



ECOLOGIA QUÍMICA E COEVOLUÇÃO NA INTERFACE
TROIDINI (PAPILIONIDAE)/ARISTOLOCHIA (ARISTOLOCHIAEAE)

CLÉCIO FERNANDO KLITZKE ⁶⁸⁹

este exemplar corresponde a Redação Final da tese defendida pelo candidato Clécio Fernando Klitzke e aprovada pela Comissão Julgadora. Campinas, 06 de Fevereiro de 1992.

Keith S. Brown Jr.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Ecologia)

ORIENTADOR: Prof. Dr. KEITH S. BROWN Jr.†

29
06/92 - BC

Campinas, SP

-1992-

K689e
16037/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA E ARQUIVO

*As hipóteses são redes: só quem as lança
colhe alguma coisa.*

NOVALIS

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não existiria sem o esforço de diversas pessoas e instituições a quem sou eternamente grato:

- Ao orientador, professor e amigo Dr. Keith S. Brown Jr. pela orientação, apoio e auxílio em todas as fases deste trabalho. E pelas análises de RMN ^1H
- A Anita J. Marsaioli, Mohamed E. M. Habib, Paulo Sérgio M. C. de Oliveira, e João Vasconcellos Neto pelas sugestões durante o exame prévio
- Ao Paulo E. Rubbo dos Santos pelo auxílio e idéias na parte de química de Aristolochia
- As pessoas que auxiliaram com material (plantas, ovos, larvas, borboletas...): K.S. Brown Jr., Aldo M. de Araújo, George Brown, Ana Beatriz, Caio Graco, André Victor e Ronaldo Francini
- A International Society of Chemical Ecology por conceder um auxílio financeiro para a apresentação deste trabalho em sua VIII Reunião Internacional em Dijon (França), e a K.S. Brown Jr. pelo apoio, estímulo e auxílio sem os quais eu não teria ido
- Ao Zé Trigo pelo estímulo na Ecologia Química
- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ecologia e do Departamento de Zoologia pelos anos de convívio e trocas de idéias
- Ao Celso R. Klitzke pela Figura 19
- A Família Klitzke pelo apoio constante
- A Maria Paulinha pelo convívio, amor e dedicação sem os quais eu não seria eu
- A CAPES e FAPESP pelas bolsas de estudo concedidas

ABREVIATURAS E CÓDIGOS QUÍMICOS

AA(s)	- ácido(s) aristolóquico(s)
AL(s)	- ácido(s) labdanóico(s)
C	- consumo
CCF	- cromatografia em camada fina
CHCl ₃	- clorofórmio
CR	- consumo relativo
CrR	- crescimento relativo
ECI	- eficiência de conversão do alimento ingerido
EtOH	- etanol
FAA.	- fração ácida apolar
FAP	- fração ácida polar
FFA	- fração fenólica apolar
FFP	- fração fenólica polar
FNA	- fração neutra apolar
FNP	- fração neutra polar
HCl	- ácido clorídrico
H ₂ O	- água (destilada)
MeOH	- metanol
NaCO ₃	- carbonato de sódio
NaHCO ₃	- bicarbonato de sódio
PS	- peso seco
RMN ¹ H	- ressonância magnética nuclear de próton
TMS	- tetrametilsilano
UV	- ultravioleta

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	vii
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. O sistema Troidini/ <u>Aristolochia</u>	3
2. Objetivos.....	11
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
1. Espécies vegetais.....	12
2. Espécies de Lepidoptera.....	12
3. Fracionamento e detecção dos compostos de <u>Aristolochia</u> ...	13
4. Fracionamento e detecção dos compostos de Troidini.....	15
5. Criação e bioensaios com Troidini.....	17
6. Bioensaios com Papilionidae não Troidini.....	19
7. Análise estatística.....	19
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
1. Compostos de <u>Aristolochia</u>	20
2. Compostos de Troidini.....	26
3. Criação e bioensaios com Troidini.....	29
4. Bioensaios com <u>Papilio anchisiades</u>	53
IV. CONCLUSÕES.....	55
V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	61
APÊNDICE I	
Pesos das frações das extrações de <u>Aristolochia</u>	68
APÊNDICE II	
Cromatografia em camada fina de frações de <u>Aristolochia</u>	69
APÊNDICE III	
Espectros de RMN ¹ H (60 MHz) de frações de <u>Aristolochia</u>	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principais compostos secundários de <u>Aristolochia</u>	6
Figura 2: AAs de <u>B. polydamas</u> e <u>B. archidamas</u> e estimulantes de oviposição de <u>A. alcinous</u>	8
Figura 3: Procedimento para o fracionamento químico de partes vegetais.....	14
Figura 4: Procedimento para o fracionamento químico dos lepidópteros.....	16
Figura 5: Principais diterpenos encontrados em folhas de <u>A. galeata</u> e <u>A. esperanzae</u>	23
Figura 6: Sobrevivência das larvas de Troidini após 7 dias...	30
Figura 7: Pesos das larvas de Troidini após sete dias.....	33
Figura 8: Sobrevivência larval de <u>B. polydamas</u>	35
Figura 9: Duração larval de <u>B. polydamas</u>	37
Figura 10: Pesos das pupas de <u>B. polydamas</u>	38
Figura 11: Porcentagem de empupamento de <u>B. polydamas</u>	40
Figura 12: Consumo das larvas de Troidini.....	41
Figura 13: Efeito de 5,5mg de ALs no consumo	45
Figura 14: Efeito de 13 mg de ALs no consumo	46
Figura 15: Efeito de 0,7mg de FNP-B no consumo.....	47
Figura 16: Efeito de 0,4mg de AA no consumo.....	48
Figura 17: Efeito de 1,1mg de AA no consumo.....	50
Figura 18: Efeitos das FNP-E e FNP-M no consumo.....	51
Figura 19: Mediações químicas da interface Troidini / <u>Aristolochia</u> . Exemplo com <u>B. polydamas</u> e <u>A.galeata</u> .	56
Figura 20: Hipótese de coevolução sequencial para a interação Troidini/ <u>Aristolochia</u>	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Plantas utilizadas para oviposição pelos Troidini...	4
Tabela 2: Plantas utilizadas pelas larvas de Troidini.....	5
Tabela 3: Concentrações das frações das <u>Aristolochia</u>	21
Tabela 4: Presença de AAs, ALs e alcalóides nas <u>Aristolochia</u> .	24
Tabela 5: Concentração de AAs e alcalóides nos Troidini.....	27
Tabela 6: Quantidade e concentração de AAs nos Troidini.....	28
Tabela 7: Valores de Qui-Quadrado para as sobrevivências das larvas em diferentes plantas hospedeiras.....	31
Tabela 8: Valores de U para os pesos larvais.....	34
Tabela 9: CrR, CR e ECI de larvas de Troidini em diferentes espécies de <u>Aristolochia</u>	43
Tabela 10: Efeito das frações de <u>Aristolochia</u> no CrR, CR e ECI de larvas de Troidini.....	52
Tabela 11: Efeito das frações de <u>Aristolochia</u> no C, CrR, CR e ECI de larvas <u>Papilio anchisiades</u>	54

RESUMO

Desde a formulação da hipótese de coevolução entre plantas e borboletas por Ehrlich e Raven em 1964, poucos trabalhos têm demonstrado a sua existência no sentido estrito, evidenciando-se geralmente o fenômeno de colonização. O objetivo deste trabalho é estudar as interações entre um grupo restrito de borboletas (Troidini) e suas únicas plantas de alimento larval (Aristolochia) com respeito a mediação química na utilização das plantas hospedeiras pelas larvas. Para isto foram criadas larvas de diferentes espécies de Troidini em diferentes espécies de Aristolochia encontradas na região sudeste brasileira. Com estes dados e informações da literatura foi possível estabelecer a utilização e preferência por cada espécie vegetal por cada espécie de Troidini. A análise química de 11 espécies de Aristolochia mostrou a existência de três classes de compostos secundários mais abundantes: ácidos aristolóquicos (nitrofenantrenos), ácidos labdanóicos (diterpenos) e alcalóides (não identificados neste trabalho). A presença e ausência destes compostos permitiu a reunião destas espécies em três grupos que são utilizados diferentemente pelos Troidini. A análise química de 17 espécies de Troidini mostrou a presença de ácidos aristolóquicos e alcalóides. Surpreendentemente larvas de B. polydamas criadas em A. galeata, uma espécie sem ácidos aristolóquicos nas folhas, apresentaram estes compostos indicando a possibilidade de sua biossíntese pelas larvas. Esta espécie só empupou em A. galeata com o acréscimo de ácidos aristolóquicos. Isto indica a necessidade destes compostos para o total desenvolvimento das larvas nesta planta. Na natureza é possível observar larvas comendo outras partes da planta que contém estes compostos tais como ramos, flores e frutos. Os ácidos labdanóicos apresentaram efeito fago-inibidor nas espécies testadas sendo que P. neophilus e B. polydamas são menos sensíveis a estes compostos. Estas duas espécies também apresentaram aumento de consumo na presença de AAs, o que indica um efeito fagoestimulante destes compostos. Algumas frações neutras polares também apresentaram atividade fago-inibidora. Estes resultados permitem a reformulação da hipótese de coevolução entre estes dois grupos proposta por Brown et al. (1991a).

SUMMARY

Since Ehrlich and Raven's paper on butterfly plant coevolution (1964), few works have shown the existence of this phenomenon; generally, colonization seems responsible for present patterns of insect/plant relationships. The object of this work is the study of chemical ecology of the Troidini/Aristolochia interface: a restricted group of herbivores specialized on a single small plant family. Larvae of many species of Troidini reared on different SE Brazilian Aristolochia species showed a variable specificity and preference in these relationships. Chemical analysis of 11 Aristolochia species indicated three principal classes of secondary compounds: aristolochic acids (nitrophenanthrenes), labdanoic acids (diterpenes) and alkaloids. The presence or absence of these compounds permitted the division of the Aristolochia species into three groups, differentially used by Troidini species. Chemical analysis of 17 Troidini species showed the presence of aristolochic acids and alkaloids. Aristolochic acids were present in B. polydamas larvae reared on leaves of A. galeata (without these compounds) indicating the possible biosynthesis of these compounds. Larvae of B. polydamas reared on leaves of A. galeata pupated successfully only when aristolochic acids were added in the diet, indicating that they are necessary to complete development; in nature, they feed on stems, flowers or fruits which contain these compounds. Labdanoic acids have antifeedant effect on the larvae of many Troidini species; P. neophilus and B. polydamas (polyphagous species) are more tolerant of these compounds, and show stimulation of feeding by aristolochic acids. Some polar neutral fractions (glycosides?) also showed antifeedant activity. The results of the present study lead to a revision of the coevolutionary hypothesis at this interface, proposed by Brown et al. (1991a).

I. INTRODUÇÃO

A maioria das espécies de Lepidoptera é fitófaga, se alimentando de angiospermas e outras plantas, principalmente das folhas. As interações parasita/hospedeiro podem ser tão específicas que existem casos de espécies de lepidópteros se alimentando exclusivamente de uma única espécie ou grupo de vegetais.

Esta especificidade levou Ehrlich e Raven (1964), utilizando os registros dos principais grupos de plantas de alimento larval dos Papilionoidea, a propor a hipótese de coevolução entre as borboletas e suas plantas hospedeiras para explicar a evolução destas comunidades altamente diversificadas.

Um fator principal da evolução recíproca entre as borboletas e suas plantas hospedeiras seria a diversificação dos compostos secundários vegetais seguida da evolução da habilidade de tolerância destes compostos pelos fitófagos (Ehrlich e Raven, 1964). As pressões seletivas da herbivoria sobre os vegetais levariam a uma diversificação de compostos químicos secundários, o que provocaria uma resposta evolutiva dos fitófagos. Havendo mudanças evolutivas em indivíduos de uma população em resposta a mudanças evolutivas de indivíduos de uma segunda população, seguida por respostas evolutivas da segunda população às mudanças da primeira, teríamos o fenômeno de coevolução (sensu stricto de Janzen, 1980).

Poucos trabalhos têm demonstrado a existência desta coevolução com diversificação nos dois lados da interface (por cladogênese paralela), havendo geralmente o que se chama de

"coevolução difusa" (Futuyma, 1983).

Benson et al. (1975) concluíram que a diversificação dos Heliconiini e Passifloraceae é devida a coevolução entre estes dois grupos. Mitter e Brooks (1983) reanalisando estes dados concluíram que a evolução dos Heliconiini ocorreu após a diversificação das Passifloraceae, não sendo portanto devido ao fenômeno de coevolução. Há entretanto uma certa congruência em alguns níveis taxonômicos, e foram estudados casos de coevolução a nível de populações de Heliconius e suas plantas de alimento (veja Spencer, 1988).

Estudos nas interações entre Ithomiinae e Solanaceae também mostraram a não existência de diversificação filogenética paralela nestes grupos, pelo menos em nível de gênero (Brown, 1987; Brown et al., 1991a).

Miller (1987) trabalhando com os Papilionidae e famílias de plantas de alimento larval (considerado por Ehrlich e Raven como um exemplo de coevolução), mostrou que não há uma congruência filogenética nestes grupos. A diversificação das dicotiledôneas teria sido anterior a evolução dos Papilionidae, havendo colonização de outros grupos de plantas hospedeiras. Dentro de algumas tribos de Papilionidae há uma maior especificidade por grupos de plantas hospedeiras que pode ser explicada pelos compostos secundários a sua taxonomia (Brown et al., 1991b).

Neste contexto, o estudo da ecologia química da tribo Troidini (Papilionidae), restrita a plantas hospedeiras da família Aristolochiaceae, torna-se interessante sob o aspecto coevolutivo (Brown et al., 1991a).

1. O sistema Troidini/Aristolochia

Os Troidini neotropicais (gêneros Euryades, Parides e Battus) utilizam exclusivamente plantas do gênero Aristolochia, às vezes aceitando apenas uma espécie como alimento larval (Brown et al., 1981; Otero e Brown, 1986) (veja Tabelas 1 e 2).

As plantas das espécies de Aristolochia são volúveis ou herbáceas, geralmente rizomatosas ou tuberosas. As folhas são alternas, simples, com presença de pseudoestípulas em algumas espécies. As flores são axilares, solitárias ou agrupadas em inflorescências. O fruto é uma cápsula septicida, geralmente hexagonal (Hoehne, 1942, 1947). O gênero Aristolochia é Pantropical apresentando mais de quinhentas espécies conhecidas (veja von Euv et al., 1968). As regiões mais ricas em espécies endêmicas são o Brasil e a ilha de Hispaniola (República Dominicana e Haiti) (Pfeifer, 1966).

Poucos são os organismos que conseguem se alimentar destas plantas, pois as Aristolochia apresentam compostos secundários que presumivelmente as protegem contra a ação de fitófagos (Brown et al., 1981), tais como ácidos aristolóquicos e aristolactamas (derivados nitrofenantrenos de gosto amargo)(Munavalli e Viel, 1969a, b, c; Mix et al., 1982), alcalóides (El-Sebakhy e Waterman, 1984; Chen e Zhu, 1987; Cortes et al., 1987) e terpenos (Munavalli e Viel, 1969a; Rucker et al., 1981; Lopes et al., 1987; Lopes e Bolzani, 1988; Mayer et al., 1989)(Figura 1).

Por outro lado, os mesmos compostos secundários podem servir para os Troidini como estimulantes de oviposição (Chew e

Tabela 1: Plantas utilizadas para oviposição pelos Troidini^{1,2} na natureza e em experimentos de laboratório

	Aristolochia																	
	<u>melastoma</u>		<u>arcuata</u>		<u>triangularis</u>		<u>macroura</u>		<u>esperanzae</u>		<u>cymbifera</u>		<u>galeata</u>		<u>eleoans</u>		<u>gigantea</u>	
	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L
<u>Parides proneus</u>	x	x	o	x	?	x	-	?	x	?	-	?	?	o	x	x	?	o
<u>P. bunichus</u>	x	x	x	x	x	x	-	?	x	?	-	?	o	x	x	x	?	x
<u>P. ascanius</u>	-	o	-	x	-	o	x	x	-	?	?	x	-	?	?	?	?	?
<u>P. agavus</u>	x	x	x	x	x	x	?	?	x	?	?	?	?	o	x	x	?	x
<u>P. anchises nephalion</u>	x	x	x	x	?	x	x	?	x	?	x	?	x	x	x	x	?	x
<u>P. neophilus eurybates</u>	x	x	x	x	?	?	-	o	x	x	-	?	?	?	x	?	?	?
<u>Battus polydamas</u>	x	x	x	x	x	x	x	?	x	x	x	?	x	x	x	x	x	x

1) Segundo Brown *et al.* (1981), Otero & Brown (1986), Moraes & Brown (1992) e dados não publicados.

2) N= natureza, L= laboratório. Planta x= utilizada, o= não utilizada, ?= desconhecida ou não testada em laboratório, -= não simpátrica na natureza.

Tabela 2: Comparação da utilização de plantas hospedeiras por larvas de Troidini^{a,b} na natureza e no laboratório

	<u>Aristolochia</u>																	
	<u>melastoma</u>		<u>arcuata</u>		<u>triangularis</u>		<u>macroura</u>		<u>esperanzae</u>		<u>cymbifera</u>		<u>galeata</u>		<u>eleoans</u>		<u>gigantea</u>	
	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L	N	L
<u>Parides proneus</u>	2	x	0	x	?	x	-	?	1	?	-	?	0	o	1	?	?	o
<u>P. bunicus</u>	2	x	2	x	2	x	-	?	1	?	-	?	0	(x)	1	x	?	o
<u>P. ascanius</u>	-	(x)	-	(x)	-	r	2	x	-	r	?	r	-	r	?	r	?	r
<u>P. agavus</u>	2	x	2	x	2	x	?	?	2	?	?	?	?	?	2	x	?	x
<u>P. anchises nephalion</u>	2	x	2	x	2	x	2	x	2	?	2	?	2	x	2	(x)	?	o
<u>P. neophilus eurybates</u>	2	x	2	x	?	?	-	?	1	?	-	?	?	?	2	?	?	?
<u>Battus polydamas</u>	2	x	2	x	2	x	1	x	2	?	2	?	2*	(x)	2	x	2*	x

a) Segundo Brown *et al.* (1981), Otero & Brown (1986), Morais & Brown (1992) e dados não publicados.

b) N= natureza, L= laboratório. 0= não utilizada, 1= pouco utilizada, 2= muito utilizada, x= bom desenvolvimento, (x)= desenvolvimento lento e aumento da mortalidade, o= desenvolvimento muito ruim e alta mortalidade, r= rejeitada, ?= desconhecido ou não testado em laboratório, -= não simpátrica na natureza, * principalmente nas flores.

