α -cubebina(20a)+ β -cubebina(20b) (**21**), Kusunoquinina (**22**), Hinoquinina (**23**), Ácido 2-oxocolavênico (**24**), Ácido 2-oxo-3-cleroden-15-óico (**25**), Ácido 8 β -hidroxi-labd-13(E)-en-15-óico (**26**), Ácido 8 β -hidroxi-labdan-15-óico (**27**).

Demonstrando que os metabolitos secundários produzidos pelos indivíduos das três Formas (F1, F2 e F3) variam em sua concentração ou até mesmo na presença do composto. Inúmeras podem ser as razões pela qual um metabolito secundário se encontra em maior concentração numa população do que em outra, porém como objetivo desse trabalho podemos concluir que as Formas de *A. gibertii* apresentam uma grande variação, entre si, em relação a química de seus indivíduos, mesmo sendo cultivados em condições semi-controladas, num determinada espaço delimitado. Mostrando que, quando falamos de constância de produção de metabolitos, não apenas fatores abióticos devem ser levados em consideração dentro de uma espécie, para a produção de bioprodutos e afins por exemplo, mas também as diferenças genéticas e de adaptação que cada população tem em resposta as suas respectivas regiões geográficas, e condições ambientais, para que

qualquer trabalho feito no ramo de produtos naturais tenha maior replicabilidade e assim se tornem mais exequíveis na área da experimentação.

Na literatura encontramos inúmeros trabalhos de pesquisa usando esses compostos como propostas para os mais variados produtos com resultados extremamente promissores, como descritos acima, então a compressão cada vez mais aprofunda em relação, não somente a espécie que se busca trabalhar, mas aos indivíduos e suas respectivas populações, se torna cada vez mais necessário.

Tabela 7. Relação comparativa dos compostos químicos entre as formas de *A. gibertii*.

Compostos Químicos	Formas de <i>Aristolochia gibertii</i>		
	F1 (Mato Grosso)	F2 (Selvíria)	F3 (Dourados)
1 - Ácido Colavênico	Presente (majoritária)	Presente	Ausente
2- Ácido Copálico	Presente	Presente (majoritária)	Ausente
3- Dissacarídeo (Hexose-hexose)	Presente ^Δ	Presente	Presente
4 - Alantoína	Presente ^Δ	Presente	Ausente
5 - Trigonelina	Presente	Presente	Presente
6- Magnocurarina	Presente	Presente	Presente
7- N-Metilcoridino ^Ω ou Menisperina	Presente	Presente	Presente
8- Anonamina ou N,N-Dimetilcaaverina ^Ω	Presente	Presente	Presente
9 - N-Metilfibrecisina	Presente (traço)	Presente	Presente
10- O-Nornuciferina-N-óxido (N-Metilassimilobina-N-óxido)	Presente	Presente	Presente
11- 8-Hidroxi-1,2-metilenodioxiporfina-N-óxido	Presente ^Δ	Presente	Presente
12 - Loliolide	Ausente	Presente	Presente
13 - N-Metilushinsunina ou N-Metilsteporfina ^Ω	Presente ^Δ	Presente	Presente
14 - N-Metilayuthianine ^Ω ou seu isômero 4-hidroxi ^Ω	Presente ^Δ	Presente	Presente
15- Anonamina ou N,N-Dimetilcaaverina ^Ω	Presente ^Δ	Presente	Presente
16 - Aporeína-N-óxido ^Ω	Presente	Presente	Presente
17 - ácido 3-[(3-metoxi-4-hidroxifenil)metil]-4-hidroxi-2-[(3,4-metilenodioxifenil)metil]-butan-1-óico	Presente (traço)	Presente	Presente
18 - ácido 3-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-4-hidroxi-2-[(3,4-metilenodioxifenil)metil]-butan-1-óico ^Ω	Presente	Presente	Presente
19 - ácido 2,3-[bis(3,4-metilenodioxifenil)metil]-butan-1-óico	Presente ^Δ	Presente	Presente
20 - 3',4'-Dimetoxi-3,4-metilenodioxo-7,9'-epoxilignan-7'-ol	Presente	Presente ^Δ	Presente ^Δ
21 - Epímeros interconversíveis de trans-cubebina: α-cubebina(20a)+β-cubebina(20b) [§]	Presente ^Δ	Presente	Presente
22 - Kusunoquinina	Presente	Presente	Presente (majoritária)
23 - Hinoquinina	Ausente	Presente	Presente
24 - Ácido 2-oxocolavênico	Presente (traço)	Presente	Presente
25 - Ácido 2-oxo-3-clerodeno-15-óico	Ausente	Presente	Presente
26 - Ácido 8β-hidroxi-labd-13(E)-en-15-óico	Ausente	Presente	Presente
27 - Ácido 8β-hidroxi-labd-15-óico	Ausente	Presente	Presente

^Δ O composto foi encontrado em concentração mais baixa do que na(s) outra(s) amostra(s)

Tabela 8. Constituintes químicos encontrados nos extratos E1 a E6 por meio de análises UHPLC-ESI-MS/MS.

Nº.	t_R (min)	FM	Moléculas ionizadas e fragmentos de íons selecionados (m/z)				Anotação ou identificação (**)	Amostras	
			MS	Erro	MS	Erro			MS ² [+ (#) e - (*) modos]
3	0,769	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	365,1061 [M+Na] ⁺	+0,3	387,1141 [M+HCO ₂] ⁻	+0,6	#365,11 → 203,05; 185,04; *387,11 → 341,11; 179,06; 161,05; 149,04; 143,03; 131,03; 119,03; 113,02; 101,02; 89,02; 71,01	Dissacarídeo (Hexose-hexose)	E4 ^Δ , E5, E6
4	0,820	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	159,0519 [M+H] ⁺	-0,5			#159,05 → 131,06; 116,05; 99,02; 88,05; 73,04	Alantoína	E4 ^Δ , E5
5	0,824	C ₇ H ₇ NO ₂	138,0551 [M+H] ⁺	-2,9			#94,07; 92,05	** Trigonelina [§]	E4, E5, E6
6	4,243	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃	314,1753 [M] ⁺	-1,0			#314,18 → 269,12; 237,09; 209,09; 192,10; 175,08; 107,05	Magnocurarina	E4, E5, E6
7	5,488	C ₂₁ H ₂₆ NO ₄	356,1862 [M] ⁺	0,0			#356,19 → 311,13; 296,10; 265,08; 279,10; 237,09; 219,08	N-Metilcoridino ^Ω ou Menisperina	E4, E5, E6
8	5,644	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂	296,1651 [M] ⁺	0,0			#296,16 → 281,14; 265,12; 251,11; 236,08; 219,08; 191,09	Anonamina ou N,N- Dimetilcaaverina ^Ω	E4, E5, E6
9	5,747	C ₁₉ H ₂₀ NO ₃	310,1442 [M] ⁺	-0,4			#310,14 → 265,09; 235,08; 219,08; 207,08	N-Metilfibrecisina ^Ω	E4 ^(Trace) , E5, E6
10	5,904	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃	298,1439 [M+H] ⁺	-1,4			#298,14 → 251,11; 219,08; 191,09	O-Nornuciferina-N-óxido (N- Metilassimilobina-N-óxido)	E1; E2; E3
11	6,008	C ₁₈ H ₁₇ NO ₄	312,1231 [M+H] ⁺	-1,6			#312,12 → 265,09; 252,08; 251,07; 235,08; 207,08	8-Hidroxi-1,2- metilendioxiaporfina-N-óxido	E1 ^Δ ; E2; E3
12	6,008	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	197,1177 [M+H] ⁺	-0,4			#197,12 → 179,11; 161,10; 151,11; 135,12; 133,10; 119,08; 107,09; 91,05	Loliolide	E2, E3
13	6,162	C ₁₉ H ₂₀ NO ₃	310,1446 [M] ⁺	+0,9			#310,14 → 292,13; 276,10; 265,08; 262,12; 247,08; 217,06	N-Metilushinsunina ou N- Metilsteporfina ^{ΩΩ}	E4 ^Δ , E5, E6