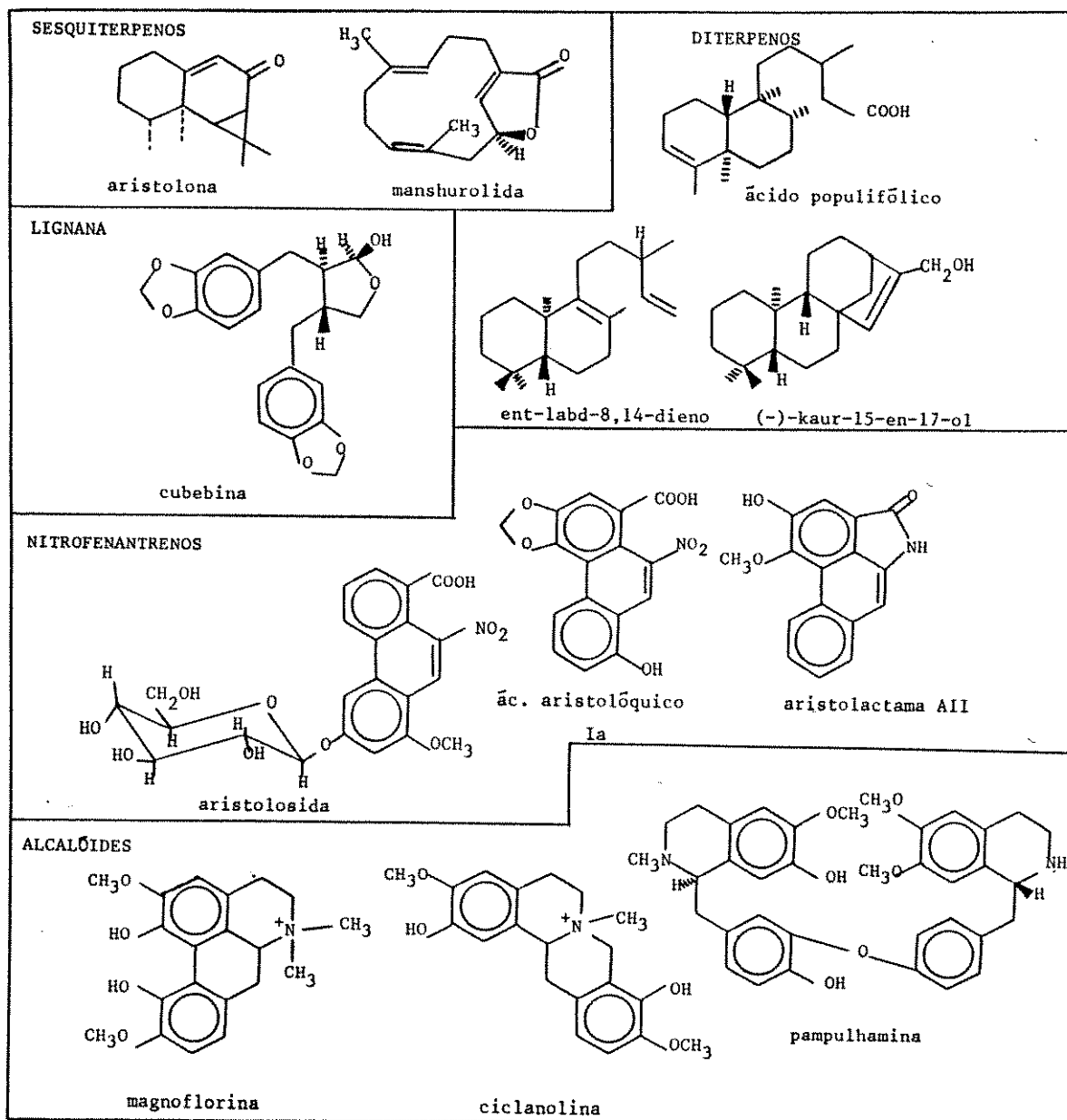
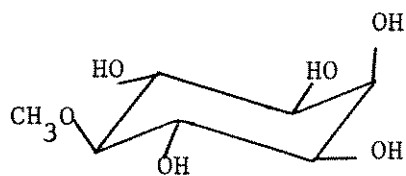
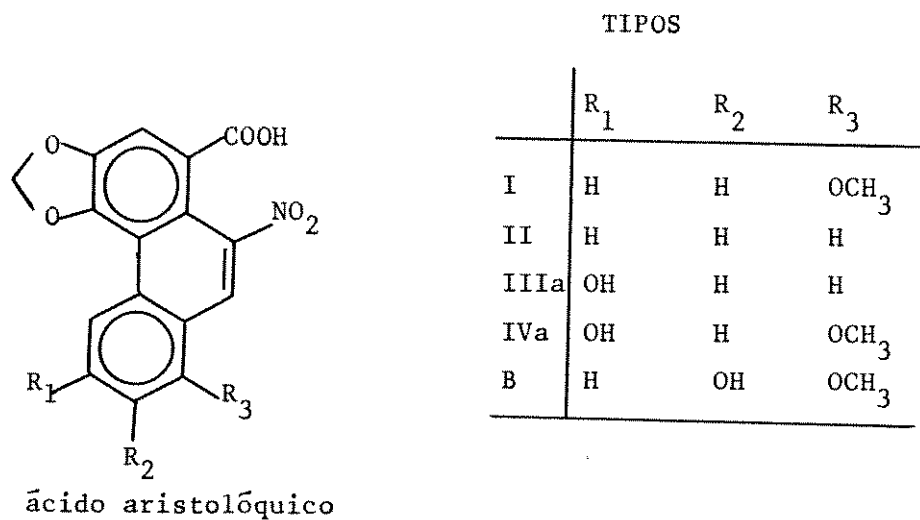


FIGURA 1: Principais compostos secundários de *Aristolochia* (Chen e Zhu, 1987; Mix et al., 1982; Munavalli e Viel, 1969; Lopes et al., 1987).

Robbins, 1984; Nishida e Fukami, 1989b; Feeny, 1991). fagoestimulantes larvais (Nishida e Fukami, 1989a; Miller e Feeny, 1989), ou quando armazenadas, proteção da larva e do adulto contra predadores e parasitas (Rothschild et al., 1970; Brown et al., 1981; Brower, 1984; Urzúa e Priestap, 1985; Nishida e Fukami, 1989a).

Poucos são os predadores de Troidini conhecidos, sendo recusados em experimentos de predação por pássaros (Brower e Brower, 1964; Chai, 1986). Geralmente os predadores de larvas são artrópodos como formigas e pequenas aranhas (Morais e Brown, 1992). Odendaal et al. (1987) observaram lagartos se alimentando de adultos de Battus philenor. Mas observações de predação no campo são raras, possivelmente pela impalatabilidade destes organismos.

Rothschild et al. (1970) e Rothschild (1973) detectaram ácidos aristolóquicos (AAs) em Troidini asiáticos e também substâncias com atividade semelhante a acetilcolina em Troides aeacus criada em Aristolochia elegans, além de traços de ácidos aristolóquicos nos adultos de B. polydamas (Neotropical), cujas larvas também se alimentaram de A. elegans. Isto também foi mostrado por Urzúa e Priestap (1985), enquanto que adultos de B. polydamas coletados na natureza apresentaram bastante AAs do tipo I, II, IIIa e IVa, bem como adultos de B. archidamas cujas larvas consumiram A. chilensis (Urzúa et al., 1983) (Figura 2). Urzúa et al. (1987) também mostraram que as larvas de B. archidamas sequestram seletivamente alguns tipos de AAs das folhas de sua planta de alimento. Nishida e Fukami (1989a, b) isolaram uma série de compostos das folhas de A. debilis sendo a



sequoyitol

FIGURA 2: AAs encontrados em B. polydamas e B. archidamas (tipos I, II, IIIa, IVa), segundo Urzúa et al. (1983, 1987) e estimulantes de oviposição de A. alcinous (AAs tipo I, II, IIIa, B e sequoyitol), segundo Nishida e Fukami (1989b).

mistura de AA (I, II, IIIa, B) e sequoyitol (Figura 2) responsável pela estimulação de oviposição do Troidini Atrophaneura alcinous. Os AAs também apresentaram atividade de fagoestimulação larval. Miller e Feeny (1989) mostraram que os AAs aumentam o crescimento e sobrevivência de larvas de B. polydamas. Nishida e Fukami (1989a) isolaram AAs dos ovos e em todos os estágios de vida e no fluido osmeterial das larvas. Outros relatos de incorporação de AAs por larvas, e sua passagem para os adultos de Troidini, carecem de comprovação.

Apesar da química das Aristolochia ser bem conhecida, às espécies de Aristolochia nativas da região sudeste-sul brasileira carecem de estudos, principalmente dos compostos presentes nas folhas. Cortes et al. (1987) isolaram três alcalóides bisbenzilisoquinolínicos das folhas de A. gigantea: pampulhamina (Figura 1), geraldoamina e pedroamina. Das folhas de A. elegans El-Sebakhy e Waterman (1984) isolaram o alcalóide metilcuspidalina, não encontrando nenhum outro composto nitrogenado. Urzúa e Priestap (1985) detectaram somente traços de AA-I. De A. elegans foi isolado ainda a lignana cubebina (Figura 1) e o diterpeno ent-kaurano-16 α ,17-diol (Habib e El-Sebakhy, 1981). Da raiz e ramos de A. triangularis Rucker et al. (1981) isolaram diversos diterpenos derivados do kaurano, triterpenos derivados do stigmastano, sesquiterpenos, cubebina e outros derivados desta lignana, não sendo detectados AAs. Lopes et al. (1987) isolaram 12 derivados do diterpeno clerodano de raízes de A. galeata e ramos de A. esperanzae. Trabalhando com folhas de A. cymbifera, A. esperanzae e A. galeata Lopes e Bolzani (1988) isolaram diversos derivados do labdano (Figura 1

e 5). Da raiz de A. galeata foram isoladas diversas lignanas: cubebina, asarinina e fargesina.

Brown et al. (1991a) propuseram uma hipótese de coevolução entre Troidini/Aristolochia neotropicais, considerando que na evolução das Aristolochia surgiram acréscimos e mudanças nas classes de compostos de defesa contra fitófagos. Os Troidini primitivos sequestrariam terpenos como defesa contra predadores, uma vez que suas plantas de alimento são apresentariam AAs. Espécies mais derivadas acumulariam os AAs das suas plantas hospedeiras. E espécies ainda mais derivadas tolerariam os óleos essenciais e compostos fenólicos das Aristolochia mais derivadas

O estudo químico da interação Troidini/Aristolochia torna-se interessante sob o aspecto da evolução dos compostos químicos de defesa em Aristolochia e a utilização destes compostos pelas borboletas, bem como exemplo de processos de coadaptação e coevolução entre fitófagos e plantas, que pode ser importante na caracterização filogenética e química nos dois lados da interface (Futuyma e Slatkin, 1983; Brown et al. 1991a; Feeny, 1991).

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivos principais:

- 1) Estudar a química de diferentes espécies de Aristolochia e de Troidini, visando detectar as principais classes de compostos secundários existentes nos fitófagos e em suas plantas hospedeiras.
- 2) Comparar o desenvolvimento destes fitófagos em diferentes espécies de plantas hospedeiras e testar o efeito dos compostos secundários vegetais sobre estes insetos.
- 3) Fornecer dados para testar a hipótese de coevolução sequencial entre estes dois grupos, sugerida por Brown et al. (1991a).
- 4) Propor novos testes e novas hipóteses de coevolução nesta interface, testáveis com as metodologias desenvolvidas neste e em outros trabalhos.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Espécies vegetais

Diferentes espécies de Aristolochia foram coletadas nas regiões sudeste e sul do Brasil para análise química. Para as criações e bioensaios com Troidini foram utilizadas plantas derivadas de populações naturais da região de Campinas, SP (A. melastoma Manso, A. arcuata Masters, A. elegans Masters, A. esperanzae O. Kuntze, A. galeata Mart. & Zucc., A. gigantea Mart. & Zucc.); da região de Extrema, MG e Jundiá, SP (A. triangularis Cham.) e uma espécie proveniente de Registro, SP, transplantada para Campinas (A. macroura Gomez).

2. Espécies de Lepidoptera

Indivíduos de quinze espécies representantes dos três gêneros Neotropicais de Troidini (Euryades, Parides e Battus) provenientes de diferentes regiões da América Central, Caribe e América do Sul, bem como Atrophaneura alcinous (Klug, 1836) (proveniente do Japão) e Troides rhadamantus (Lucas, 1835) (proveniente das Filipinas) foram utilizados nas análises químicas. Os exemplares das espécies encontradas em outros países foram obtidos mortos e secos.

Para as criações e bioensaios foram utilizados indivíduos de populações de Campinas (Amarais, Monjolinho, Reserva Santa Genebra) das espécies P. proneus (Hubner, 1825), P. bunichus bunichus (Hubner, 1822), P. neophilus eurybates (Gray, 1853) e B. polydamas (Linnaeus, 1758); de São Carlos, SP (Campus da UFSCar) a espécie P. proneus; da Serra de Extrema e Serra do

Japi (Jundiaí) a espécie B. polystichus (Butler, 1874), e de Furnas, MG a espécie P. b. diodorus (Hopffer, 1866).

3. Fracionamento e detecção dos compostos de Aristolochia

No fracionamento químico (desenvolvido neste trabalho) partes vegetais frescas (160 g) das diversas espécies de Aristolochia foram maceradas rapidamente em H₂O-MeOH-CHCl₃-hexano (300:700:500:500 ml) + 20 ml de HCl concentrado, originando uma fase inferior orgânica (separada em frações neutra, ácida e fenólica) e uma fase superior aquosa (figura 3). A fase aquosa foi extraída com CHCl₃. Este extrato CHCl₃-MeOH também foi separado em frações neutra, ácida e fenólica. A fase aquosa restante foi evaporada em rotavapor de baixa pressão a 50°C até todo o MeOH ser removido, e resfriada até temperatura ambiente. A precipitação de alcalóides foi obtida com 10-50ml de reagente de Mayers (Cromwell, 1955), deixando 24 hs a 5°C para maior precipitação. O precipitado foi então filtrado, secado e pesado. Todas as frações foram evaporadas em rotavapor de baixa pressão a 50°C e pesadas.

As diversas frações foram analisadas em cromatografia em camada fina (CCF) de sílica gel Woelm (placas de 3X7 cm) ou de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck (espessura 0,2mm) (placas de 6X10 cm), utilizando-se como fase móvel CHCl₃-MeOH em diferentes proporções (95:5, 90:10, 80:20, 70:30); na mesma placa foi aplicado um padrão de ácido aristolóquico (AA) (Aldrich Chem. Co.). As placas foram analisadas em luz visível, em ultravioleta (UV), em câmara de iodo e borrifadas com sulfato cérico 2% em ácido sulfúrico 1 Molar (segundo Brown e Djerassi, 1964) seguido

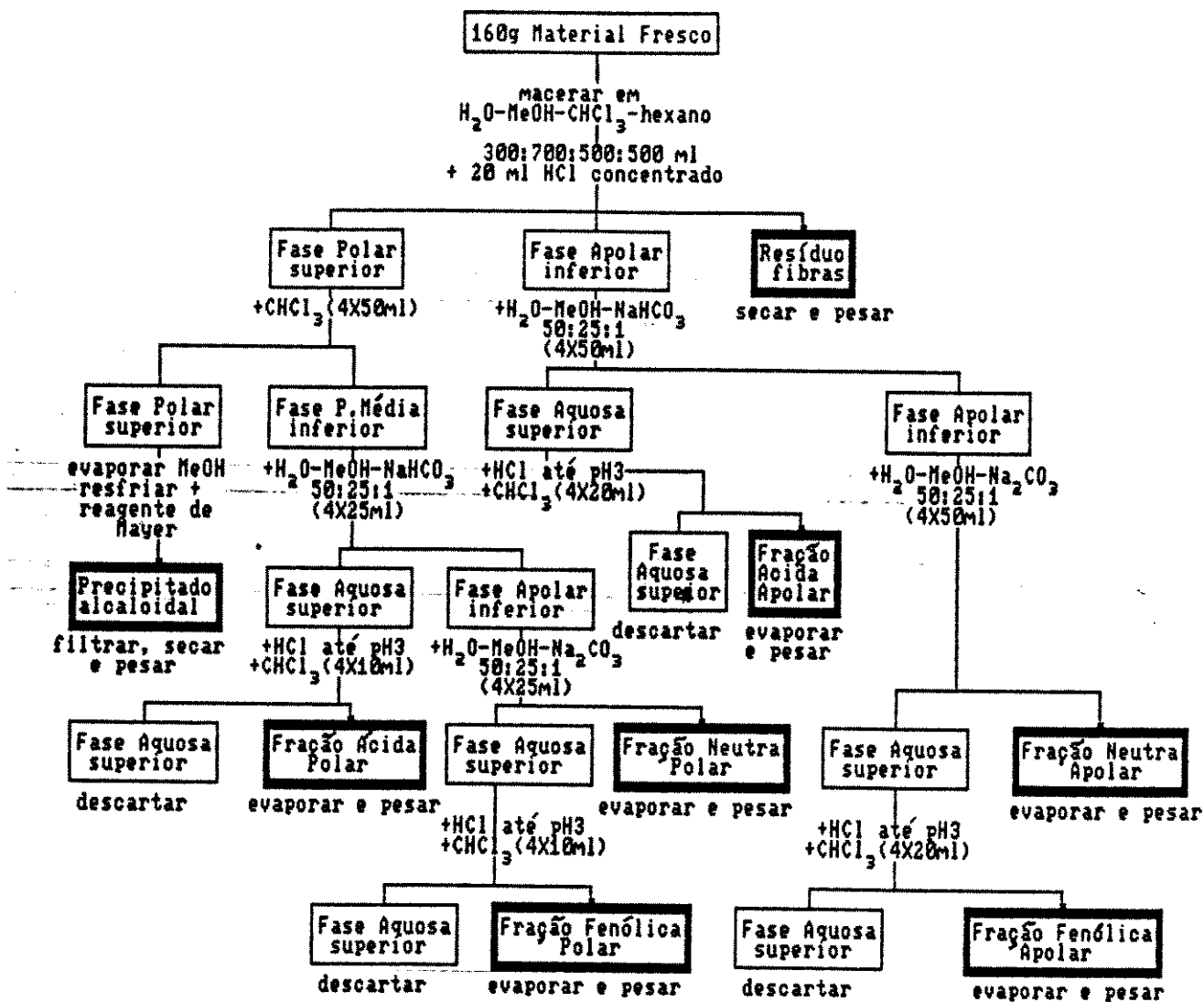


Figura 3: Procedimento para o fracionamento químico de partes vegetais.

de aquecimento. Os AAs apresentam cor amarela na luz visível e fluorescência marrom no UV.