14	6,398	C ₂₀ H ₂₂ NO ₄	340,1548 [M] ⁺	-0,2				N-MetilayuthianineΩ ou seu isômero 4-hidroxiΩ	E4 ^Δ , E5, E6
15	6,888	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂	296,1648 [M] ⁺				#296,16 → 251,11; 236,08; 219,08; 208,09; 191,09	Anononamina ou N,N-DimetilcaaverinaΩ	E4 ^Δ , E5, E6
16	7,045	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃	296,1286 [M+H] ⁺	-0,2			#249,09; 236,08; 219,08; 191,09	Aporeína-N-óxidoΩ	E1; E2; E3
17	7,408	C ₂₀ H ₂₂ O ₇			373,1296 [M-H] ⁻		*373,13 → 355,12; 329,14; 314,12; 311,13; 299,13; 284,10; 281,12; 269,12; 261,15; 217,05; 191,07; 163,08; 137,06; 135,05; 133,03	ácido 3-[(3-metoxi-4-hidroxifenil)metil]-4-hidroxi-2-[(3,4-metilenodioxifenil)metil]-butan-1-óico	E4 ^(Trace) ; E5; E6
18	8,134	C ₂₁ H ₂₄ O ₇	411,1422 [M+Na] ⁺	+0,6	387,1461 [M-H] ⁻	+4,4	#371,15 → 353,14; 335,13; 321,11; 303,10; 293,12; 263,11; 177,09; 151,08; 135,04; 121,06; *387,15 → 369,13; 341,14; 217,05; 191,07; 179,07; 163,08; 149,06; 136,05; 135,04; 107,05	ácido 3-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-4-hidroxi-2-[(3,4-metilenodioxifenil)metil]-butan-1-óicoΩ	E4, E5, E6
19	8,702	C ₂₀ H ₂₀ O ₇			371,1142 [M-H] ⁻	+3,0	*371,11 → 353,10; 327,12; 325,11; 323,09; 309,11; 297,11; 279,10; 267,10; 217,05; 191,07; 135,04; 107,05	ácido 2,3-[bis(3,4-metilenodioxifenil)metil]-butan-1-óico	E4 ^Δ , E5, E6
20	9,118	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	395,1465 [M+Na] ⁺	-1,4			#355,15 → 337,14; 233,12; 215,11; 205,12; 151,08; 135,04; 337,14 → 322,12; 307,13; 201,09; 279,14; 177,09; 165,09; 161,06; 149,06	3',4'-Dimetoxi-3,4-metilenodioxi-7,9'-epoxilignan-7'-lo	E1; E2 ^Δ ; E3 ^Δ
21	9,693-10,10	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	321,1126 [M+H-2H ₂ O] ⁺	-0,3			#321,11 → 306,09; 291,10; 276,08; 263,11; 261,09; 233,10; 185,06; 173,06; 161,06; 149,06; 143,05; 135,04; 131,05; 103,05	**Epímeros interconversíveis de trans-cubebina: α-cubebina(20a)+β-cubebina(20b) §	E1 ^Δ ; E2; E3

22	10,11	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	371,1498 [M+H] ⁺	+0,9			#371,15 → 353,14; 335,13; 321,11; 303,10; 293,12; 263,11; 177,09; 151,08; 135,04; 121,06	**Kusunoquinina [§]	E1; E2; E3
23	10,73	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	355,1180 [M+H] ⁺	-0,5			#355,12 → 337,11; 319,10; 289,09; 279,10; 261,09; 231,08; 173,06; 161,06; 149,06; 135,04; 131,05	Hinoquinina	E2; E3
24	10,99	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	341,2096 [M+Na] ⁺	+1,0	317,2129 [M-H] ⁻	+3,9	*317,21 → 299,20; 273,22; 271,21; 257,19; 231,18; 205,16; 203,14; 189,13; 177,13; 173,10; 163,11; 149,10; 121,07	**Ácido 2-oxocolavénico [§]	E1 ^(Trace) ; E2; E3 ^Δ
25	11,20	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	321,2431 [M+H] ⁺	+0,4	319,2285 [M-H] ⁻	+3,7	*319,23 → 301,22; 275,24; 273,22; 259,21; 257,19; 233,19; 231,18; 205,16; 203,14; 189,13; 121,07; 95,05; 83,05	Ácido 2-oxo-3-clerodeno-15- óico	E2; E3
26	12,91	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	305,2481 [M+H-H ₂ O] ⁺	0,0	321,2438 [M-H] ⁻	+2,6	*321,24 → 277,25; 261,22; 245,19; 205,16; 193,16; 177,13; 161,10; 125,10; 99,04	**Ácido 8β-hidroxi-labd-13(E)- en-15-óico [§]	E2,E3
27	12,80 (E2) ou 13,12 (E3)	C ₂₀ H ₃₆ O ₃	307,2640 [M+H-H ₂ O] ⁺	+1,0	323,2599 [M-H] ⁻	+4,0	*323,26 → 307,23; 305,25; 279,27; 263,24; 261,22; 247,21; 231,17; 177,13; 127,11	**Ácido 8β-hidroxi-labdan-15- óico [§]	E2,E3

*Proposta confirmada por dados de ¹³C (parcial ou total) e/ou comparação do perfil de fragmentação obtido com o de uma amostra autêntica. ^Δ O composto foi encontrado em concentração mais baixa do que na(s) outra(s) amostra(s). ^Ω Composto não descrito anteriormente. (Traço)=Quantidade de rastreamento. ^{ΩΩ} Composto não descrito como produto natural. O tempo de retenção de 12 em E2 e E3 diferiu, embora os espectros MS2 observados para 12 em ambas as amostras fossem idênticos, sugerindo um provável efeito de matriz ou a ocorrência de epímeros diferentes (em C-13) em E2 e E3.

Figura 14. Cromatograma com correção de linha de base de varredura completa (CLBs) dos extratos E1 a E3 no modo ESI positivo. a) CLB de E1, b) CLB de E2, c) CLB de E3, e d) sobreposição dos CLBs de E1 a E3.