Algumas frações foram analisadas em espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN ^1H) 60MHz, em Varian T-60, utilizando-se como solventes CDCl_3 + 1% TMS. Os deslocamentos químicos foram comparados com padrões da literatura, para as respectivas classes de substâncias.

4. Fracionamento e detecção dos compostos de Troidini

Os indivíduos das diversas espécies de Troidini utilizados na análise química foram coletados no campo e rapidamente trazidos para laboratório e congelados a -10°C para posterior análise. Alguns exemplares (de localidades mais distantes) foram obtidos já secos. Cada indivíduo foi macerado em $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (4:2,8:1,2ml) + 0,016ml de HCl concentrado (ver figura 4). A fase orgânica foi extraída com NaHCO_3 e os ácidos recuperados com HCl 2% e CHCl_3 . Esta fração ácida total foi evaporada e dissolvida em 5ml de EtOH absoluto para análise colorimétrica em espectrofotômetro Micronal B280 em 390nm. Determinou-se a concentração de AA total mediante uma curva padrão onde a absorbância de 0,020 corresponde a 5 μg de AA. Após a determinação da concentração de AA cada amostra foi evaporada e dissolvida em CHCl_3 sendo analisada em CCF conforme procedimento adotado na análise das Aristolochia, para confirmação da presença de AAs.

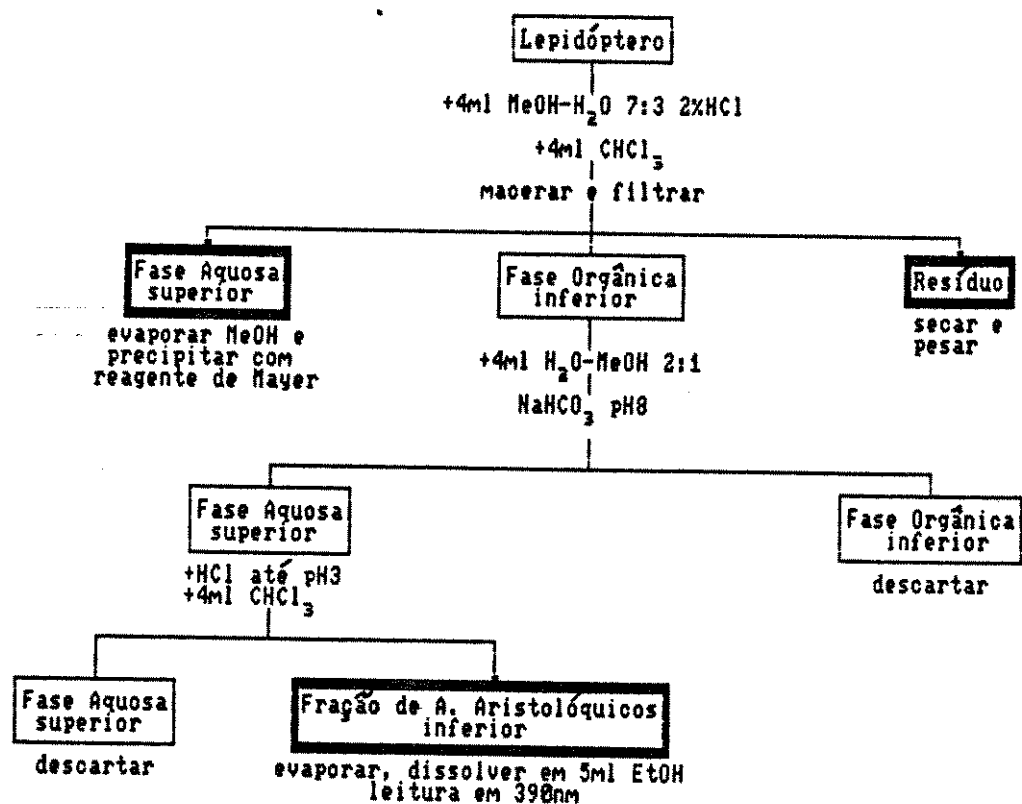


Figura 4: Procedimento para o fracionamento químico dos lepidópteros.

5. Criação e bioensaios com Troidini

Lotes de ovos das espécies de Troidini foram obtidos no campo (B. polydamas) ou provenientes de fêmeas capturadas na natureza (P. proneus, P. bunichus, P. neophilus eurybates, B. polystichtus) e estimuladas a ovipositar dentro de sacos plásticos com suas plantas hospedeiras (mediante proximidade de uma lâmpada de 150W) em laboratório. As oviposições de cada espécie foram divididas em lotes de 4 a 10 ovos para criação em diferentes espécies de Aristolochia. As larvas foram criadas em laboratório, individualmente em Parides e em grupo em Battus, em potes plásticos de 80ml com tampa (para evitar a dessecação das folhas) sem controle da temperatura e fotoperíodo. Após uma semana de vida as larvas de Battus foram transferidas para potes de dois litros. Para evitar efeitos provocados pelas diferenças de temperatura e fotoperíodo os lotes em diferentes espécies de plantas hospedeiras foram criados simultaneamente. As larvas foram acompanhadas diariamente para determinar a mortalidade e duração de cada estágio. O alimento foi trocado diariamente, bem como efetuada a limpeza dos potes. As larvas foram pesadas no sétimo dia após a eclosão dos ovos e as pupas no segundo dia após o empupamento.

Com estes dados é possível comparar a sobrevivência e duração (em dias) de cada estágio, a sobrevivência e duração (em dias) de ovo até pupa e o desenvolvimento relativo (peso no sétimo dia de vida e peso pupal).

Para verificar os possíveis efeitos dos compostos de Aristolochia na aceitação e consumo alimentar, foram realizados bioensaios utilizando lotes de larvas de 3º, 4º e 5º estádios.

Realizou-se somente experimentos de curta duração (6-24hs.). Antes de cada experimento 10 folhas de cada espécie de Aristolochia foram pesadas, secadas por uma hora a 110°C em estufa e re-pesadas para a determinação do conteúdo de água. Em alguns experimentos foram secas e pesadas as metades das próprias folhas cujas outras metades foram oferecidas às larvas. As folhas utilizadas nos experimentos foram pesadas antes do início de cada experimento (peso fresco inicial). As frações e compostos utilizados foram dissolvidos em etanol absoluto e mantidas em solução estoque a 5°C. Cada larva recebia uma folha de Aristolochia com a fração ou o composto a ser testado pincelada na face adaxial na mesma concentração encontrada em cada espécie vegetal. As larvas do grupo controle recebiam somente folhas pinceladas com etanol. As larvas foram pesadas no início e no fim de cada experimento.

Após o fim do experimento o que restou da folha oferecida foi secada em estufa para determinar o peso seco (peso seco final). Determinou-se o peso seco inicial da folha a partir do peso fresco inicial e o conteúdo inicial de água. Com estes dados foi possível calcular alguns índices de consumo e crescimento (segundo Waldbauer, 1968; veja também Rausher, 1981; Scriber, 1986; Miller e Feeny, 1989):

Consumo (C) = peso seco ingerido

Consumo Relativo (CR) = peso ingerido X peso larval⁻¹

Crescimento Relativo (CrR) = peso ganho X peso larval⁻¹ X 100

Eficiência de Conversão do Alimento Ingerido (ECI) = CrR X CR⁻¹

= peso ganho X peso ingerido⁻¹ X 100

Para os cálculos do CR, CrR e ECI foram utilizados os pesos frescos das larvas (pesos iniciais) e do material ingerido. O peso fresco do material ingerido foi estimado através do peso seco final convertido para peso fresco final.

6. Bioensaios com Papilionidae não Troidini

Para verificar os possíveis efeitos dos compostos de Aristolochia em outro papilionídeo, adaptado a outros compostos, foram utilizadas larvas de 4^o e 5^o estádios de Papilio anchisiades (Esper, 1788) (Papilionini) criadas em Esenbeckia leiocarpa (Rutaceae). Os experimentos seguiram a mesma metodologia dos bioensaios com Troidini.

7. Análise estatística

Para determinar se as diferenças de sobrevivência são significativas foi utilizado o Teste de Qui-quadrado (χ^2) segundo Conover (1980).

Para determinar se as diferenças nos pesos, duração do período larval e dos índices de consumo e crescimento são significativas foi utilizado o Teste de "U" de Mann-Whitney segundo Zar (1984).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Compostos de Aristolochia

A Tabela 3 mostra as concentrações das diversas frações das extrações de diferentes espécies de Aristolochia (ver também Apêndice I). Entre as frações mais abundantes há as apolares (3-11% do peso seco) das folhas de A. esperanzae, A. cymbifera e A. galeata. Todas as frações polares são menores que 1% do peso seco das plantas. Existe uma grande variação nas concentrações das frações dentro da mesma espécie. As folhas de A. galeata coletadas na Serra do Japi apresentaram a fração ácida apolar (FAA) de 0,66 a 1,89% do PS (peso seco) e a fração de fenóis apolares (FFA) de 2,56 a 11,08% do PS. Já as folhas coletadas em Campinas apresentaram 1,60% do PS de FAA e 3,61% do PS de FFA, e a amostra de Itirapuã apresentou 0,32% do PS de FAA e 4,34% do PS de FFA (Tabela 3).

As diversas espécies analisadas também variaram muito na quantidade de alcalóides, sendo que A. triangularis foi a espécie com maior concentração (788mg de precipitado para 160g de folhas frescas) (Apêndice I).

A cromatografia de camada fina (CCF) indicou a presença de várias manchas de ácidos aristolóquicos (AAs) nas frações apolares (FAA e FFA) e na fração ácida polar (FAP) em diversas espécies de Aristolochia (Apêndice II). Após borrifar as placas de CCF com sulfato cérico e aquecer visualizou-se uma a duas manchas muito nítidas nas frações FAA e FFA de A. esperanzae, A. cymbifera e A. galeata. A análise destas frações em RMN ^1H revelou a existência de uma mistura de diterpenos derivados do

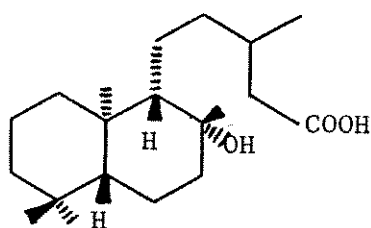
Tabela 3: Concentrações das diversas frações em miligrama de fração por grama de peso fresco de material (mg/g) e em relação ao peso seco (% PS)

Espécie	Coleta ¹	Parte do vegetal	Ácida apolar		Fenol apolar		Neutra polar		Ácida polar		Fenol polar		
			mg/g	%PS	mg/g	%PS	mg/g	%PS	mg/g	%PS	mg/g	%PS	
<i>A. sessilifolia</i>	02X90	VM	folhas	0,57	0,26	0,10	0,04	0,67	0,30	0,50	0,23	0,23	0,10
<i>A. melastoma</i>	20VI90	CA	folhas	0,18	0,08	0,08	0,04	0,34	0,16	0,39	0,18	0,09	0,04
<i>A. rumicifolia</i>	01X90	BU	folhas	0,15	0,07	0,08	0,04	1,74	0,79	0,24	0,11	0,22	0,10
<i>A. odora</i>	03X90	BS	folhas	0,14	0,06	0,10	0,04	0,66	0,30	0,06	0,03	0,11	0,05
<i>A. arcuata</i>	05VI90	CA	folhas	0,11	0,04	0,13	0,05	0,27	0,10	0,25	0,10	0,04	0,02
<i>A. macroura</i>	18IV90	CA	folhas	0,29	0,11	0,11	0,04	0,37	0,13	0,42	0,15	0,04	0,02
	03I91	CA	folhas	0,24	0,09	0,08	0,03	0,81	0,29	0,45	0,13	0,08	0,03
<i>A. triangularis</i>	08V90	SJ	folhas	0,12	0,05	0,07	0,03	0,24	0,09	0,18	0,07	0,06	0,02
	24VII191	IA	folhas	0,30	0,12	0,59	0,23	0,43	0,17	0,39	0,15	0,20	0,08
<i>A. elegans</i>	04X90	RD	folhas	0,15	0,06	0,05	0,02	1,09	0,42	0,10	0,04	0,07	0,03
<i>A. esperanzae</i>	09I91	UR	folhas	8,22	3,16	1,82	0,70	0,82	0,32	0,85	0,33	0,15	0,06
			flores	2,27	2,84	0,45	0,57	0,64	0,80	0,36	0,45	0	0
	30III191	MD	folhas	4,62	1,78	8,30	3,19	1,70	0,66	0,55	0,21	0,90	0,35
			flores	0,50	0,63	0,39	0,49	0,17	0,22	0,28	0,35	0,17	0,22
<i>A. cymbifera</i>	04X90	RD	folhas	3,30	0,27	3,72	1,43	1,07	0,41	0,29	0,11	0,37	0,14
	10XI90	IT	folhas	4,90	1,89	16,31	6,27	1,56	0,60	0,62	0,24	0,41	0,16
			flores	0,34	0,43	0,21	0,27	0,46	0,57	0,11	0,14	0,07	0,09
<i>A. galeata</i>	16V90	SJ	folhas	1,72	0,66	28,80	11,08	0,84	0,32	0,42	0,16	0,24	0,09
	13VI90	CA	folhas	4,17	1,60	9,37	3,61	0,51	0,20	0,16	0,06	0,49	0,19
	31I91	SJ	folhas	4,92	1,89	6,65	2,56	1,77	0,68	0,70	0,27	0,56	0,22
			ramos	0,46	0,14	0,33	0,10	0,26	0,08	0,11	0,04	0,11	0,04
			flores	0,30	0,38	0,17	0,22	0,37	0,47	0,07	0,09	0,01	0,02
			pedicelos	0,50	0,29	1,07	0,63	0,38	0,22	0,11	0,07	0,07	0,04
			raízes	0,43	0,08	4,75	0,83	0,40	0,07	0,12	0,02	0,07	0,01
24VII191	IA	folhas	0,84	0,32	11,28	4,34	1,00	0,38	0,52	0,20	0,60	0,23	

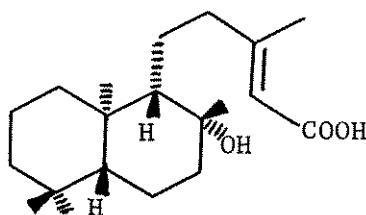
1) Data, local de coleta: BU= Burarama, ES; BS= Barra de São João, RJ; CA= Campinas, SP; IA= Itirapuã, SP; IT= Itatiaia, RJ; MD= Morraria Grande, MS; RD= Rio Dourado, RJ; SJ= Serra do Japi, Jundiá, SP; UR= Urucum, MS; VM= Viçosa, RS.

ácido labdanóico (AL) (Apêndice III). Estes compostos já haviam sido isolados nestas mesmas espécies por Lopes e Bolzani (1988), havendo o predomínio do ácido ent-labdan-8^P-ol-15-oico em A. galeata e ácido ent-labd-6^P-ol-8-(17),13-dien-15-oico em A. esperanzae (Figura 5).

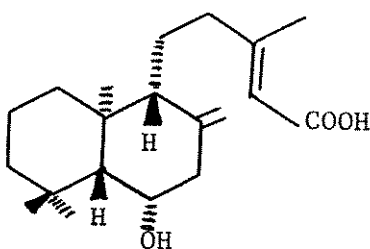
A Tabela 4 compara a presença e quantidade relativa das três principais classes de compostos encontradas nas Aristolochia aqui estudadas. Os AAs são compostos característicos das Aristolochia, mas surpreendentemente não foram detectados nas folhas de cinco espécies estudadas. A. macroura foi a espécie com maior quantidade de AAs, não sendo detectado nas folhas de A. odora, A. elegans, A. esperanzae, A. cymbifera e A. galeata. Em A. triangularis foi detectado AAs ao contrário dos resultados de Rucker *et al.* (1981). A análise das flores de algumas das espécies com a ausência de AAs nas folhas revelou a presença destes compostos. Sendo detectados também nos ramos e raízes de A. galeata. Esta espécie juntamente com A. esperanzae e A. cymbifera apresentaram grandes quantidades de ALs nas folhas. A quantidade de precipitado alcaloidal variou de 52 a 788mg para 160g de material. A. galeata foi a espécie com menos alcalóides (52mg nas folhas e 90mg nas flores). A. elegans (sem AAs e ALs) apresentou 69mg de alcalóides. Estudos anteriores (Rothschild, 1973; Urzúa & Priestap, 1985) encontraram traços de AA nesta espécie, diterpenos derivados do kaurano (Habib & El-Sebakhy, 1981) e alcalóides bis-benzilisoquinolínicos (El-Sebakhy & Waterman, 1984).



1) ácido ent-labdan-8B-ol-15-óico



2) ácido ent-labdan-8B-13-en-15-óico



3) ácido ent-labd-6B-ol-8(17),13-dien-15-óico

FIGURA 5: Principais diterpenos derivados do labdano encontrados em A. galeata (1 e 2) e em A. esperanzae (3), segundo Lopes e Bolzani (1988).

Tabela 4: Presença de ácidos aristolóquicos (AA), ácidos labdanóicos (AL) e alcalóides (A) em algumas espécies de *Aristolochia* sul-americanas

Espécie	Parte vegetal	AA ¹	AL ²	A ³
<i>A. sessilifolia</i>	folhas	+	-	282
<i>A. melastoma</i>	folhas	+++	-	170
<i>A. rumicifolia</i>	folhas	+	-	485
<i>A. odora</i>	folhas	-	-	239
<i>A. arcuata</i>	folhas	++	-	274
<i>A. macroura</i>	folhas	++++	-	258
<i>A. triangularis</i>	folhas	++	-	788
<i>A. elegans</i>	folhas	-*	-	69
<i>A. esperanzae</i>	folhas	-	+++	448
	flores	±	-	138
<i>A. cymbifera</i>	folhas	-	++++	189
	flores	±	-	206
<i>A. galeata</i>	folhas	-	++++	52
	pecíolos	-	-	67
	flores	±	-	90
	ramos	++	-	205
	raízes	++++	++	459

Quantidade estipulada : 1) em relação a intensidade das manchas em CDF, 2) peso da fração e espectro de RMN ¹H (60MHz), 3) precipitado alcaloidal com reagente de Mayer para 160 g de material fresco (valores em mg). Concentrações relativas: - não detectado, ± traços, + pouco, ..., ++++ muito. * Detectado como traços em outros estudos (veja Rothschild, 1973; Urzúa & Priestap, 1985).

Estes dados de presença/ausência de compostos permitem separar as Aristolochia estudadas em três grandes grupos:

- 1) Espécies com AAs nas folhas (sessilifolia, melastoma, rumicifolia, arcuata, macroura e triangularis).
- 2) Espécies sem AAs nem ALs nas folhas (odora e elegans) e
- 3) Espécies sem AAs e com ALs nas folhas (esperanzae, cymbifera e galeata).

A presença ou ausência destes compostos pode ser um dos fatores que influenciam a utilização das diferentes espécies de Aristolochia pelas espécies de Troidini. É conhecido que diversos terpenos são fagoinibidores para insetos (Seigler, 1979; Mabry e Gill, 1979; Nahrstedt, 1989). Como as espécies de Aristolochia com ALs são utilizadas por poucas espécies de Troidini, estes compostos podem estar detendo algumas espécies de fitófagos. A ausência de AA, composto fagoestimulante e estimulante de oviposição do Troidini Atrophaneura alcinous (Nishida & Fukami, 1989a b) poderia estar também mediando a utilização das Aristolochia. A presença de AAs nas folhas das espécies representantes dos gêneros mais primitivos de Aristolochiaceae (veja Munavalli & Viel, 1969a) pode indicar que é um estado primitivo. A análise química preliminar de folhas de dois outros gêneros de Aristolochiaceae (Euglypha e Holostylis) também indicou a presença de AAs. Como Aristolochia é considerado o gênero mais derivado e também apresenta AAs, pode-se supor que espécies mais derivadas (como esperanzae, cymbifera e galeata) podem ter perdido AAs e adquirido outras defesas (ALs) contra fitófagos especialistas em Aristolochiaceae, o que seria uma evidência de um cenário de coevolução.

2. Compostos de Troidini

A análise química de imagos de seis espécies de Troidini da região de Campinas (Amarais e Santa Genebra) e Jundiá (Serra do Japi) demonstra que estes organismos apresentam alcalóides além de AAs (Tabela 5). A concentração de alcalóides é muito superior (0,4 a 0,9% do PS) à concentração de AAs (0,005 a 0,013% do PS). Os AAs são considerados os compostos responsáveis pela impalatabilidade destes lepidópteros (Brower, 1984; Bowers, 1990), apesar de não existir nenhum estudo que demonstre este fato. Talvez a alta concentração de alcalóides presente nestes organismos também confira alguma defesa.

A Tabela 6 apresenta a quantidade de AAs por indivíduo (ug) e a concentração (% do PS) em 17 espécies de Troidini. Euryades corethrus, espécie mais primitiva da região Neotropical (Brown et al., no prelo) apresenta AAs em 0,02% do PS. As espécies com maiores concentrações de AAs (de 0,036 a 0,042% do PS) foram P. ascanius, P. anchises e P. chabrias, existindo uma alta variabilidade na quantidade de AAs. Em P. anchises variou de 14 a 90 ug/ind. dentro de um grupo de fêmeas coletadas no litoral de SP e RJ. As quantidades de AAs encontradas nos indivíduos das espécies analisadas foi muito menor que a encontrada em outras espécies em outros trabalhos (veja Rothschild et al., 1972; Urzúa & Friestap, 1985; Nishida & Fukami, 1989a;). Isto pode se dever, além do método empregado, a química da planta hospedeira e por um possível sequestro seletivo de AAs (veja Urzúa et al., 1987). Tanto as espécies consideradas mais primitivas quanto as mais derivadas apresentam AAs, contrariando a hipótese de Brown et al. (1991a) onde espécies mais primitivas (p.ex. Farides

Tabela 5: Concentração média (% do peso seco) de ácidos aristolóquicos e alcalóides em algumas espécies de Troidini.

Espécie	N	Acidos aristolóquicos	Alcalóides *
<u>Farides proneus</u>	8	0,010	0,7
<u>Farides agavus</u>	8	0,006	0,5
<u>Farides bunichus</u>	4	0,008	0,9
<u>Farides neophilus</u>	4	0,012	0,9
<u>Battus polydamas</u>	18	0,013	0,4
<u>Battus polystichtus</u>	6	0,005	0,8

N= número analisado

* considerado 50% do peso total do precipitado

Tabela 6: Quantidade de ácidos aristolóquicos (AAs) (ug/indivíduo) e sua concentração média (% do peso seco) em diferentes espécies de Troidini

Espécie	Local de coleta ¹	Planta hospedeira ²	Sexo ou estágio	N ³	AAs ⁴ (ug)	Concentração (x % peso seco)	
<u>Euryades corethrus</u>	CB, VM	1	fêmea	1	17	0,020	
			macho	1	23	0,020	
<u>Battus zetides</u>	PO	?	macho	1	14	0,024	
<u>B. polydamas</u>	CA, SJ	2, 3, 4, 5, 6, 7	fêmea	4	10 (4-21)	0,007	
			macho	1	13	0,008	
	C (CA)	2	fêmea	1	5	0,005	
			fêmea	2	8 (5-12)	0,009	
			macho	8	17 (10-28)	0,022	
	B. polystichtus	SJ, SE	2, 3, 4	pupa	6	8 (3-12)	0,006
				larva 5 estágio	6	15 (5-30)	0,014
<u>B. crassus</u>	RJ	?	fêmea	12	20 (3-60)	0,010	
			macho	6	12 (5-16)	0,008	
<u>Troides rhadamantus</u>	RJ	?	macho	2	29 (28-30)	0,016	
<u>Atrophaneura alcinous</u>	NJ	?	fêmea	1	9	0,003	
			macho	2	32 (5-60)	0,026	
<u>Parides proneus</u>	CA, SJ	2	fêmea	4	14 (7-23)	0,021	
			macho	9	8 (4-16)	0,011	
	C (CA)	2	pupa	5	15 (13-20)	0,015	
<u>P. ascanius</u>	RJ	9	fêmea	3	42 (17-68)	0,036	
<u>P. bunichus</u>	CA, SJ	2, 3, 4	fêmea	8	15 (4-32)	0,013	
			macho	9	15 (4-30)	0,014	
	C (CA)	3	macho	1	8	0,014	
<u>P. agavus</u>	CA, RJ	2, 3, 4	fêmea	6	13 (5-26)	0,015	
			macho	7	7 (3-14)	0,009	
<u>P. photinus</u>	C (CA)	3	macho	2	8 (5-11)	0,010	
<u>P. photinus</u>	GR	?	macho	1	6	0,008	
<u>P. chabrias</u>	DB	?	fêmea	1	10	0,042	
<u>P. tros</u>	RJ	10, 11	fêmea	1	81	0,051	
<u>P. neophilus</u>	CA	2, 3, 5, 6	fêmea	7	10 (7-19)	0,014	
			macho	10	9 (3-18)	0,009	
<u>P. zacynthus</u>	RJ, SN	9, 12, 13	fêmea	6	38 (15-69)	0,027	
			macho	4	27 (14-59)	0,023	
<u>P. anchises</u>	CA	2, 3, 5, 6	fêmea	3	26 (23-32)	0,014	
			fêmea	4	48 (14-90)	0,038	
	RJ, SN	4, 5, 12, 14	macho	2	17 (12-23)	0,013	
			macho	3	42 (19-65)	0,032	

1) C= criado em laboratório, CA= Campinas e CB= Curitiba, Brasil; CP= Cebu, Filipinas; GR= Guerrero, Mexico; NJ= Nagoya, Japão; DB= Obidos, Brasil; PO= Polo, Rep. Dominicana; RJ= Rio de Janeiro, SE= Serra de Extrema, SJ= Serra do Japi, SN= Santos, e VM= Viçosa, Brasil.

2) Aristolochia: 1-sessilifolia, 2-melastoma, 3-arcuata, 4-triangularis, 5-elegans, 6-esperanzae, 7-galeata, 8-taqala, 9-macroua, 10-rumicifolia, 11-cynanchifolia, 12-odora, 13-paulistana, 14-cymbifera.

3) número de indivíduos.

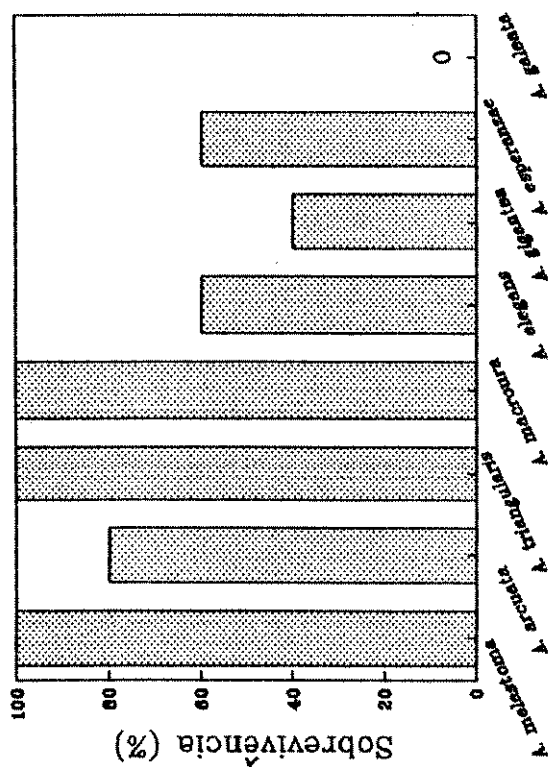
4) média aritmética (amplitude).

proneus) sequestrariam outros compostos (como terpenos) das suas plantas hospedeiras. Larvas de Battus polydamas criadas em folhas de A. galeata (que não apresentam AAs) surpreendentemente apresentaram AAs (5-30 ug/ind.), concentrações médias semelhantes às encontradas em indivíduos criados em plantas hospedeiras com AAs (A. melastoma e A. arcuata) e indivíduos coletados na natureza. Larvas de algumas espécies asiáticas de Troidini criadas em espécies de Aristolochia sem AAs apresentaram também estes compostos (Nishida, comunicação pessoal). Este fato pode indicar uma possível biossíntese de AAs à partir de precursores sequestrados da planta hospedeira (como alcalóides benzilisoquinolínicos) pelas larvas.

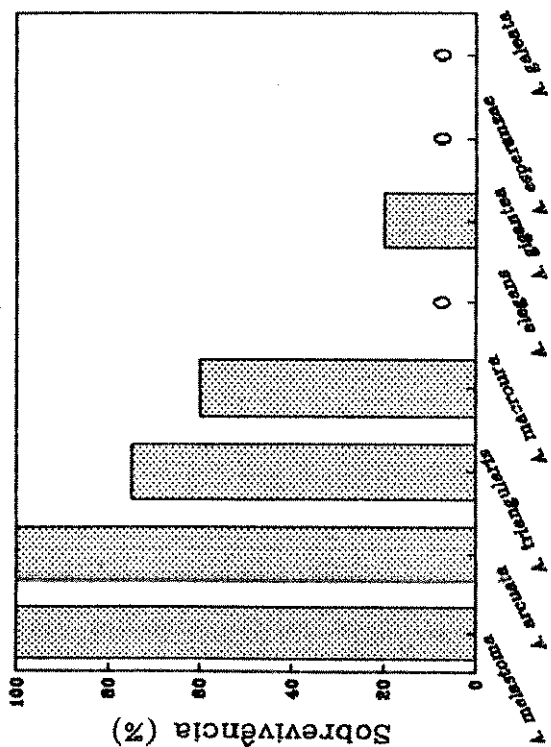
3. Criação e bioensaios com Troidini

A Figura 6 mostra a sobrevivência larval após sete dias de alimentação de algumas espécies de Troidini em diferentes espécies de Aristolochia (ver Tabela 7). Parides proneus, que na natureza só utiliza A. melastoma teve 100% de sobrevivência em A. arcuata, 75% em A. triangularis e 60% em A. macroura. Todas as larvas criadas em A. elegans, A. esperanzae e A. galeata morreram no segundo e terceiro dia, recusando completamente as folhas de esperanzae e galeata. P. neophilus, uma espécie mais polífaga (utiliza várias espécies de Aristolochia de composição química muito distinta), aceitou todas as espécies de Aristolochia oferecidas à exceção de A. galeata, na qual todas as larvas morreram sem comer. Battus polystictus morreu em A. galeata (na qual oviposita na Serra do Japi) e em A. macroura, e surpreendentemente apresentou uma menor sobrevivência em A.

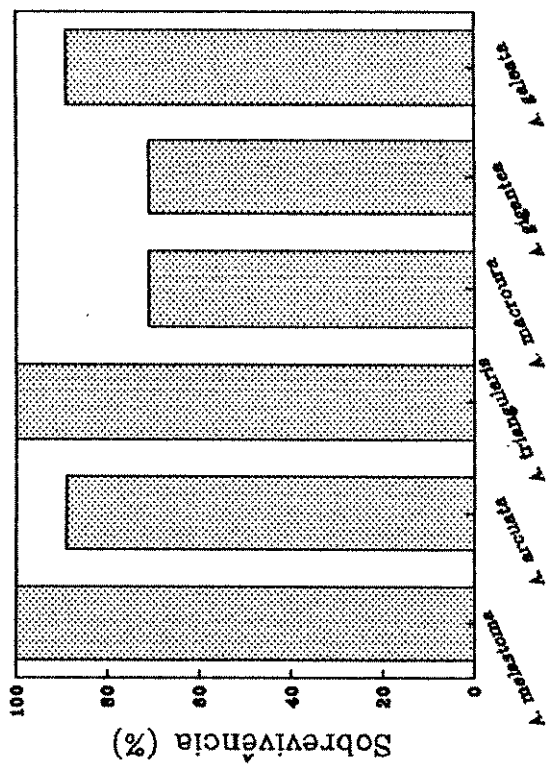
Parides neophilus



Parides proneus



Battus polydamas



Battus polystichtus

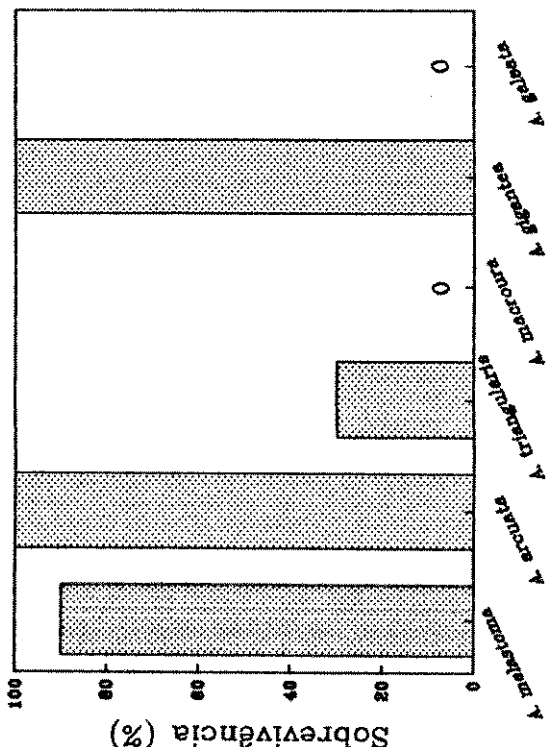


FIGURA 6: Sobrevivência das larvas de *P. proneus*, *P. neophilus*, *B. polystichtus* e *B. polydamas* após sete dias de vida em diferentes espécies de *Aristolochia* (veja tabela 7 para as diferenças nas probabilidades).

Tabela 7: Valores de Qui-Quadrado e suas probabilidades para as diferenças nas sobrevivências larvais em diferentes *Aristolochia* após sete dias de vida (veja Figura 5).