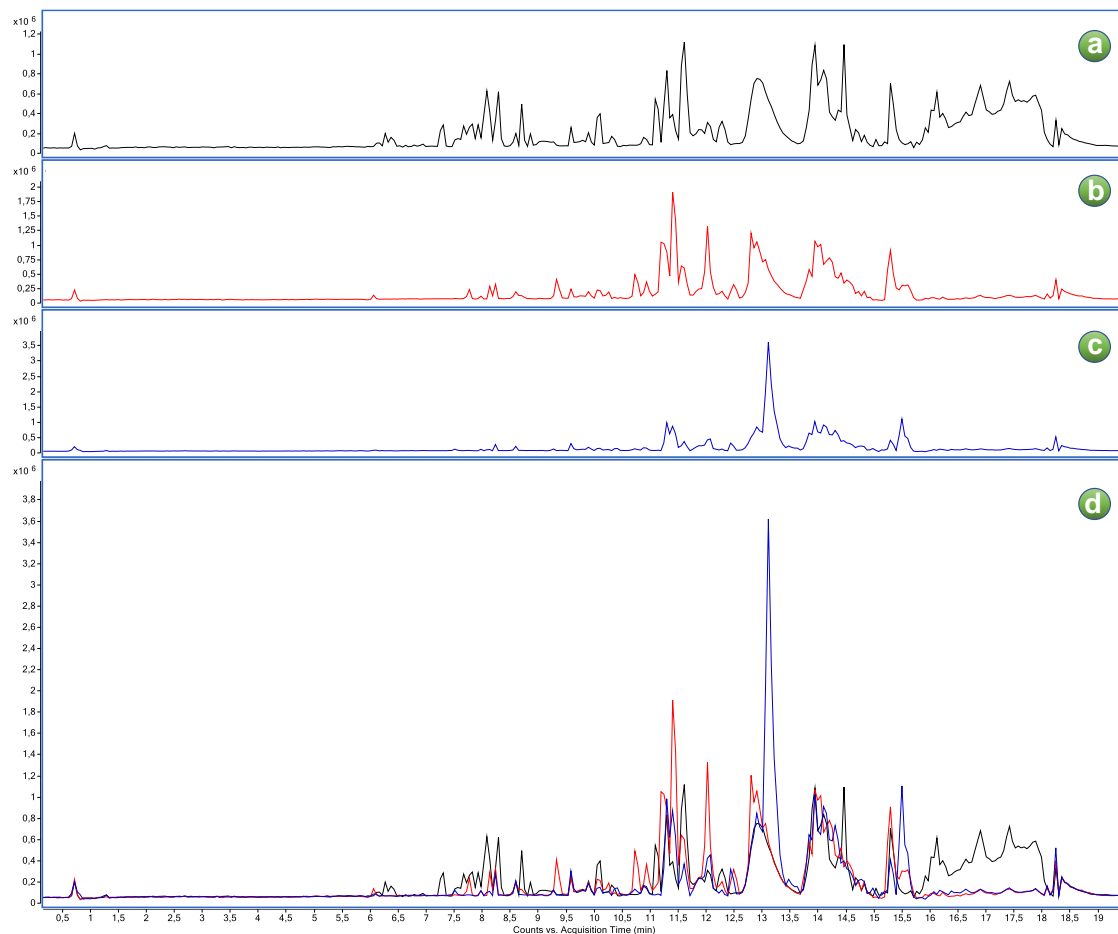


Figura 15. Cromatograma com correção de linha de base de varredura completa (CLBs) dos extratos E1 a E3 no modo ESI negativo. a) CLB de E1, b) CLB de E2, c) CLB de E3, e d) sobreposição dos CLBs de E1 a E3.

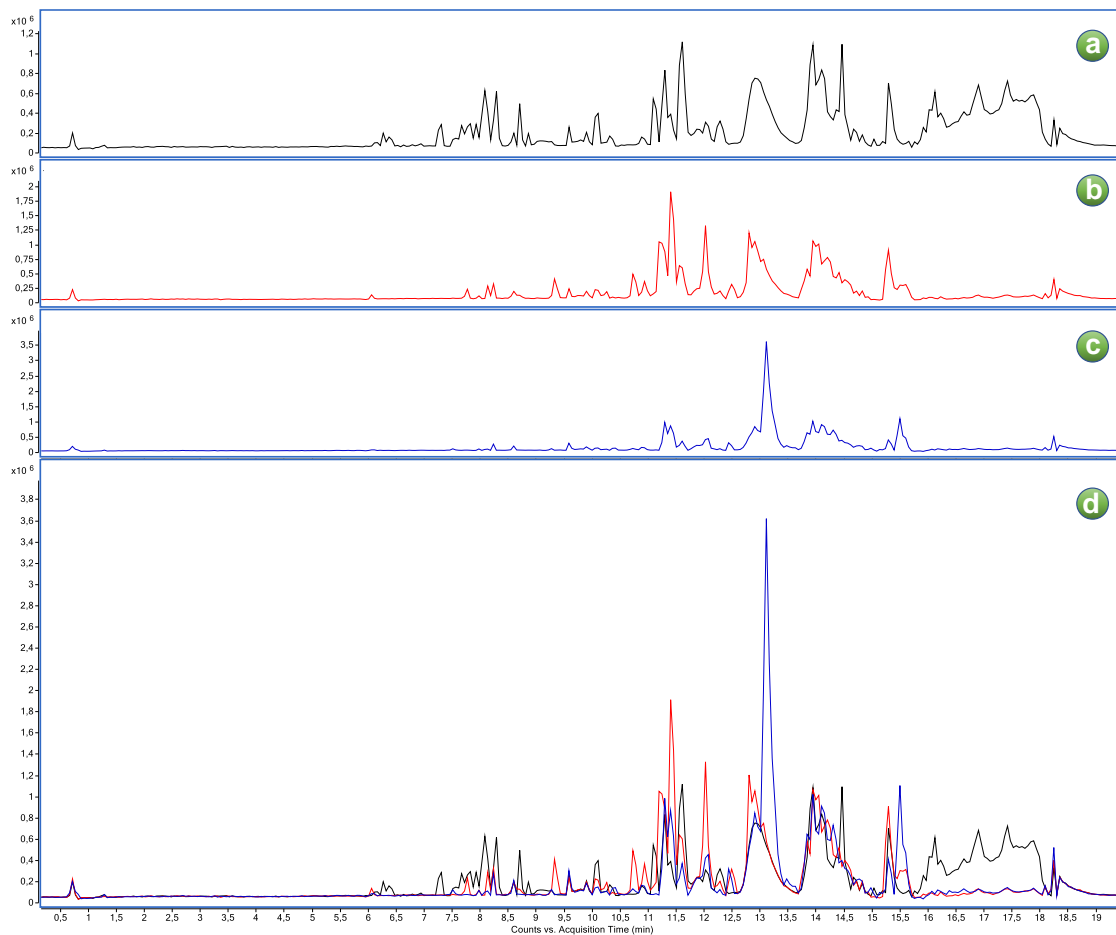


Figura 16. Cromatograma com correção de linha de base de varredura completa (CLBs) dos extratos E4 a E6 no modo ESI positivo. a) CLB de E4, b) CLB de E5, c) CLB de E6, e d) sobreposição dos CLBs de E4 a E6.

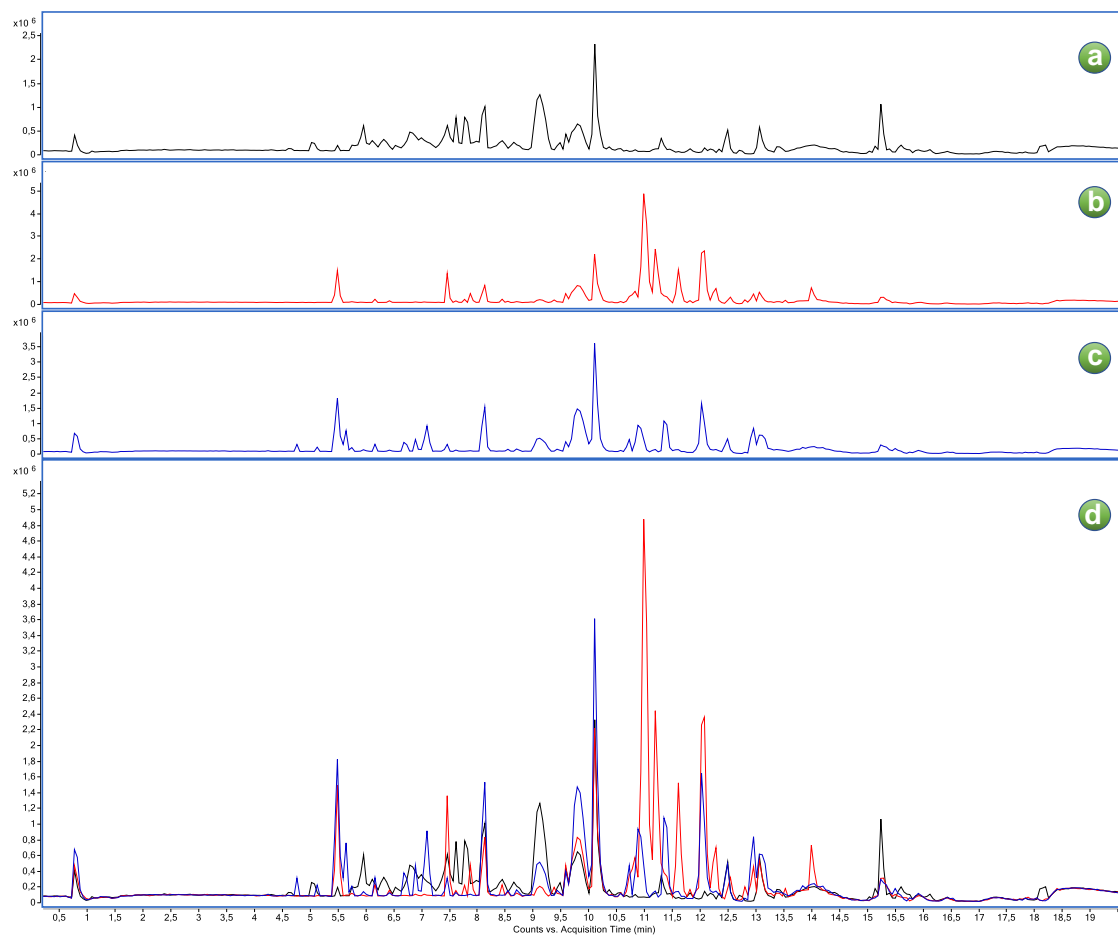
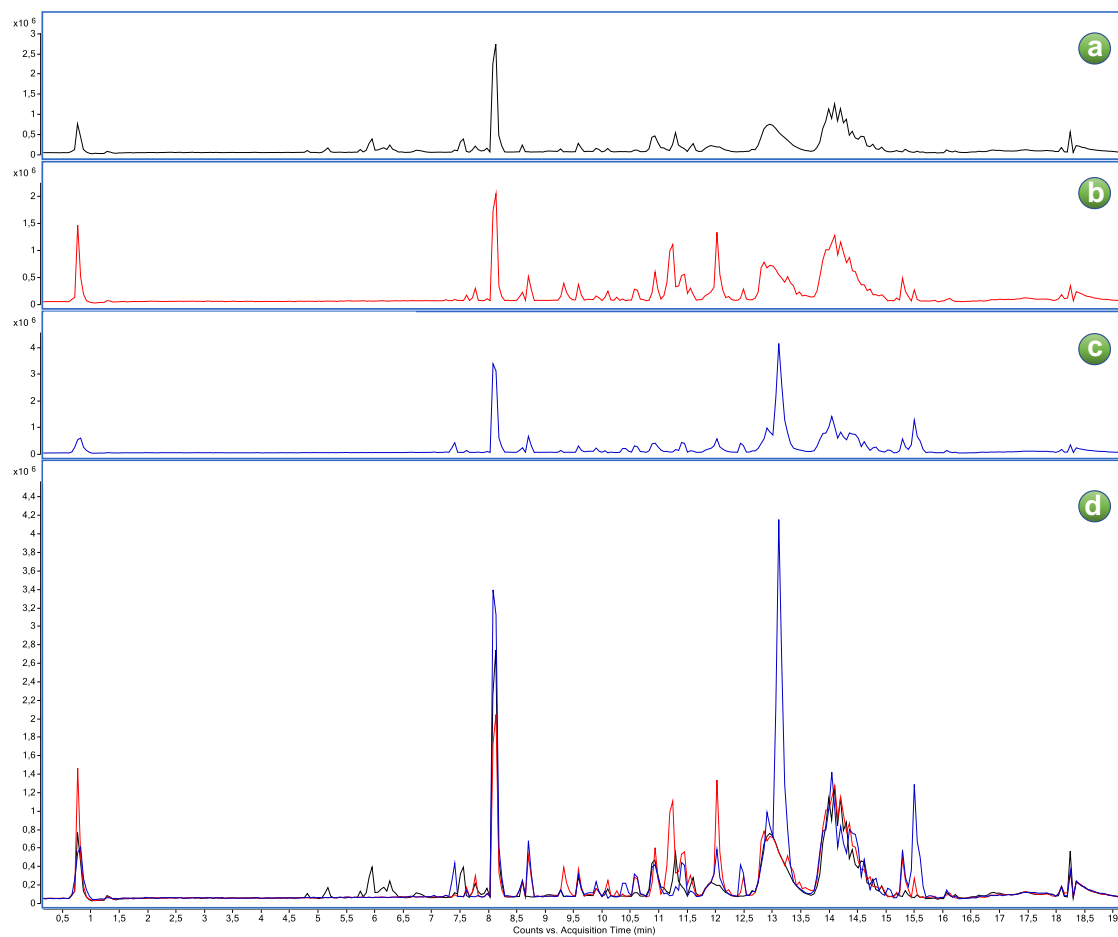


Figura 17. Cromatograma com correção de linha de base de varredura completa (CLB's) dos extratos E4 a E6 no modo ESI negativo. a) CLB de E4, b) CLB de E5, c) CLB de E6, e d) sobreposição dos CLB's de E4 a E6.



6 Considerações Finais

No presente estudo, a morfologia demonstrou algumas diferenças conspícuas entre as formas de *A.gibertii* estudadas, demonstrando que apesar desses indivíduos pertencerem a uma mesma espécie, suas flores possuem medidas distintas, um destaque sendo o comprimento do lábio superior que em F2 é bem maior, tanto visualmente, quanto em centímetros, em relação a F1, que se aproxima mais, e F3 mais distante.

Em relação a anatomia F1 apresentou características mais distintas das demais formas, apresentando cristais como drusas e dipirâmides quadradas alongadas e muito alongadas organizadas em linhas na face abaxial da epiderme das folhas, anel esclerenquimático e cristais de oxalato de cálcio na nervura central, e caule oval com cerca de 15 feixes vasculares e contendo dipirâmides simples e drusas na medula. Cristais de dipirâmides quadradas alongadas de oxalato de cálcio e filhotes na epiderme adaxial e dipirâmides quadradas muito alongadas e filhotes na epiderme abaxial estão presentes nas duas formas F1 e F3, exceto na forma F2. Na F2, um conjunto de cristais de oxalato de cálcio, dipirâmides simples, dipirâmides quadradas alongadas e muito alongadas e drusas são encontradas na medula.

As análises genética, assim como as morfológicas e anatômicas, através dos genes *matK* e *rbcL* sustentaram a hipótese de que dentre as formas de *A.gibertii*, a F1 está mais próxima geneticamente de F2 do que de F3, e F2 está mais próxima de F1 do que de F3. Sendo F3 (dourados) a que mais se diferencia geneticamente das outras formas.

Na química as formas apresentaram compostos majoritários como em F1 o Ácido Colavênico, na F2 Ácido Copálico e na F3 a Kusunoquinina. Sendo que a Kusunoquinina foi identificada em todas as formas porém em concentrações menores em F1 e F2, assim como o Ác. Cópálico e o Ác. Colavênico aparece em F1 e F2 (em diferentes concentrações), mas em F3 não foi observado a presença.

A análise dos dados demonstra que a *Aristolochia gibertii* apresenta uma plasticidade fenotípica bem caracterizada, demonstrada em suas formas (F1, F2 e F3). Essa plasticidade pode ter sido resultado de uma adaptação que está acontecendo nesses indivíduos, por conta da origem geográfica e o distanciamento de cada população original da onde esses indivíduos foram coletados e estavam adaptados da espécie de *A. gibertii*, entre si. Sendo a Forma 1 da região de Mato Grosso, Forma 2 da região de Selviria – MS e a Forma 3 da região de Dourados -MS, essas populações possivelmente tiveram interações distintas em seus ecossistemas de propagação, como condições climáticas,

herbívoros, polinizadores, nutrientes disponíveis no solo, entre outros fatores, para promover uma melhor adaptação local e perpetuação da espécie.