A) *Parides proneus*

	(6) <i>melastoma</i>	<i>arcuata</i>	<i>triangularis</i>	<i>macroura</i>	<i>elegans</i>	<i>gigantea</i>	<i>esperanzae</i>
<i>arcuata</i> (4)	0 ns						
<i>triangularis</i> (4)	1,67 ns	1,14 ns					
<i>macroura</i> (5)	2,93 ns	2,06 ns	0,02 ns				
<i>elegans</i> (5)	11 ***	9 **	5,62 †	4,28 †			
<i>gigantea</i> (5)	7,54 **	5,76 †	2,72 ns	1,67 ns	1,11 ns		
<i>esperanzae</i> (5)	11 ***	9 **	5,62 †	4,28 †	0 ns	1,11 ns	
<i>galeata</i> (4)	10 **	8 **	4,80 †	3,60 ns	0 ns	0,90 ns	0 ns

B) *Parides neophilus*

	(4) <i>melastoma</i>	<i>arcuata</i>	<i>triangularis</i>	<i>macroura</i>	<i>elegans</i>	<i>gigantea</i>	<i>esperanzae</i>
<i>arcuata</i> (5)	0,9 ns						
<i>triangularis</i> (4)	0 ns	0,9 ns					
<i>macroura</i> (4)	0 ns	0,9 ns	0 ns				
<i>elegans</i> (5)	2,06 ns	0,47 ns	2,06 ns	2,06 ns			
<i>gigantea</i> (5)	3,60 ns	1,67 ns	3,60 ns	3,60 ns	0,40 ns		
<i>esperanzae</i> (5)	2,06 ns	0,47 ns	2,06 ns	2,06 ns	0 ns	0,40 ns	
<i>galeata</i> (5)	9 **	6,67 **	9 **	9 **	4,28 †	2,50 ns	4,28 †

C) *Battus polystictus*

	(10) <i>melastoma</i>	<i>arcuata</i>	<i>triangularis</i>	<i>macroura</i>	<i>gigantea</i>
<i>arcuata</i> (10)	1,05 ns				
<i>triangularis</i> (10)	7,5 **	10,77 **			
<i>macroura</i> (10)	16,36 ***	20 ***	3,53 ns		
<i>gigantea</i> (10)	1,05 ns	0 ns	10,77 **	20 ***	
<i>galeata</i> (10)	16,36 ***	20 ***	3,53 ns	0 ns	20 ***

D) *Battus polydamas*

	(6) <i>melastoma</i>	<i>arcuata</i>	<i>triangularis</i>	<i>macroura</i>	<i>gigantea</i>
<i>arcuata</i> (9)	0,71 ns				
<i>triangularis</i> (7)	0 ns	0,83 ns			
<i>macroura</i> (7)	2,02 ns	0,79 ns	2,33 ns		
<i>gigantea</i> (7)	2,02 ns	0,79 ns	2,33 ns	0 ns	
<i>galeata</i> (9)	0,71 ns	0 ns	0,83 ns	0,79 ns	0,79 ns

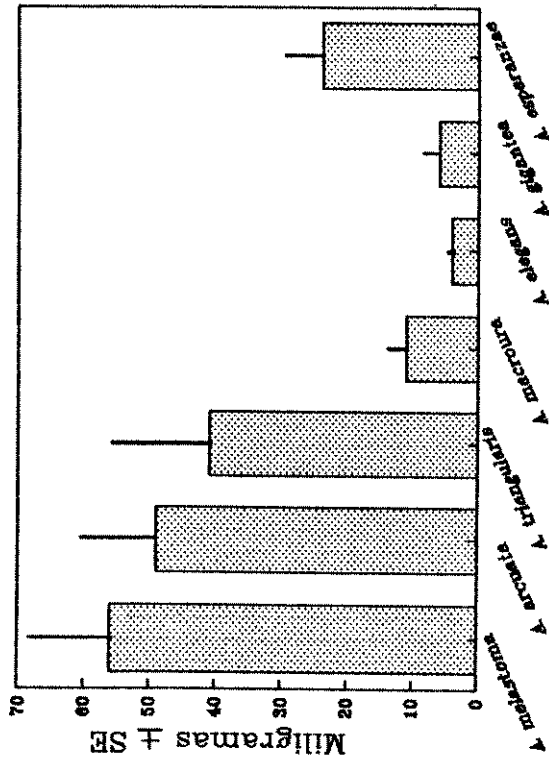
(N) tamanho da amostra, ns não significativo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

triangularis, planta hospedeira utilizada na Serra de Extrema e Serra do Japi. B. polydamas, a espécie mais polífaga, teve sobrevivências semelhantes em todas espécies de Aristolochia testadas.

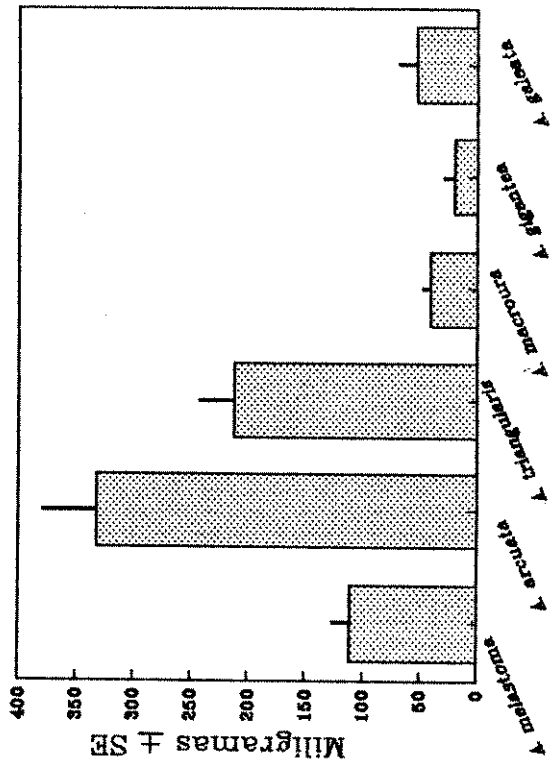
A análise do peso larval após o mesmo período mostrou que não havia diferença significativa nas larvas de P. proneus criadas em A. melastoma (30 ± 4 mg) (média+erro padrão) e A. arcuata (22 ± 3 mg), havendo um peso progressivamente e significativamente menor em A. triangularis, A. macroura e A. gigantea (Figura 7 e Tabela 8). Apesar de P. neophilus ser uma espécie mais polífaga, as larvas criadas em A. macroura, A. elegans e A. gigantea apresentaram um peso médio significativamente inferior, respectivamente 11 ± 2 mg, $4 \pm 0,3$ mg e 6 ± 1 mg, às criadas em A. melastoma (56 ± 12 mg), A. arcuata (49 ± 12 mg) e A. triangularis (41 ± 15 mg). B. polystichtus teve seu menor desenvolvimento em A. triangularis (18 ± 2 mg) além da alta mortalidade; o peso das larvas criadas em A. arcuata e A. gigantea não diferiram significativamente (58 ± 4 mg e 49 ± 4 mg, respectivamente) e A. melastoma parece ser uma planta de qualidade intermediária. Em B. polydamas o melhor desenvolvimento foi em A. arcuata (332 ± 45 mg) seguido de A. triangularis (211 ± 35 mg) e A. melastoma (111 ± 8 mg); os menores pesos larvais ocorreram em A. macroura, A. gigantea e A. galeata. O peso larval em B. polydamas após uma semana é muito superior (chega a mais de 300mg) às outras espécies (no máximo 60mg por indivíduo) de Troidini.

A Figura 8 mostra a sobrevivência de larvas de B. polydamas (desde a eclosão do ovo até pupa) em diferentes espécies de Aristolochia. Em A. melastoma, A. arcuata e A.

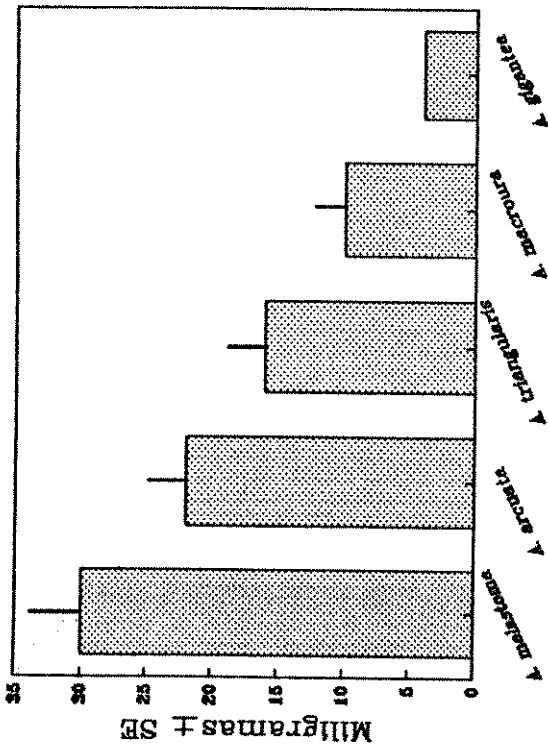
Parides neophilus



Battus polydamas



Parides proneus



Battus polystichtus

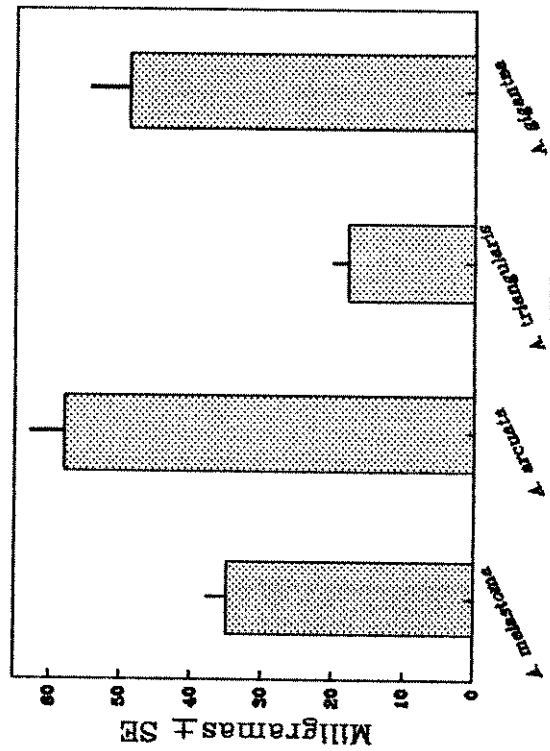


FIGURA 7: Pesos (média + erro padrão) de larvas de *P. proneus*, *P. neophilus*, *B. polystichtus* e *B. polydamas* após sete dias de vida em diferentes espécies de *Aristolochia* (veja Tabela 8 para as diferenças nas probabilidades).

Tabela 8: Valores de U do Teste de Mann-Whitney e suas probabilidades para as diferenças de pesos larvais em diferentes Aristolochia após sete dias de vida (veja Figura 7).

A) Parides proneus

	(6) <u>melastoma</u>	<u>arcuata</u>	<u>triangularis</u>	<u>macroura</u>
<u>arcuata</u> (4)	16,5 ns			
<u>triangularis</u> (3)	17 *	-- --		
<u>macroura</u> (3)	18 *	-- --	-- --	
<u>gigantea</u> (1)	-- --	-- --	-- --	-- --

B) Parides neophilus

	(4) <u>melastoma</u>	<u>arcuata</u>	<u>triangularis</u>	<u>macroura</u>	<u>elegans</u>	<u>gigantea</u>
<u>arcuata</u> (4)	10 ns					
<u>triangularis</u> (4)	10 ns	9 ns				
<u>macroura</u> (4)	16 *	16 *	14 ns			
<u>elegans</u> (3)	-- --	-- --	-- --	-- --		
<u>gigantea</u> (2)	-- --	-- --	-- --	-- --	-- --	
<u>esperanzae</u> (3)	-- --	-- --	-- --	-- --	-- --	-- --

C) Battus polystictus

	(9) <u>melastoma</u>	<u>arcuata</u>	<u>triangularis</u>
<u>arcuata</u> (10)	84 **		
<u>triangularis</u> (3)	27 **	30 **	
<u>gigantea</u> (10)	79,5 **	72 ns	30 **

D) Battus polydamas

	(6) <u>melastoma</u>	<u>arcuata</u>	<u>triangularis</u>	<u>macroura</u>	<u>gigantea</u>
<u>arcuata</u> (8)	47 **				
<u>triangularis</u> (7)	37 *	48 *			
<u>macroura</u> (5)	30 **	76 **	35 **		
<u>gigantea</u> (5)	35 **	40 **	35 **	30 **	
<u>galeata</u> (8)	45 **	100 **	56 **	24 ns	30,5 ns

(N) tamanho da amostra, ns não significativo, * P<0,05 ** P<0,01.

-- não comparável.

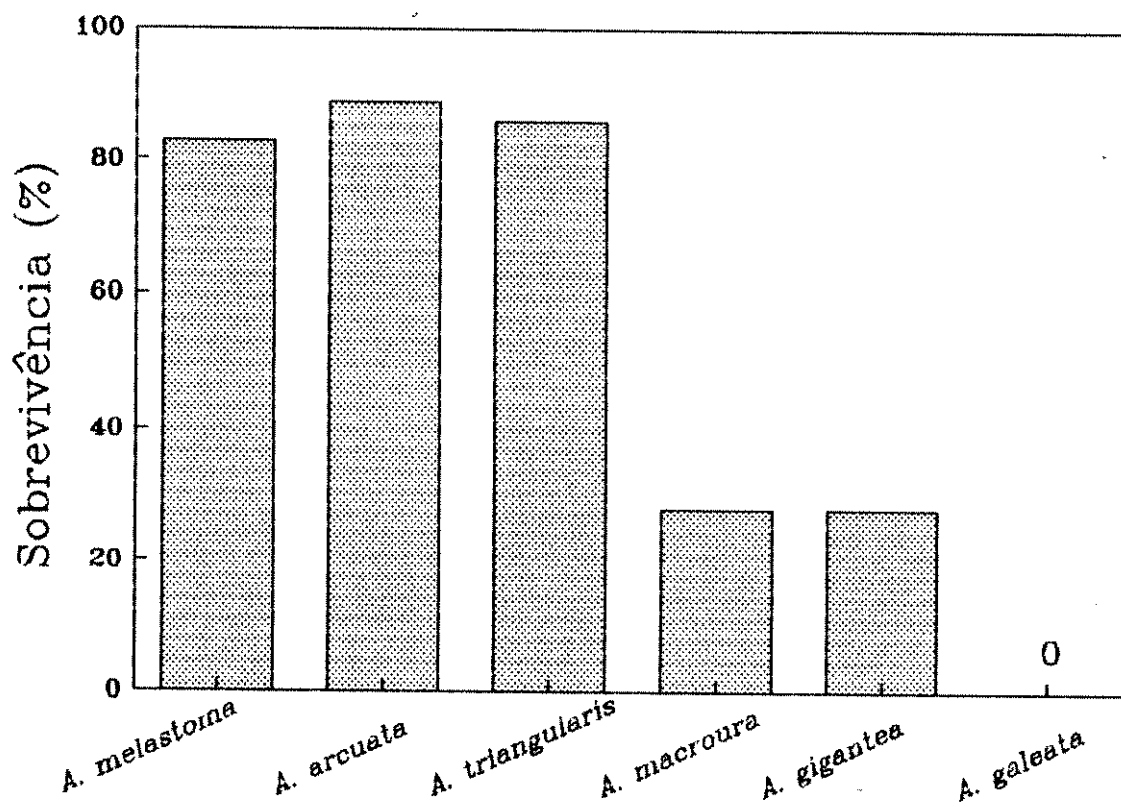


Figura 8: Sobrevivência de larvas de *Battus polydamas* (desde a eclosão do ovo até pupa) criadas com folhas de diferentes espécies de *Aristolochia*.

Valores de Qui-Quadrado e probabilidades para um grau de liberdade

	(6) <i>melastoma</i>	<i>arcuata</i>	<i>triangularis</i>	<i>macroura</i>	<i>gigantea</i>
<i>arcuata</i> (9)	0,09 ns				
<i>triangularis</i> (7)	0,01 ns	0,04 ns			
<i>macroura</i> (7)	3,90 *	6,11 *	4,67 *		
<i>gigantea</i> (7)	3,90 *	6,11 *	4,67 *	0 ns	
<i>galeata</i> (15)	16,40***	20 ***	17,68***	4,71 *	4,71 *

(N) tamanho da amostra, ns não significativo, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$

triangularis é superior a 80%, mas em A. macroura e A. gigantea a sobrevivência é de apenas 28%. Nenhuma larva conseguiu empupar em folhas de A. galeata, morrendo no 5º estágio.

A duração larval (desde a eclosão do ovo até o empupamento) foi menor em A. arcuata (13 dias \pm 1), A. melastoma (15 dias) e A. triangularis (17 dias) (Figura 9). Em A. gigantea, B. polydamas levou 26 dias para empupar, e em A. galeata, na qual não empupou, chegou a passar até 25 dias no 5º estágio.

As médias dos pesos das pupas cujas larvas se alimentaram de A. melastoma e A. triangularis foram maiores, respectivamente (1367 \pm 80mg) e (1242 \pm 42mg) que em A. arcuata (983 \pm 102mg) e A. gigantea (813mg) (Figura 10).

A utilização dos dados de oviposição e alimentação dos Troidini na natureza deve ser cautelosa para qualquer hipótese ecológica ou de coevolução. Várias espécies nas quais foram encontrados ovos e larvas das diversas espécies de Troidini no campo (veja Tabela 1 e 2) deram altíssima mortalidade larval e desenvolvimento muito lento nas criações de laboratório. Talvez as larvas necessitem complementar sua dieta como ocorre com outros lepidópteros (K.S.Brown, comunicação pessoal). Larvas maiores de B. polydamas, como de muitos outros Troidini (P. neophilus, P. anchises, Troides), exibem o comportamento de comer os ramos, flores e até frutos de diversas espécies de Aristolochia, o que poderia ser relacionado a uma necessidade de complementação.