A plasticidade fenotípica está intimamente ligada com as interações ambientais, pois é uma resposta adaptativa que o ser vivo tem em resposta ao ambiente que está inserido, principalmente se tratando de plantas, seres vivos sesses, nesse trabalho observamos que as Formas de *A.gibertii* apresentaram manifestações tanto em sua forma floral, quanto em sua fisiologia e genética.

No momento atual dessa pesquisa os indivíduos das Forma 1, Forma 2 e Forma 3 não chegaram a promover o surgimento de novas espécies, as alterações apresentadas nesse estudo demonstram apenas as adaptações que cada indivíduo teve em relação ao ambiente diferente de cultivo, a qual sua população original estava adaptada, porém com o passar dos anos se esses processos adaptativos aumentaram, talvez possamos observar a especiação dessas Formas no futuro.

7 Referências

- ABBAS, B.; TJOLLI, I. J. B. J. o. B. D. Genetic diversity of sago palm (*Metroxylon sagu*) accessions based on plastid *cpDNA matK* gene as DNA barcoding. 21, n. 1, 2020.
- ABREU, I. S.; GIULIETTI, A. M. J. S. s. C. B. *Aristolochia brunneomaculata*, a new threatened species of Aristolochiaceae from the Atlantic Forest in Bahia, Brazil. 16, 2016.
- ALBERT, C. H.; THULLER, W.; YOCCOZ, N. G.; SOUDANT, A. *et al.* Intraspecific functional variability: extent, structure and sources of variation. 98, n. 3, p. 604-613, 2010.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W. *et al.* Basic local alignment search tool. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ARAUJO, A.; ALVES, M. J. B. *Aristolochia setulosa* (Aristolochiaceae), a new species from northeastern Brazil. 65, n. 3, p. 301-304, 2013.
- ARAÚJO, L. U.; GRABE-GUIMARÃES, A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; CARNEIRO, C. M. *et al.* Perfil do processo de cicatrização induzido pela alantoína. 25, n. 5, p. 460-461, 2010.
- ARMBRUSTER, W. S. J. A. P. Floral specialization and angiosperm diversity: phenotypic divergence, fitness trade-offs and realized pollination accuracy. 6, 2014.
- BARBOSA, T. F. S.; DA SILVA, S. K. C.; MOSCATTO, J. A. J. C.-M. J. Análises organolépticas, físico-química e microbiológicas dos méis consumido no município de Anápolis-GO. 8, n. 1, p. 1-8, 2021.
- BARÔNIO, G. J.; DA CUNHA GUIMARÃES, B. M.; DE OLIVEIRA, L. C.; MELO, L. R. F. *et al.* Entre flores e visitantes: estratégias de disponibilização e coleta de recursos florais. 22, n. 4, 2018.
- BARROS, M. J.; SILVA-ARIAS, G. A.; FREGONEZI, J. N.; TURCHETTO-ZOLET, A. C. *et al.* Environmental drivers of diversity in Subtropical Highland Grasslands. 17, n. 5, p. 360-368, 2015.
- BERTOCCO, A.; MIGACZ, I.; SANTOS, V.; FRANCO, C. *et al.* Microscopic diagnosis of the leaf and stem of *Piper solmsianum* C. DC. 80, n. 8, p. 831-837, 2017.
- BEZERRA, M. Efeito da disponibilidade de recursos do ambiente na variabilidade intraespecífica do cipó *Banisteriopsis caapi*. 2020.

BOTELHO-FILHO, C. R.; IZUMI, G. K.; VIEIRA, J. C.; DE PAIVA BERTOLI, F. M. *et al.* Anatomical description and in vitro evaluation of the antibacterial potential of *Aristolochia esperanzae* kuntze (Aristolochiaceae) extract on oral micro-organisms. 12, n. 4, 2020.

BURGEL, C. F.; MACHADO, V. G. J. B., Recursos hídricos e direito ambiental. O valor da biodiversidade e a necessidade de conservação: considerações sobre a diversidade biológica brasileira e sua proteção jurídica. p. 90.

BUTTCHEVITZ, A. Membranas e esponjas poliméricas para incorporação de fármaco cicatrizante: obtenção e caracterização físico-química. 2018.

CAPELLARI JR, L. Espécies de *Aristolochia L.*(Aristolochiaceae) ocorrentes no estado de São Paulo. 1991. -, Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 205p.

CARDOSO, J. C. F.; VIANA, M. L.; MATIAS, R.; FURTADO, M. T. *et al.* Towards a unified terminology for angiosperm reproductive systems. 32, p. 329-348, 2018.

CHARLESWORTH, D. J. C. B. Evolution of plant breeding systems. 16, n. 17, p. R726-R735, 2006.

CHASE, M. W.; COWAN, R. S.; HOLLINGSWORTH, P. M.; VAN DEN BERG, C. *et al.* A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. 56, n. 2, p. 295-299, 2007.

CHASE, M. W.; SALAMIN, N.; WILKINSON, M.; DUNWELL, J. M. *et al.* Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. 360, n. 1462, p. 1889-1895, 2005.

CHRISTENHUSZ, M. J.; VORONTSOVA, M. S.; FAY, M. F.; CHASE, M. W. J. B. J. o. t. L. S. Results from an online survey of family delimitation in angiosperms and ferns: recommendations to the Angiosperm Phylogeny Group for thorny problems in plant classification. 178, n. 4, p. 501-528, 2015.

CHRISTODOULAKIS, N. S.; KOTSIRONI, K.; TSAFANTAKIS, N.; STEFI, A. L. *et al.* Leaf structure and phytochemical analysis of *Aristolochia baetica*, a traditionally used pharmaceutical plant. 25, n. 2, p. 88-103, 2019.

COSTA, P. d. S.; ZUZA DA SILVA, O. O.; COSTA, D. d. S.; SILVA, L. A. d. O. *et al.* Assessment of the In Vitro antischistosomal activities of the extracts and compounds from *Solidago microglossa* DC (Asteraceae) and *Aristolochia cymbifera* Mart. & Zucc.(Aristolochiaceae). 2020, 2020.

D'ALMEIDA, W.; MONTEIRO, L. M.; RAMAN, V.; REHMAN, J. U. *et al.* Microscopy of *Eugenia involucrata*, chemical composition and biological activities of the volatile oil. 31, n. 2, p. 239-243, 2021.

DAVIS, P.; KHAN, M. *Aristolochia* in the near east. 1961.

DE BRITO, P. S.; SABEDOTTI, C.; FLORES, T. B.; RAMAN, V. *et al.* Light and scanning electron microscopy, energy dispersive X-ray spectroscopy, and histochemistry of *Eucalyptus tereticornis*. 27, n. 5, p. 1295-1303, 2021.

DE PASCOLI, I. C.; NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. J. P. Configurational analysis of cubebins and bicubebin from *Aristolochia lagesiana* and *Aristolochia pubescens*. 67, n. 7, p. 735-742, 2006.

DE SOUZA, M. G. M.; LEANDRO, L. F.; DA SILVA MORAES, T.; ABRÃO, F. *et al.* ent-Copalic acid antibacterial and anti-biofilm properties against *Actinomyces naeslundii* and *Peptostreptococcus anaerobius*. 52, p. 43-49, 2018.

DECHBUMROONG, P.; AUMNOUYPOL, S.; DENDUANGBORIPANT, J.; SUKRONG, S. J. P. O. DNA barcoding of *Aristolochia* plants and development of species-specific multiplex PCR to aid HPTLC in ascertainment of *Aristolochia* herbal materials. 13, n. 8, p. e0202625, 2018.

DOS SANTOS, M. I. G.; DOS SANTOS LIRA, T. P.; DA SILVA, L. E. B.; DOS SANTOS, R. L. V. *et al.* Cortes histológicas dos órgãos vegetativos do girassol (*Helianthus annuus* L.): uma contribuição para o ensino da botânica. 13, n. 1, p. 38-50, 2021.