Todas as larvas de B. polydamas criadas em em folhas de A. galeata acabam morrendo no 5º estágio. A adição de ácido aristolóquico (AA) na concentração de 0,18% do peso seco da

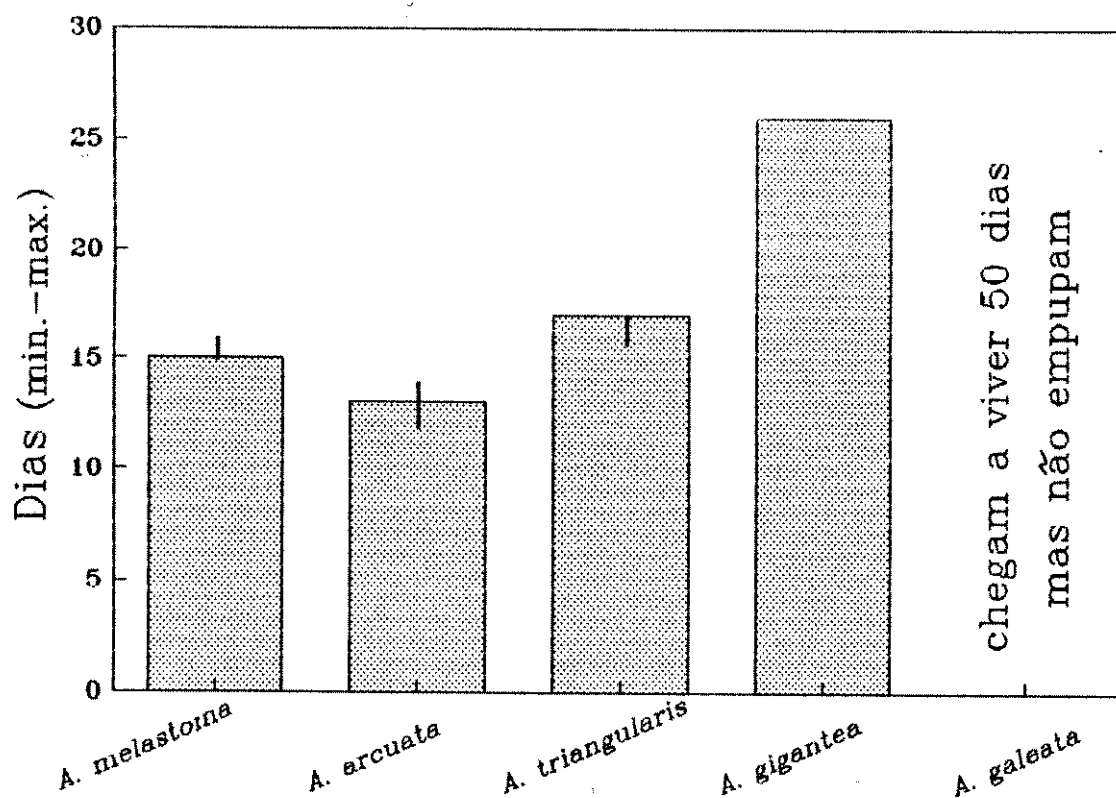


Figura 9: Duração larval (dias) (moda) de Battus polydamas (desde a eclosão do ovo até pupa) criadas com folhas de diferentes espécies de Aristolochia .

Valores de U do Teste de Mann-Whitney e sua probabilidade

	(5)melastoma	arcuata	triangularis
arcuata(6)	30 **		
triangularis(6)	36 **	36 **	
gigantea(1)	-- --	-- --	-- --

(N) tamanho da amostra, ** $P < 0,01$, -- não comparável

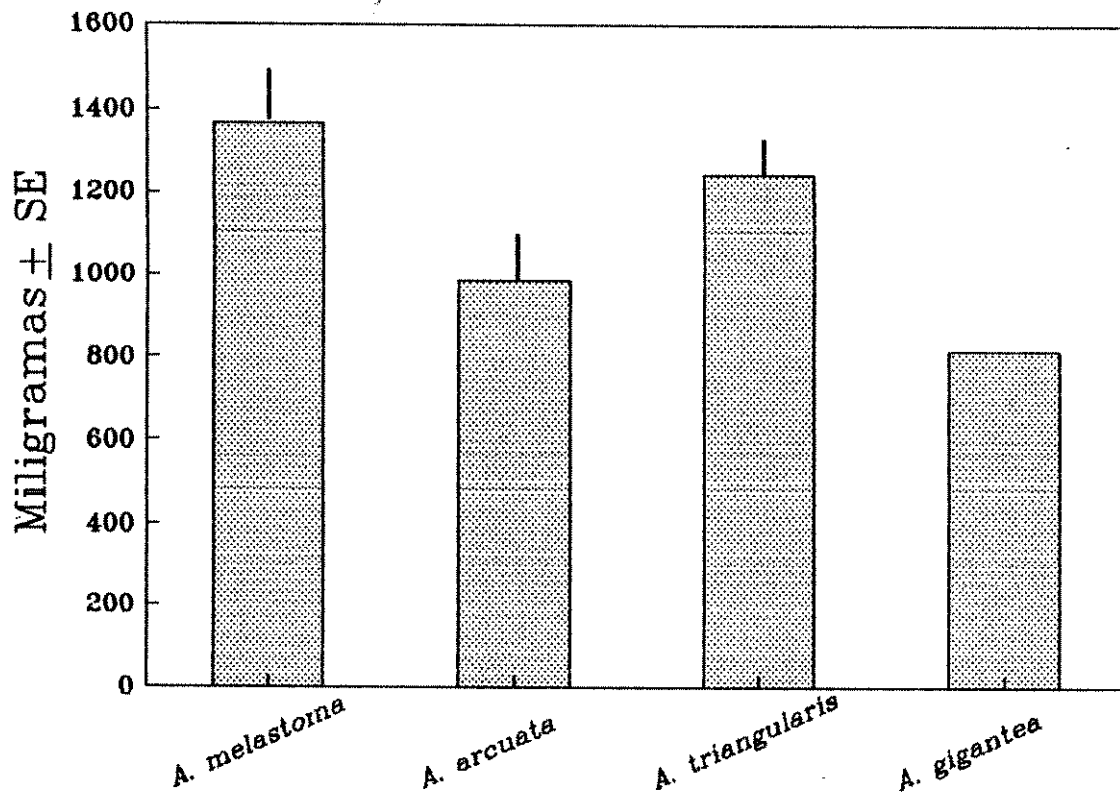


Figura 10: Média dos pesos das pupas de *Battus polydamas* criadas quando larvas em diferentes espécies de *Aristolochia*.

Valores de U do Teste de Mann-Whitney e sua probabilidade

	(5) <u>melastoma</u>	<u>arcuata</u>	<u>triangularis</u>
<u>arcuata</u> (6)	27 †		
<u>triangularis</u> (6)	21 ns	30 ns	
<u>gigantea</u> (1)	---	---	---

(N) tamanho da amostra, ns não significativo, † $P < 0,05$

folha (semelhante à encontrada em A. arcuata) faz com que as larvas entrem em pré-pupa e empupem, não diferindo significativamente das larvas alimentadas com A. arcuata (Figura 11). Os resultados deste experimento indicam a necessidade dos AAs, encontrados nos ramos e nas flores de A. galeata (Tabela 4), para o completo desenvolvimento de B. polydamas.

Larvas de 5^o estágio de P. bunichus e P. neophilus também aceitam ramos de A. galeata no laboratório, consumindo-os vorazmente provavelmente devido à presença de AA e ausência de AL (veja a Tabela 4).

A Figura 12 mostra o consumo (média±erro padrão) de folhas de algumas espécies de Aristolochia por larvas de algumas espécies de Troidini. Larvas de 5^o estágio de P. bunichus após 24 horas consumiram significativamente menor peso de folhas de A. galeata (9±7mg de peso seco) que a A. arcuata (61±10mg PS). O consumo de folhas de A. elegans (49±7mg PS) não diferiu significativamente de A. arcuata. Larvas de 5^o estágio de P. neophilus em 24 horas consumiram 90±10mg PS de folhas A. arcuata e não consumiram folhas de A. galeata. Larvas de 5^o estágio de B. polystichtus apresentaram um consumo médio significativamente menor de A. galeata (14±4mg PS) em relação a A. arcuata (73±7mg PS). Larvas de 3^o estágio da mesma espécie consumiram significativamente menos A. elegans (11±1mg PS) que A. triangularis (22±2mg PS). Larvas de 4^o estágio de B. polystichtus consumiram menos A. esperanzae e A. macroura, respectivamente 117±3mg PS e 67±7mg PS, que A. triangularis (194±18mg PS). O consumo de A. galeata por larvas de 5^o estágio de B. polydamas foi significativamente menor (7±3mg PS) que A.

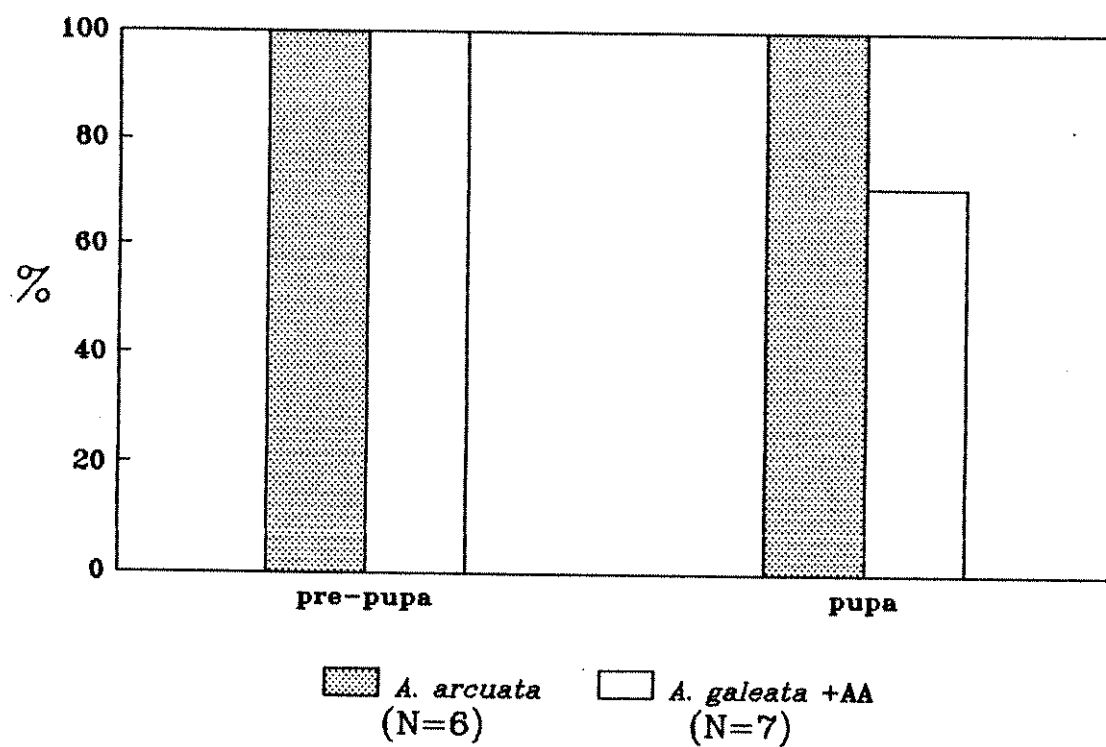


Figura 11: Porcentagem das larvas de 5^o estágio de Battus polydamas que entraram em pré-pupa, e de pré-pupas que completaram o empupamento em Aristolochia arcuata e A. galeata + 0,4 mg/g de AA (0,18%PS).

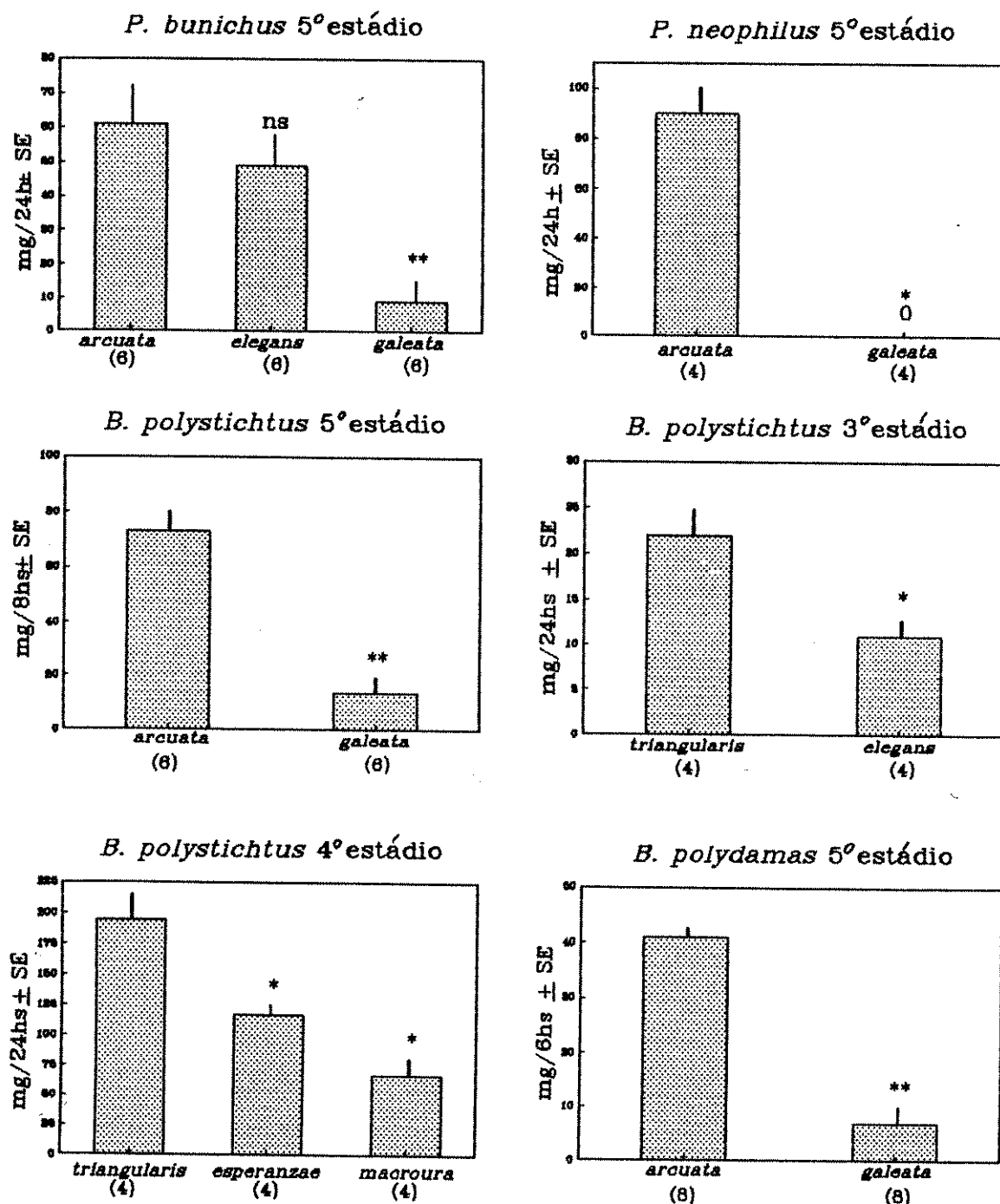


Figura 12: Consumo em miligramas de peso seco ($\bar{X} \pm SE$) de folhas de diferentes espécies de *Aristolochia* por larvas de algumas espécies de Troidini. Os números entre parênteses representam o número de larvas. Diferenças significativas pelo Teste de U de Mann-Whitney em relação ao controle (barra da esquerda): * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ ns não significativo

arcuata (41±5mg PS). Estes consumos menores em algumas espécies de Aristolochia, por exemplo A. galeata, podem ser devidos a diferenças químicas, as quais seriam responsáveis por desenvolvimentos larvais mais lentos.

A Tabela 9 mostra o crescimento relativo (CrR), consumo relativo (CR) e eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) de algumas espécies de Troidini em diferentes Aristolochia. Larvas de B. bunichus tiveram um CrR significativamente menor quando alimentadas com A. elegans e A. galeata em comparação com larvas alimentadas com A. arcuata. Isto se deve ao CR significativamente menor dessas duas Aristolochia do que de A. arcuata, provavelmente pela existência de compostos de efeito fagoinibidor nestas espécies. A ECI também foi significativamente menor em A. elegans e A. galeata que em A. arcuata. Isto poderia ser devido, em A. elegans, a um efeito tóxico além de fagoinibidor, e em A. galeata a uma forte fagoinibição fazendo com que as larvas não comessem nem o suficiente para manterem o seu peso. Esta fagoinibição foi ainda mais evidente nas larvas de P. neophilus, que não comeram A. galeata, perdendo aproximadamente 5% do seu peso. Larvas de B. polystichtus alimentadas com A. elegans apresentaram um CrR e CR menores que quando alimentadas com A. triangularis; a ECI diferiu apreciavelmente mas não significativamente. Larvas alimentadas com A. macroura e A. esperanzae apresentaram CrR menores que em A. triangularis, devido aos CRs e ECIs menores nessas duas espécies, indicando a existência de compostos fagoinibidores e de efeitos tóxicos para estas larvas nestas plantas.

Tabela 9: Crescimento relativo (CrR), Consumo Relativo (CR) e Eficiência de Conversão do Alimento Ingerido (ECI) de algumas espécies de Troidini em diferentes espécies de *Aristolochia* (24 horas de experimento)

ESPECIE	ESTÁDIO	N ¹	<i>Aristolochia</i>	CrR % ($\bar{X} \pm SE$)	CR ($\bar{X} \pm SE$)	ECI % ($\bar{X} \pm SE$)
<i>Parides bunichus</i>	5 ^o E	6	<i>arcuata</i>	32,0 \pm 3,7	0,555 \pm 0,085	61,0 \pm 5,5
		6	<i>elegans</i>	5,0 \pm 1,3**	0,202 \pm 0,017 †	24,9 \pm 6,5 †
		6	<i>galeata</i>	-7,0 \pm 1,6**	0,052 \pm 0,042**	-48,8 \pm 42,4**
<i>Parides neophilus</i>	5 ^o E	4	<i>arcuata</i>	32,4 \pm 4,0	1,289 \pm 0,096	25,9 \pm 4,5
		4	<i>galeata</i>	-4,7 \pm 0,8 †	0 †	---
<i>Battus polystictus</i>	3 ^o E	4	<i>triangularis</i>	164,4 \pm 27,9	4,065 \pm 0,063	40,4 \pm 3,1
		4	<i>elegans</i>	22,5 \pm 14,4 †	0,850 \pm 0,138 †	21,3 \pm 10,7ns
	4 ^o E	4	<i>triangularis</i>	73,5 \pm 8,3	1,953 \pm 0,169	37,3 \pm 1,5
		4	<i>macroura</i>	15,5 \pm 3,1 †	0,743 \pm 0,068 †	20,3 \pm 3,1 †
		4	<i>esperanzae</i>	13,3 \pm 4,2 †	0,908 \pm 0,064 †	13,9 \pm 3,6 †
		4				

1) N= número de indivíduos.

Diferenças significativas pelo Teste de U de Mann-Whitney em relação a *A. arcuata* (controle)

ns= não significativo

† = P<0,05

**= P<0,01

A Figura 13 mostra o efeito dos ácidos labdanóicos de A. galeata (AL-G) e de A. esperanzae (AL-Es) aplicados na concentração de 5,5mg/g em folhas de espécies normalmente consumidas. Nesta concentração houve fagoinibição nas larvas de P. proneus e de B. polystichtus, mas não de P. bunichus, P. neophilus ou B. polydamas. O consumo das larvas de P. proneus em folhas de A. melastoma com AL-G foi de 43±6mg PS e do grupo controle 77±10mg PS. Larvas de 4^o estágio de B. polystichtus em A. arcuata com AL-G consumiram 18±3mg PS enquanto que o grupo controle consumiu 43±8mg PS. Os AL-Es também tiveram efeito sobre o consumo das larvas de 5^o estágio de B. polystichtus em A. triangularis, o grupo controle consumiu 477±11mg PS, mas com AL-Es apenas 155±17mg PS.

O aumento da concentração de AL para 13mg/g promoveu uma fagoinibição nas espécies em que estes compostos não tiveram efeito na concentração de 5,5mg/g (Figura 14). Isto mostra que estes ácidos são responsáveis, pelo menos em parte, pelo desenvolvimento mais lento e pela rejeição de A. esperanzae e A. galeata por espécies de Troidini, nas regiões onde as folhas apresentam concentrações maiores.

A fração neutra polar de A. galeata (FNP-G) apresentou atividade fagoinibidora na concentração de 0,7mg/g para as larvas de P. bunichus e de B. polystichtus (Figura 15). Surpreendentemente esta fração não teve efeito significativo nas larvas de 4^o estágio de P. bunichus.

A Figura 16 mostra o efeito do ácido aristolóquico (AA) em algumas espécies de Troidini. O consumo por larvas de P. neophilus e de B. polydamas de A. galeata (que não apresenta

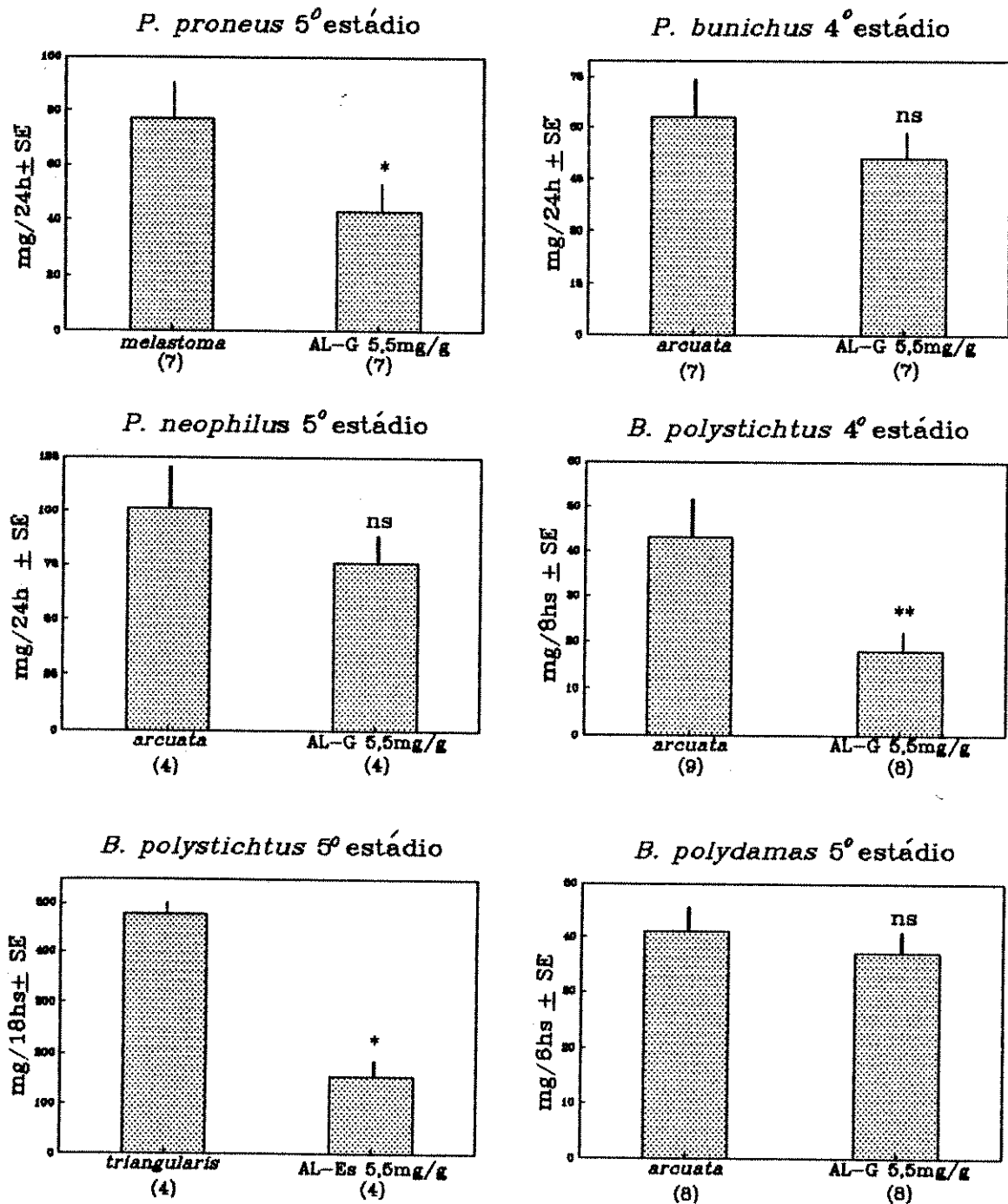


Figura - 13: Efeito da fração de ácidos labdanóicos de *A. galeata* (AL-G) e de *A. esperanzae* (AL-Es), na concentração de 5,5 mg/g, sobre o consumo (miligramas PS) de *Aristolochia* por larvas de diferentes espécies de Troidini. Os números entre parênteses representam o número de indivíduos. Diferenças significativas pelo Teste de U de Mann-Whitney em relação ao controle: * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ e ns não significativo.

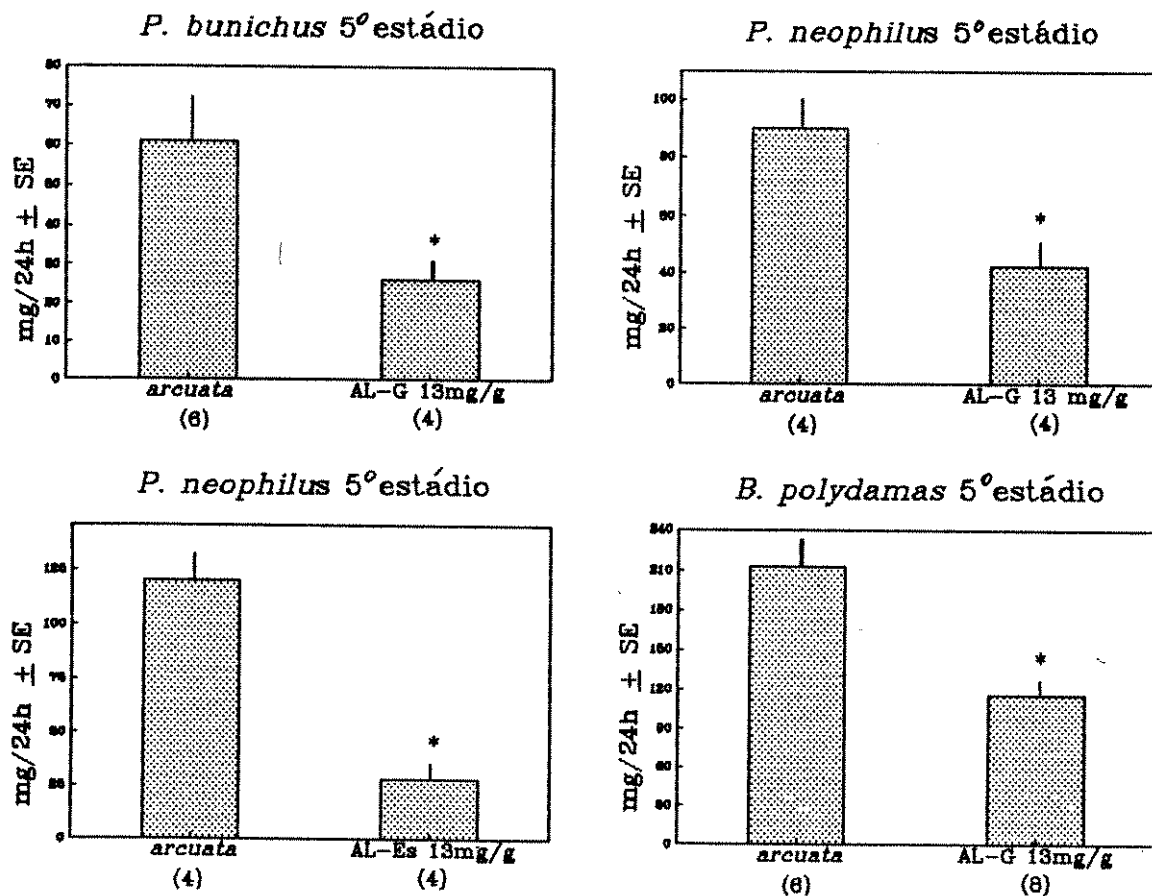


Figura 14: Efeito da fração de ácidos labdanóicos de *A. galeata* (AL-G) e de *A. esperanzae* (AL-Es), na concentração de 13 mg/g, sobre o consumo (miligramas PS) de *Aristolochia* por larvas de diferentes espécies de Troidini. Os números entre parênteses representam o número de indivíduos. Diferenças significativas pelo Teste de U de Mann-Whitney em relação ao controle: * $P < 0,05$

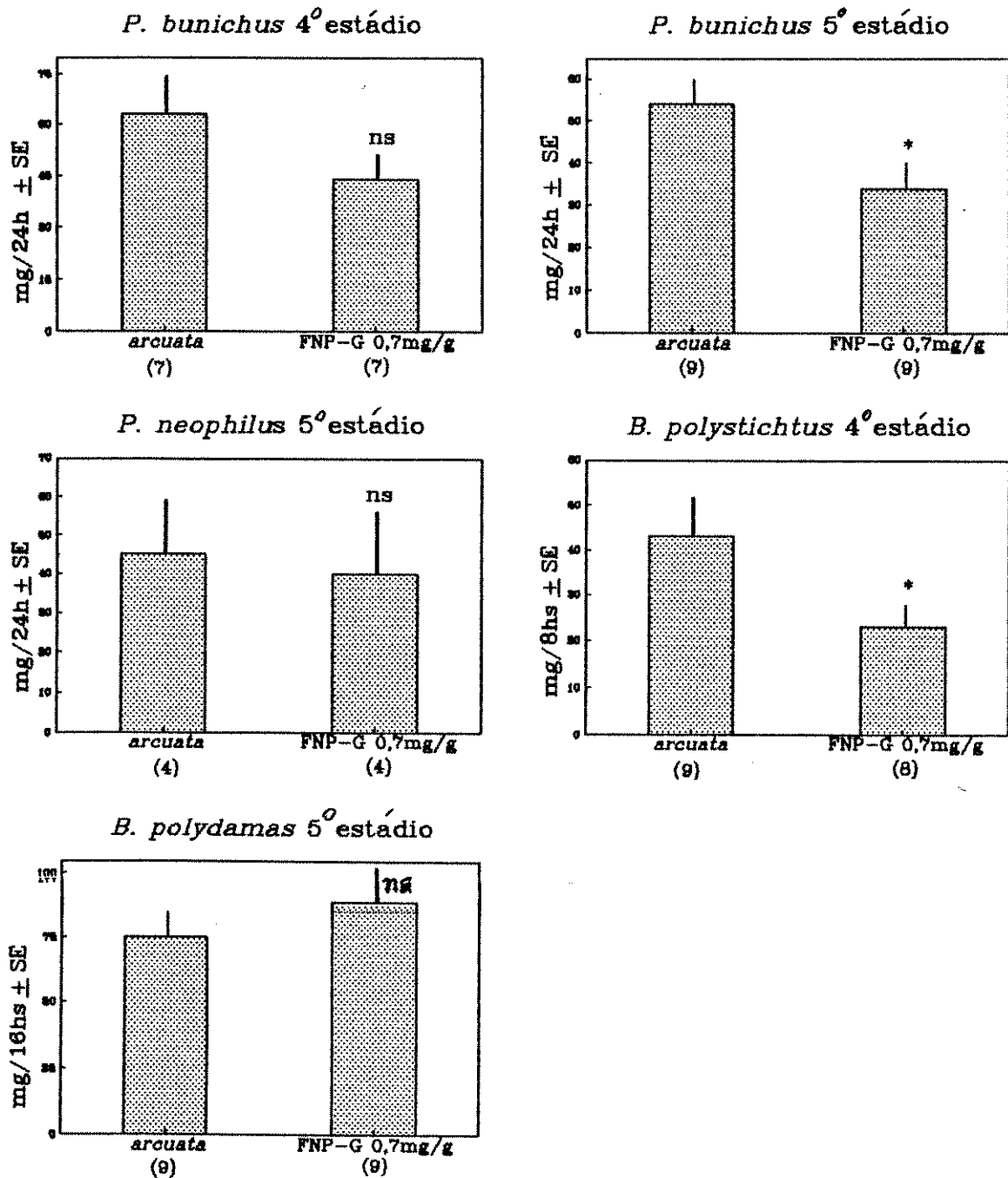


Figura 15: Efeito da fração neutra polar de *A. galeata* (FNP-G) 0,7 mg/g no consumo (miligramas FS) de *A. arcuata* por larvas de diferentes espécies de Troidini. Os números entre parênteses representam o número de indivíduos. Diferenças significativas pelo Teste de U de Mann-Whitney em relação ao controle: * $P < 0,05$ e ns não significativo.

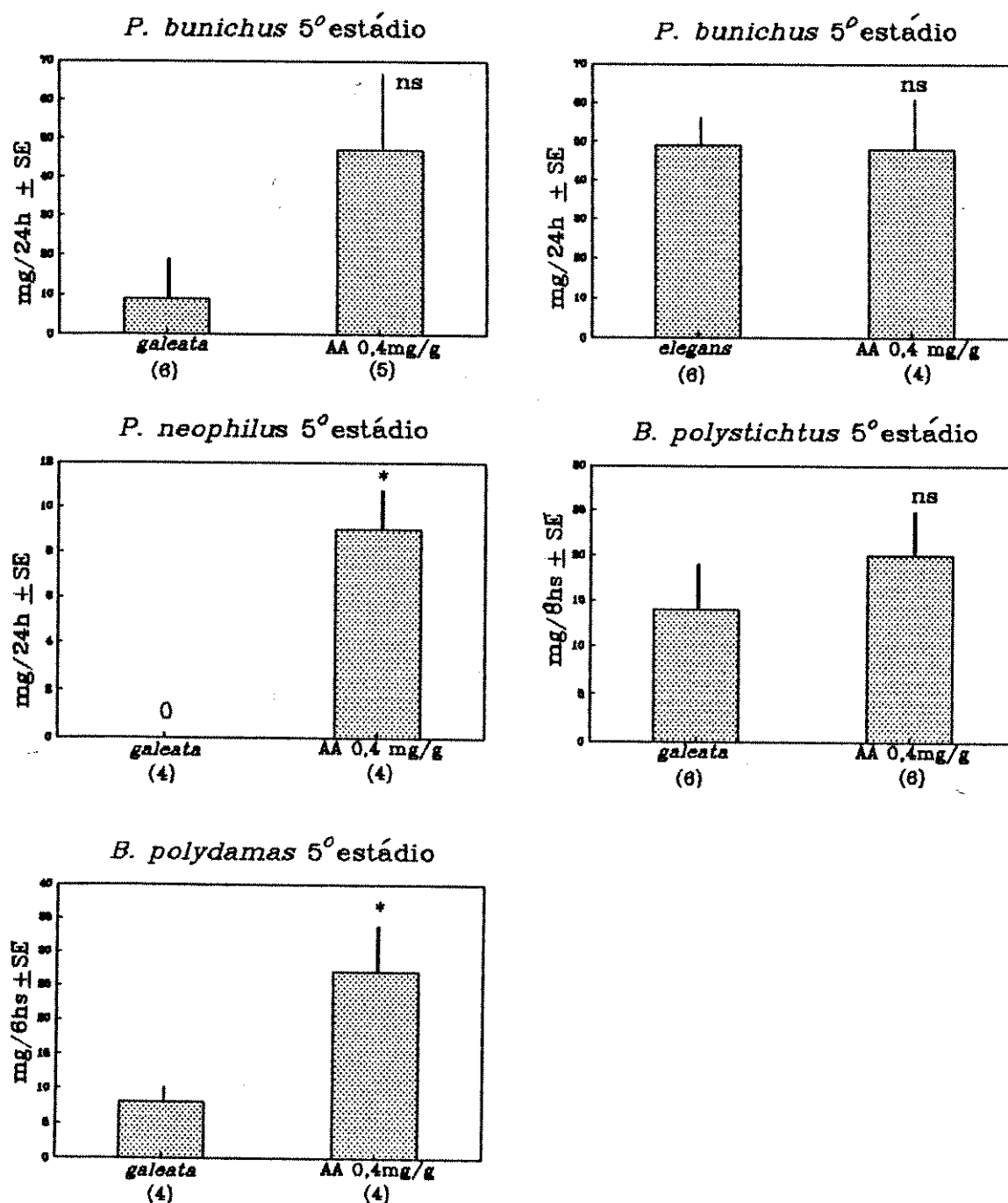


Figura 16: Efeito do ácido aristolóquico (AA) 0,4 mg/g no consumo (miligramas PS) de *Aristolochia* por larvas de diferentes espécies de Troidini. Os números entre parênteses representam o número de indivíduos. Diferenças significativas pelo Teste de U de Mann-Whitney em relação ao controle: * $P < 0,05$ e ns não significativo.

estes compostos nas folhas) é aumentado com 0,4mg/g de AA.