DOS SANTOS, V. S.; MACEDO, F. A.; DO VALE, J. S.; SILVA, D. B. *et al.* Metabolomics as a tool for understanding the evolution of *Tabebuia* sensu lato. 13, n. 6, p. 1-11, 2017.

ERICKSON, D. L.; SPOUGE, J.; RESCH, A.; WEIGT, L. A. *et al.* DNA barcoding in land plants: developing standards to quantify and maximize success. 57, n. 4, p. 1304-1316, 2008.

ERNST, M.; SILVA, D. B.; SILVA, R. R.; VÊNICIO, R. Z. *et al.* Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. 31, n. 6, p. 784-806, 2014.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. Principles of pollination ecology. 2013.

FAISAL, M.; SHRIDHAR, B.; KUMAR, S. J. T. J. o. P. Macro microscopic fingerprints of panchanga of Ishwari-*Aristolochia indica* Linn. 4, n. 2, p. 61-67, 2015.

- FAZEKAS, A. J.; BURGESS, K. S.; KESANAKURTI, P. R.; GRAHAM, S. W. *et al.* Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. 3, n. 7, p. e2802, 2008.
- FENSTER, C. B.; ARMBRUSTER, W. S.; WILSON, P.; DUDASH, M. R. *et al.* Pollination syndromes and floral specialization. p. 375-403, 2004.
- FERNANDES, J. M.; SILVA, D. F.; LOPES, C. R. A. S.; DE ALMEIDA, A. A. S. D. *et al.* Contribuição à taxonomia do gênero *Aristolochia* (Aristolochiaceae) no Estado de Mato Grosso, com uma nova ocorrência para o Brasil. 10, n. 10, p. e518101018676-e518101018676, 2021.
- FERNANDEZ, E.; FERRERAS, I.; FARRELL, B. D.; DE MEDEIROS, B. A. *et al.* Studies in *Aristolochia* (Aristolochiaceae) of Hispaniola. 420, n. 1, p. 1–20-21–20, 2019.
- FORD, C. S.; AYRES, K. L.; TOOMEY, N.; HAIDER, N. *et al.* Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. 159, n. 1, p. 1-11, 2009.
- FORMAGIO, A. S. N.; VILEGAS, W.; VOLOBUFF, C. R. F.; KASSUYA, C. A. L. *et al.* *Palicourea tomentosa* (Aubl.) Borhidi: Microscopy, chemical composition and the analgesic, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase potential. 291, p. 115050, 2022.
- FRANCISCO, C. S.; MESSIANO, G. B.; LOPES, L. M.; TININIS, A. G. *et al.* Classification of *Aristolochia* species based on GC–MS and chemometric analyses of essential oils. 69, n. 1, p. 168-175, 2008.
- FREITAS, J.; ALVES-ARAÚJO, A. J. R. Flora do Espírito Santo: Aristolochiaceae. 68, p. 1505-1539, 2017.
- FREITAS, J.; GONZÁLEZ, F.; ALVES-ARAÚJO, A. J. S. B. *Aristolochia lorenae*, a new cauliflorous *Aristolochia* (Aristolochiaceae) from the Brazilian Amazonian Forest. 44, n. 1, p. 101-106, 2019.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. J. Q. n. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. 30, p. 374-381, 2007.
- GONZÁLEZ, F.; MONZÓN-SIERRA, J. J. B. An updated synopsis of *Aristolochia* (Aristolochiaceae) in Guatemala. p. 1-26, 2022.
- GONZÁLEZ, F.; PABÓN-MORA, N. J. C. *Aristolochia keratuma* (Aristolochiaceae), nueva especie de la serie Thyrsciae del Chocó (Colombia) y clave de identificación para sus especies. 39, n. 1, p. 50-58, 2017.

GONZÁLEZ, F. A.; STEVENSON, D. W. J. R. d. I. A. C. d. C. E., Físicas y Naturales. A phylogenetic analysis of the subfamily Aristolochioideae (Aristolochiaceae). 26, n. 98, p. 25-59, 2002.

GONZÁLEZ, F. J. A. o. t. M. B. G. Notes on the systematics of *Aristolochia* subsect *Hexandrae*. p. 497-503, 1991.

GONZÁLEZ, F. J. B. Two new species of *Aristolochia* (Aristolochiaceae) from Brazil and Peru. 50, n. 1, p. 5-10, 1998.

GONZÁLEZ, F. J. C. Hacia una filogenia de *Aristolochia* y sus congéneres neotropicales. p. 115-130, 1997.

GONZÁLEZ, F. J. R. d. I. A. C. d. C. E., Físicas y Naturales. Florística y sistemática filogenética innecesariamente disyuntas: El caso de *Aristolochia*, *Euglypha* y *Holostylis* (Aristolochiaceae). 36, n. 139, p. 193-202, 2012.

GONZÁLEZ, F. J. S.; PLANTS, G. o. Inflorescence morphology and the systematics of Aristolochiaceae. p. 159-172, 1999.

GONZÁLEZ GARAVITO, F. A. Aristolochiaceae. 1990.

GROUP, A. P.; CHASE, M. W.; CHRISTENHUSZ, M. J.; FAY, M. F. *et al.* An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.

GUS' KOV, E.; KLETSKII, M.; KORNIENKO, I.; OLEKHNOVICH, L. *et al.*, 2002, Allantoin as a free-radical scavenger. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers. 105-108.

GUS' KOV, E.; SHKURAT, T.; MILYUTINA, N.; PROKOF'EV, V. *et al.*, 2001, Effect of allantoin on the activity of enzymes providing regulation of the ROS-dependent status of an organism. Springer. 239-242.

HARMATHA, J.; DINAN, L. J. P. R. Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant-insect chemical interactions. 2, n. 3, p. 321-330, 2003.

HART, S. P.; SCHREIBER, S. J.; LEVINE, J. M. J. E. I. How variation between individuals affects species coexistence. 19, n. 8, p. 825-838, 2016.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. J. N. r. d. d. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. 14, n. 2, p. 111-129, 2015.

HERMANT, M.; PRINZING, A.; VERNON, P.; CONVEY, P. *et al.* Endemic species have highly integrated phenotypes, environmental distributions and phenotype–environment relationships. 40, n. 8, p. 1583-1594, 2013.

HOEHNE, F. C. Aristolochiaceas. Instituto de Botânica, 1942.

HOEHNE, F. C. J. M. d. I. O. C. Monographia illustrada das aristolochiaceas brasileiras. 20, n. 1, p. 67-175, 1927.

HOELTGEBAUM, M. P. Caracterização da autoecologia de populações de *Varronia curassavica* Jacq.(Boraginaceae) em áreas de restinga de Santa Catarina. 2017.

HOLLINGSWORTH, M. L.; ANDRA CLARK, A.; FORREST, L. L.; RICHARDSON, J. *et al.* Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. 9, n. 2, p. 439-457, 2009.

HORNER, H. T.; SAMAIN, M.-S.; WAGNER, S. T.; WANKE, S. J. B. Towards uncovering evolution of lineage-specific calcium oxalate crystal patterns in Piperales. 93, n. 3, p. 159-169, 2015.

JAIME, G. S.; BARBOZA, G. E.; VATTUONE, M. A. Comparative pharmacobotanic study of argentinean *Aristolochias*. 2006.

JONES, D. A. J. S. P. Polymorphism, plants and natural populations. p. 379-400, 1967.

JOST, M.; SAMAIN, M.-S.; MARQUES, I.; GRAHAM, S. W. *et al.* Discordant phylogenomic placement of Hydnoraceae and Lactoridaceae within Piperales using data from all three genomes. 12, p. 586, 2021.

KELLY, L. J.; AMEKA, G. K.; CHASE, M. W. J. T. DNA barcoding of African Podostemaceae (river-weeds): A test of proposed barcode regions. 59, n. 1, p. 251-260, 2010.

KIM, J. H.; YI, Y.-S.; KIM, M.-Y.; CHO, J. Y. J. J. o. g. r. Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases. 41, n. 4, p. 435-443, 2017.

KLITZKE, C. F.; BROWN JR, K. S. J. C. The occurrence of aristolochic acids in neotropical troidine swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae). 10, n. 2, p. 99-102, 2000.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. DNA barcodes: methods and protocols. *In*: DNA barcodes: Springer, 2012. p. 3-8.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L.; JONES, F. A.; SWENSON, N. G. *et al.* Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. 106, n. 44, p. 18621-18626, 2009.

KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L. J. P. o. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region. 2, n. 6, p. e508, 2007.

KRESS, W. J.; WURDACK, K. J.; ZIMMER, E. A.; WEIGT, L. A. *et al.* Use of DNA barcodes to identify flowering plants. 102, n. 23, p. 8369-8374, 2005.

KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. Flowering Plants· Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families. Springer Science & Business Media, 2013. 3662028999.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C. *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. 35, n. 6, p. 1547, 2018.

KUO, P.-C.; LI, Y.-C.; WU, T.-S. J. J. o. t.; MEDICINE, c. Chemical Constituents and Pharmacology of the *Aristolochia* (馬兜鈴 *mādōu ling*) species. 2, n. 4, p. 249-266, 2012.

KURISAWA, N.; YUKAWA, M.; KOSHINO, H.; ONODERA, T. *et al.* Kolavenic acid analog restores growth in HSET-overproducing fission yeast cells and multipolar mitosis in MDA-MB-231 human cells. 28, n. 1, p. 115154, 2020.

LAHAYE, R.; VAN DER BANK, M.; BOGARIN, D.; WARNER, J. *et al.* DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. 105, n. 8, p. 2923-2928, 2008.

LÁZARO-NOGAL, A.; MATESANZ, S.; GODOY, A.; PÉREZ-TRAUTMAN, F. *et al.* Environmental heterogeneity leads to higher plasticity in dry-edge populations of a semi-arid Chilean shrub: insights into climate change responses. 103, n. 2, p. 338-350, 2015.

LEESE, F.; SANDER, M.; BUCHNER, D.; ELBRECHT, V. *et al.* Improved freshwater macroinvertebrate detection from environmental DNA through minimized nontarget amplification. 3, n. 1, p. 261-276, 2021.

LEITÃO, G. G.; KAPLAN, M. A. C.; GALEFFI, C. J. P. Epi-populifolic acid from *Aristolochia cymbifera*. 31, n. 9, p. 3277-3279, 1992.

LERMA-HERRERA, M. A.; BEIZA-GRANADOS, L.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E. *et al.* In vitro cytotoxic potential of extracts from *Aristolochia foetida* Kunth against MCF-7 and bMECs cell lines. 28, n. 12, p. 7082-7089, 2021.

LOOTS, J., Loots, GP; JOUBERT, W. J. S. A. M. J. The effect of allantoin on cellular multiplication in degenerating and regenerating nerves. 55, n. 2, p. 53-56, 1979.

LOPES, L.; NASCIMENTO, I.; SILVA, T. d.; DA, L. J. R. a. i. p. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. 2, p. 19-108, 2001.

LOPES, L. M.; BOLZANI, V. d. S.; TREVISAN, L. M. J. P. Clerodane diterpenes from *Aristolochia* species. 26, n. 10, p. 2781-2784, 1987.

LOPES, L. M.; BOLZANI, V. d. S. J. P. Lignans and diterpenes of three *Aristolochia* species. 27, n. 7, p. 2265-2268, 1988.

LOPES, L. M.; SILVA, T. d.; VAROTTI, F. d. P.; ROSÁRIO, V. E. d. *et al.* Antiplasmodial Activity of Aryltetralone Lignans from *Holostylis reniformis*. 2007.

LORENÇONE, B. R.; GUARNIER, L. P.; PALOZI, R. A. C.; ROMÃO, P. V. M. *et al.* Atheroprotective Properties of *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. in Female Rats. 11, n. 3, p. 212, 2021.

LORENZO, R.; PERRET, P.; AHUMADA, L. Z. J. C. Sinónimos Nuevos y Tipificaciones en la Familia Aristolochiaceae de la Flora del Paraguay. 65, n. 1, p. 114-116, 2010.

LUBER, J.; TULER, A. C.; LEITE, F. T.; CHRIST, J. A. *et al.* List of angiosperm species in an Atlantic Forest fragment reveals collection gaps in Espírito Santo state, Brazil. 12, n. 1, p. 1835-1835, 2016.

MAGALHÃES, K. d. N. Plantas medicinais da caatinga do nordeste brasileiro: etnofarmacopeia do Professor Francisco José de Abreu Matos. 2019.

MAHFOUD, H.; WANKE, S.; NEINHUIS, N. J. S. I. J. A. E. S. A survey of leaf epicuticular waxes and trichomes in the genus *Aristolochia* (Aristolochiaceae) using scanning electron microscopy (SEM). 5, p. 120-131, 2018.

MARCHESINI, A. M.; PRADO, G. G.; MESSIANO, G. B.; MACHADO, M. B. *et al.* Chemical constituents of *Aristolochia giberti*. 20, p. 1598-1608, 2009.

MARQUES, C. A.; AZEVEDO, A. A. J. R. F. Anatomia foliar comparada de quatro espécies da família Lauraceae. 13, n. 3, p. 142-162, 2019.

MARTINS, R. P.; MASSARA, R. L.; BARROSO, C. X. J. R. H. A ecologia evolutiva da plasticidade fenotípica em táxons de organismos: uma breve revisão. 3, n. 2, fasc. 3, p. 1333-1373, 2020.

MARTUCCI, M. E. P.; DE VOS, R. C.; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L. J. P. O. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: application in the genus *Vernonia* Schreb. 9, n. 4, p. e93149, 2014.

MASSONI, J.; FOREST, F.; SAUQUET, H. J. M. P.; EVOLUTION. Increased sampling of both genes and taxa improves resolution of phylogenetic relationships within Magnoliidae, a large and early-diverging clade of angiosperms. 70, p. 84-93, 2014.

MATHEW, L. S.; MTEWAB, A. G.; AJAYIB, C. O.; DEYNO, S. *et al.* Ethnopharmacology, pharmacology and phytochemistry of *Aristolochia bracteolata* Lam: A Review of an antimalarial plant. 2020.

MATOS, P. M.; MAHONEY, B.; CHAN, Y.; DAY, D. P. *et al.* New non-toxic semi-synthetic derivatives from natural diterpenes displaying anti-tuberculosis activity. 20, n. 10, p. 18264-18278, 2015.

MCGILL, B. J.; ENQUIST, B. J.; WEIHER, E.; WESTOBY, M. J. T. i. e. *et al.* Rebuilding community ecology from functional traits. 21, n. 4, p. 178-185, 2006.

MESSIANO, G. B.; VIEIRA, L.; MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. *et al.* Evaluation of insecticidal activity of diterpenes and lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatalis*. 56, n. 8, p. 2655-2659, 2008.

METUSALA, D.; AL FARISHY, D. D.; JEBB, M. J. P. *Nepenthes putaiguneung* (Nepenthaceae), a new species from highland of Sumatra, Indonesia. 454, n. 4, p. 285–292-285–292, 2020.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. d. S. J. Q. N. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. 24, p. 105-111, 2001.

MURATA, J.; OHI, T.; WU, S.; DARNAEDI, D. *et al.* Molecular phylogeny of *Aristolochia* (Aristolochiaceae) inferred from *matK* sequences. 52, n. 1, p. 75-83, 2001.

NASCIMENTO, D. S. d. Estudo taxonômico da família Aristolochiaceae Juss. do Sul do Brasil. 2008.

NASCIMENTO, I. R.; MURATA, A. T.; BORTOLI, S. A.; LOPES, L. M. J. P. M. S. f. P. S. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatalis* larvae. 60, n. 4, p. 413-416, 2004.

NEINHUIS, C.; WANKE, S.; HILU, K.; MÜLLER, K. *et al.* Phylogeny of Aristolochiaceae based on parsimony, likelihood, and Bayesian analyses of *trnL-trnF* sequences. 250, n. 1, p. 7-26, 2005.

NEWMASTER, S.; FAZEKAS, A.; RAGUPATHY, S. J. B. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. 84, n. 3, p. 335-341, 2006.

NOBRE, P. A. F. O papel da variação intraespecífica de atributos funcionais na estruturação de comunidades ecológicas. 2021.

OELSCHLÄGEL, B.; GORB, S.; WANKE, S.; NEINHUIS, C. J. N. P. Structure and biomechanics of trapping flower trichomes and their role in the pollination biology of *Aristolochia* plants (Aristolochiaceae). 184, n. 4, p. 988-1002, 2009.

OHI-TOMA, T.; SUGAWARA, T.; MURATA, H.; WANKE, S. *et al.* Molecular phylogeny of *Aristolochia* sensu lato (Aristolochiaceae) based on sequences of *rbcL*, *matK*, and *phyA* genes, with special reference to differentiation of chromosome numbers. 31, n. 3, p. 481-492, 2006.

PADHY, G. K. J. C. T. M. A Review of *Aristolochia indica*: Ethnomedicinal Uses, Phytochemistry, Pharmacological and Toxicological Effects. 7, n. 3, p. 372-386, 2021.

PEREIRA, A. O.; AVILA, J. M.; DO CARMO, G.; SIQUEIRA, F. S. *et al.* Chemical composition, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Aristolochia triangularis* Cham. from Brazil. 121, p. 461-467, 2018.

PLANT, C. J. P. N. A. S. U. A. Group W. A DNA barcode for land plants. 106, n. 12794, p. 7, 2009.

PRAKASH, C. J. D. P. S. Evaluation of sapindaceae species for their wound healing potential Chandra Prakash K. 1* and IJ Kuppast2. 2014.

RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. Biologia da polinização. Projecto Cultural Rio de Janeiro, 2014. 8568126014.

SALAZAR, P. C.; NAVARRO-CERRILLO, R. M.; CRUZ, G.; VILLAR, R. J. J. o. A. E. Intraspecific leaf functional trait variability of eight *Prosopis pallida* tree populations along a climatic gradient of the dry forests of northern Peru. 152, p. 12-20, 2018.

SARMA, B.; TANTI, B. J. C. L. S. Analysis of genetic diversity of certain species of *Aristolochia* using *ISSR*-based molecular markers. 3, n. 4, p. 47-53, 2017.

SARTORELLI, P.; CARVALHO, C. S.; REIMAO, J. Q.; LORENZI, H. *et al.* Antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from *Aristolochia cymbifera*. 76, n. 13, p. 1454-1456, 2010.

SHESTOPALOV, A.; SHKURAT, T.; MIKASHINOVICH, Z.; KRYZHANOVSKAYA, I. *et al.* Biological functions of allantoin. 33, n. 5, p. 437-440, 2006.

SIEFERT, A.; VIOLLE, C.; CHALMANDRIER, L.; ALBERT, C. H. *et al.* A global meta-analysis of the relative extent of intraspecific trait variation in plant communities. 18, n. 12, p. 1406-1419, 2015.

SNELL, R. S.; BECKMAN, N. G.; FRICKE, E.; LOISELLE, B. A. *et al.* Consequences of intraspecific variation in seed dispersal for plant demography, communities, evolution and global change. 11, n. 4, p. plz016, 2019.

SUDHAKARAN, M. V. J. P. J. Finger Printing of the Anatomical Markers, HPTLC Profile and Heavy Metals Content in the Leaves of *Aristolochia indica* Linn. 8, n. 2, 2016.

SULTAN, S. E. J. E. Phenotypic plasticity for fitness components in *Polygonum* species of contrasting ecological breadth. 82, n. 2, p. 328-343, 2001.

TABERLET, P.; COISSAC, E.; POMPANON, F.; GIELLY, L. *et al.* Power and limitations of the chloroplast trn L (UAA) intron for plant DNA barcoding. 35, n. 3, p. e14-e14, 2007.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. J. M. b.; EVOLUTION. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.

TRIVEDI, S.; REHMAN, H.; SAGGU, S.; PANNEERSELVAM, C. *et al.* Closing Shots: DNA Barcoding and Molecular Phylogeny. *In: DNA Barcoding and Molecular Phylogeny: Springer, 2020. p. 265-267.*

UMAÑA, M. N.; ZHANG, C.; CAO, M.; LIN, L. *et al.* Commonness, rarity, and intraspecific variation in traits and performance in tropical tree seedlings. 18, n. 12, p. 1329-1337, 2015.

UMAÑA, M. N.; ZHANG, C.; CAO, M.; LIN, L. *et al.* Quantifying the role of intraspecific trait variation for allocation and organ-level traits in tropical seedling communities. 29, n. 2, p. 276-284, 2018.

VAN DER NIET, T.; JOHNSON, S. D. J. T. i. e.; EVOLUTION. Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. 27, n. 6, p. 353-361, 2012.

VELASQUES, J.; CRISPIM, B. d. A.; VASCONCELOS, A. A. d.; BAJAY, M. M. *et al.* Genetic and chemodiversity in native populations of *Schinus terebinthifolia* Raddi along the Brazilian Atlantic forest. 11, n. 1, p. 1-11, 2021.

VIEIRA, L.; PASCOLI, I. D.; DE BORTOLI, S.; LOPES, L. J. A. d. I. B. Efeito de extratos de *Aristolochia lagesiana* (Aristolochiaceae) sobre a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). 76, p. 245-250, 2021.

VIOLLE, C.; ENQUIST, B. J.; MCGILL, B. J.; JIANG, L. *et al.* The return of the variance: intraspecific variability in community ecology. 27, n. 4, p. 244-252, 2012.

VIOLLE, C.; NAVAS, M. L.; VILE, D.; KAZAKOU, E. *et al.* Let the concept of trait be functional! 116, n. 5, p. 882-892, 2007.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.; WEBER, G. E. B. J. E. C. T.-D. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. 2010.

WANG, J.; MA, J.-S.; ZHU, X.-X. J. P. Four new combinations in *Isotrema* (Aristolochiaceae). 437, n. 3, p. 174–176-174–176, 2020.

WEINER, S.; DOVE, P. M. J. R. i. m.; GEOCHEMISTRY. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. 54, n. 1, p. 1-29, 2003.

WOLFENDER, J.-L.; RUDAZ, S.; HAE CHOI, Y.; KYONG KIM, H. J. C. M. C. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. 20, n. 8, p. 1056-1090, 2013.

WRIGHT, I. J.; REICH, P. B.; WESTOBY, M.; ACKERLY, D. D. *et al.* The worldwide leaf economics spectrum. 428, n. 6985, p. 821-827, 2004.

WU, L.; SUN, W.; WANG, B.; ZHAO, H. *et al.* An integrated system for identifying the hidden assassins in traditional medicines containing aristolochic acids. 5, n. 1, p. 1-10, 2015.

YU, Y.-L.; WANG, H.-C.; YU, Z.-X.; SCHINNERL, J. *et al.* Genetic diversity and structure of the endemic and endangered species *Aristolochia delavayi* growing along the Jinsha River. 43, n. 3, p. 225-233, 2021.

ZABOTTI, K.; LEITE, R. F.; DELLA JUSTINA, L. A. J. R. V. Epistemologia de lakatos e as proposições atuais da evolução biológica. 6, p. 1085-1097, 2021.

ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; SOUSA MADUREIRA, L.; MESSIANO, G. B.; LOPES, L. M. *et al.* (-)-Kolavenic acid. 64, n. 6, p. o1114-o1114, 2008.