As larvas de B. polystichtus são pouco estimuladas por estes compostos na concentração de 1,1mg/g, enquanto que em P. neophilus e B. polydamas a fagoestimulação é significativa (Figura 17). A ausência de AAs em algumas espécies de Aristolochia pode explicar sua utilização restrita por poucas espécies de Troidini.

A fração neutra polar de A. elegans (FNF-E) 1,1mg/g não apresentou efeito significativo sobre o consumo nas larvas de P. proneus, P. bunichus e B. polydamas (Figura 18). A fração de A. macroura (FNF-M 0,8mg/g) também não teve efeito em B. polystichtus.

A Tabela 10 mostra o efeito de algumas frações sobre o crescimento relativo (CrR), consumo relativo (CR) e eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) em algumas espécies de Troidini. As frações que tiveram efeitos fagoinibidores (AL-G, AL-Es e FNF-G) promoveram um crescimento menor devido a uma redução do consumo. O CR de A. galeata por larvas de P. neophilus e B. polydamas aumentou na presença de AA, mas o CrR não. Isto se deve a um baixo consumo ou a presença de outros compostos de efeitos tóxicos.

Estes dados de consumo e crescimento mostram que em parte a utilização de diferentes espécies de Aristolochia pelos Troidini é devida a presença de compostos secundários definidos que podem inibir ou potenciar o consumo.

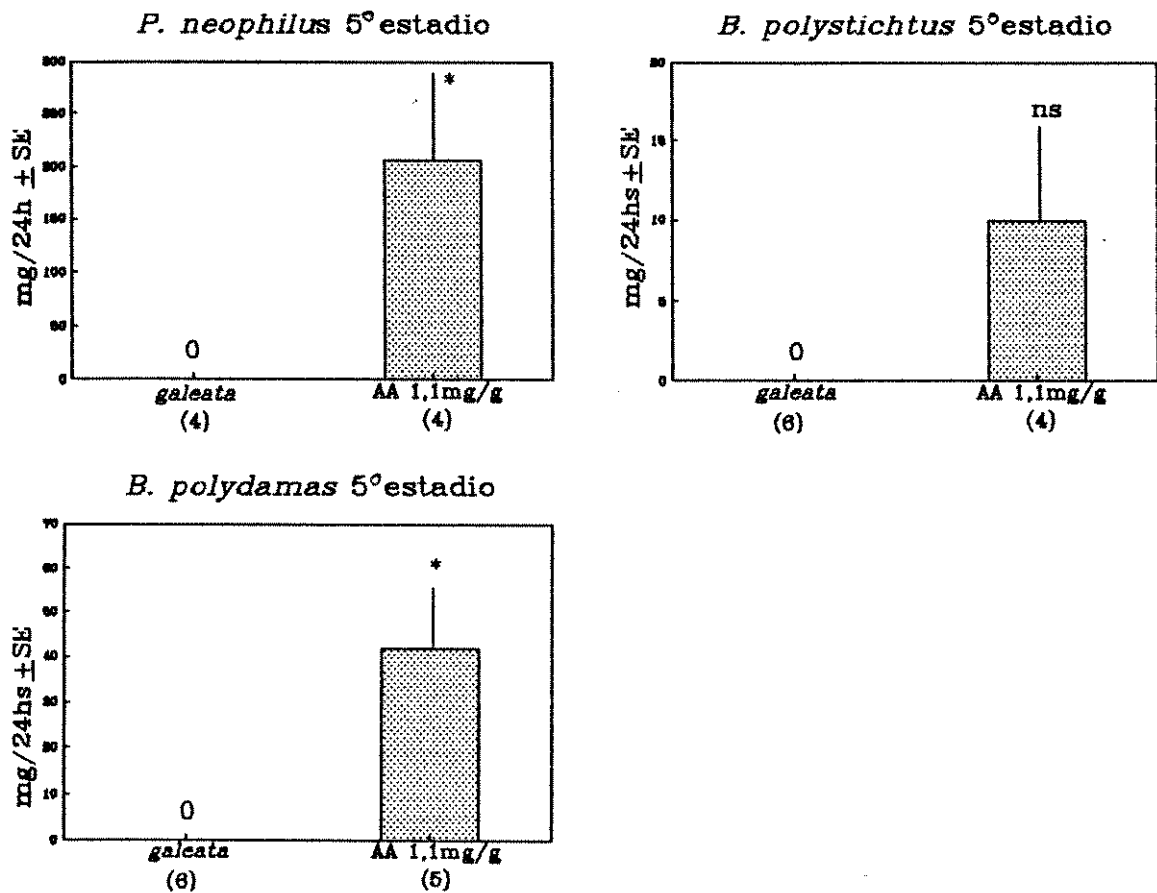


Figura 17: Efeito do ácido aristolóquico (AA) 1,1 mg/g no consumo (miligramas PS) de *A. galeata* por larvas de diferentes espécies de Troidini. Os números entre parênteses representam o número de indivíduos. Diferenças significativas pelo Teste de U de Mann-Whitney em relação ao controle: * $P < 0,05$ e ns não significativo.

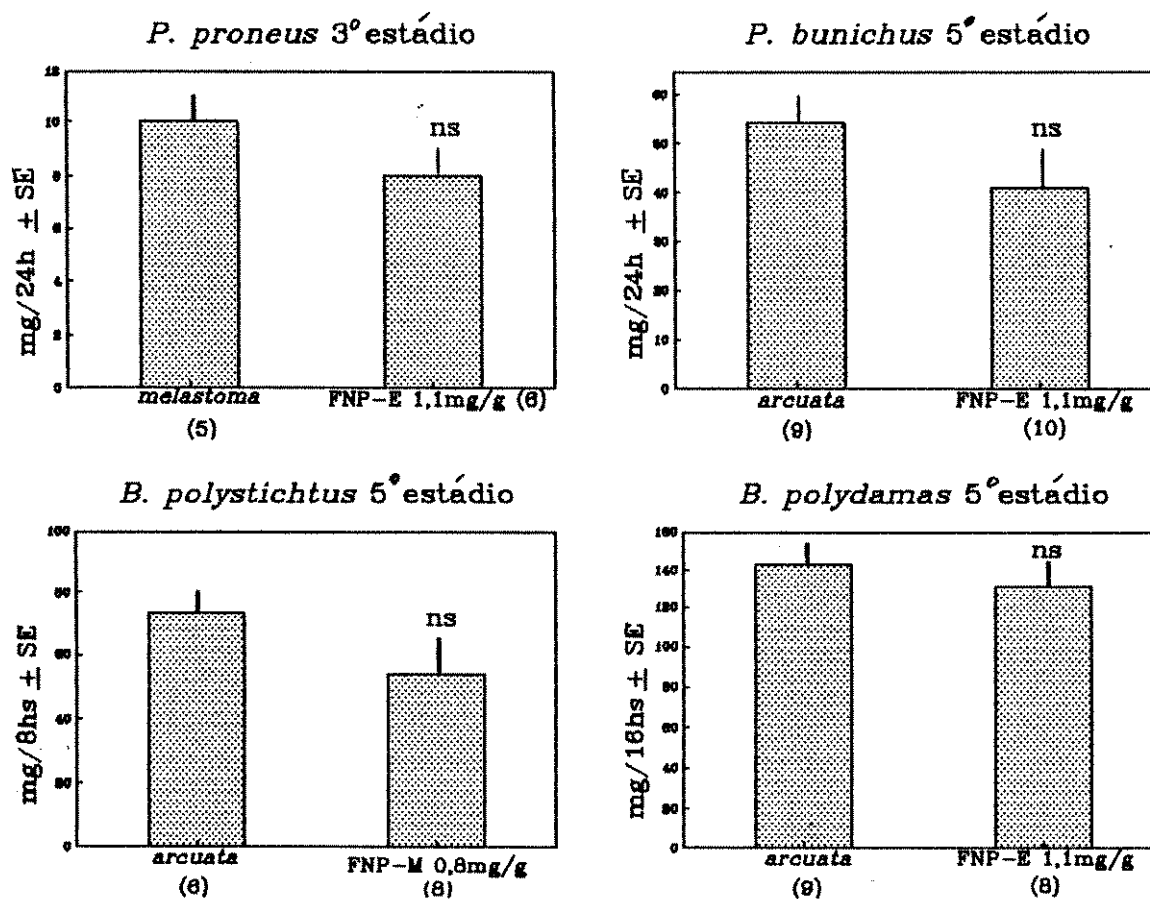


Figura 18: Efeito da fração neutra polar de *A. elegans* (FNP-E) 1,1 mg/g e de *A. macroura* (FNP-M) 0,8 mg/g no consumo (miligramas PS) de *Aristolochia* por larvas de diferentes espécies de Troidini. Os números entre parênteses representam o número de indivíduos. Não há diferenças significativas pelo Teste de U de Mann-Whitney em relação ao controle.

Tabela 10: Crescimento Relativo (CrR), Consumo Relativo (CR) e Eficiência de Conversão do Alimento Ingerido (ECI) de algumas espécies de Troidini em suas plantas hospedeiras com diferentes frações de *Aristolochia*

ESPECIE (DURACAO) ⁴	E ¹	P ²	EXPERIMENTO	N ³	CrR % ($\bar{X} \pm SE$)	CR ($\bar{X} \pm SE$)	ECI % ($\bar{X} \pm SE$)
<i>P. proneus</i> (24 horas)	3 ^o E	M	controle	5	13,4 ± 0,1	2,568 ± 0,074	51,9 ± 2,0
			FNP-E 1,1mg/g	6	8,9 ± 1,0 ns	1,719 ± 0,257 ns	55,6 ± 8,4 ns
	5 ^o E	M	controle	7	45,4 ± 8,4	0,819 ± 0,135	53,7 ± 8,2
			AL-G 5,5mg/g	7	9,1 ± 2,7 *	0,398 ± 0,064 *	24,7 ± 7,3 ns
<i>P. bunichus</i> (24 horas)	4 ^o E	A	controle	7	86,4 ± 7,1	1,951 ± 0,162	44,6 ± 2,7
			FNP-G 0,7mg/g	7	65,6 ± 13,3 ns	1,660 ± 0,291 ns	36,1 ± 7,8 ns
			AL-G 5,5mg/g	7	59,0 ± 7,3 ns	1,486 ± 0,224 ns	43,0 ± 5,8 ns
	5 ^o E	A	controle	6	32,0 ± 3,7	0,553 ± 0,083	61,0 ± 5,5
			AL-G 13,0mg/g	4	12,3 ± 3,5 **	0,239 ± 0,043 *	47,7 ± 11,7 ns
			controle	9	23,3 ± 3,4	0,568 ± 0,064	42,6 ± 6,1
			FNP-G 0,7mg/g	9	25,1 ± 5,0 ns	0,445 ± 0,063 *	54,6 ± 7,1 ns
			FNP-E 1,1mg/g	10	32,4 ± 4,3 ns	0,616 ± 0,085 ns	53,5 ± 2,7 ns
		G	controle	6	-7,0 ± 1,6	0,052 ± 0,042	-48,8 ± 42,4
			AA 0,4mg/g	5	-4,2 ± 1,8 ns	0,359 ± 0,151 ns	-42,0 ± 3,2 ns
		E	controle	6	5,0 ± 1,3	0,202 ± 0,017	24,9 ± 6,5
			AA 0,4mg/g	4	6,0 ± 1,4 ns	0,195 ± 0,033 ns	32,4 ± 8,4 ns
<i>P. neophilus</i> (24 horas)	5 ^o E	A	controle	4	25,6 ± 9,3	0,380 ± 0,114	67,6 ± 17,5
			FNP-G 0,7mg/g	4	23,4 ± 11,3 ns	0,438 ± 0,152 ns	47,6 ± 10,8 ns
			controle	4	41,3 ± 5,0	0,916 ± 0,101	44,9 ± 1,2
			AL-G 5,5mg/g	4	23,1 ± 6,2 ns	0,712 ± 0,122 ns	32,5 ± 7,6 ns
			controle	4	32,4 ± 4,0	1,289 ± 0,096	25,9 ± 4,5
			AL-G 13,0mg/g	4	13,2 ± 3,8 *	0,659 ± 0,159 *	20,0 ± 3,8 ns
			controle	4	13,4 ± 4,4	0,625 ± 0,060	20,6 ± 5,5
			AL-ES 13,0mg/g	5	-8,6 ± 6,1 *	0,222 ± 0,072 *	-100,9 ± 78,9 *
		G	controle	4	-4,7 ± 0,8	0	-----
			AA 0,4mg/g	4	-4,0 ± 1,5 ns	0,070 ± 0,014 *	-63,8 ± 23,4
			controle	4	-6,8 ± 0,7	0	-----
			AA 1,1mg/g	4	-9,5 ± 2,2 ns	0,726 ± 0,251 *	-8,9 ± 3,9
<i>B. polystichtus</i> (18 horas)	5 ^o E	T	controle	4	37,7 ± 5,3	1,409 ± 0,198	26,5 ± 0,4
			AL-ES 5,5mg/g	4	15,7 ± 2,7 *	0,540 ± 0,045 *	29,2 ± 0,9 ns
(24 horas)		G	controle	4	-10,4 ± 1,9	0	-----
			AA 1,1mg/g	4	-4,3 ± 2,7 ns	0,168 ± 0,098 ns	-6,5 ± 8,3 ns
<i>B. polydamas</i> (16 horas)	5 ^o E	A	controle	9	37,5 ± 4,4	0,733 ± 0,061	50,2 ± 2,6
			FNP-G 0,7mg/g	9	42,5 ± 5,3 ns	0,807 ± 0,067 ns	51,6 ± 3,1 ns
			controle	9	52,8 ± 3,6	1,006 ± 0,066	52,5 ± 3,3
			FNP-E 1,1mg/g	8	44,9 ± 3,1 ns	0,815 ± 0,033 *	54,9 ± 2,2 ns
(24 horas)			controle	6	39,5 ± 3,7	0,905 ± 0,045	41,5 ± 2,9
			AL-G 13,0mg/g	6	16,6 ± 8,0 **	0,547 ± 0,043 **	28,1 ± 15,6 ns
		G	controle	6	-8,0 ± 1,5	0	-----
			AA 1,1mg/g	5	-2,4 ± 6,0 ns	0,167 ± 0,068 *	-25,1 ± 31,5

1) E= estágio larval

2) P= planta de alimento

3) N= número de indivíduos

4) Duração do experimento

Aristolochia: A= *arcuata*, E= *elegans*, ES= *esperanzae*, G= *galeata*, M= *melastoma*, T= *triangularis*.

Compostos: AA= ácido aristolóquico, AL= ácidos labdanóicos, FNP= fração neutra polar.

Diferenças significativas pelo Teste de U de Mann-Whitney em relação ao controle: * = P<0,05; ** = P<0,01; ns= não significativo

4. Bioensaios com Papilio anchisiades

A Tabela 11 mostra o efeito de algumas frações de Aristolochia sobre o consumo, crescimento e eficiência de larvas de Papilio anchisiades. Surpreendentemente nenhuma fração testada apresentou atividade fago-inibidora. Na concentração de 5,5mg/g o AL-G aumentou significativamente a ECI em relação ao grupo controle. O ácido aristolóquico só apresentou efeito na concentração de 1,1mg/g reduzindo drasticamente o crescimento devido a uma diminuição significativa da ECI (efeito tóxico).

Este efeito do AA concorda com a idéia de barreiras alimentares através de compostos secundários, uma vez que estes compostos são considerados responsáveis, juntamente com alcalóides benzilisoquinolínicos, pela especificidade dos Papilionidae a suas plantas hospedeiras (Miller e Feeny, 1989). As larvas das diferentes espécies de Papilionidae estão adaptadas aos compostos das suas plantas de alimento. Desta maneira as espécies estariam mais restritas a espécies vegetais com compostos secundários semelhantes (Feeny, 1991). As larvas de Papilio anchisiades estão, portanto, adaptadas a compostos secundários de suas plantas hospedeiras (algumas espécies de Rutaceae), enquanto que os Troidini estão adaptados a compostos presentes em Aristolochiaceae.

Tabela 11: Consumo (mg)(C), Crescimento relativo (CrR), Consumo Relativo (CR) e Eficiência de Conversão do Alimento Ingerido (ECI) de larvas de *Papilio anchisiades* em *Esenbeckia leocarpa* com diferentes frações de *Aristolochia* (24 horas de experimento)

	N ¹	C (mg) ($\bar{X} \pm SE$)	CrR % ($\bar{X} \pm SE$)	CR ($\bar{X} \pm SE$)	ECI % ($\bar{X} \pm SE$)
<u>4^o estágio</u>					
controle	5	59 ± 6	49,2 ± 8,6	1,353 ± 0,210	36,9 ± 4,4
AA 0,4mg/g	6	45 ± 5 ns	48,2 ± 5,9 ns	1,199 ± 0,149 ns	40,6 ± 2,2 ns
FNP de <i>A. galeata</i> 0,7mg/g	6	44 ± 6 ns	42,7 ± 4,4 ns	0,898 ± 0,074 ns	49,5 ± 7,3 ns
AL de <i>A. galeata</i> 5,5mg/g	7	40 ± 4 ns	63,9 ± 7,8 ns	1,008 ± 0,154 ns	68,5 ± 6,3 ‡
<u>4^o estágio</u>					
controle	6	58 ± 7	35,7 ± 4,6	0,692 ± 0,064	51,2 ± 2,9
AL de <i>A. galeata</i> 13mg/g	6	61 ± 8 ns	35,6 ± 7,9 ns	0,753 ± 0,130 ns	49,4 ± 9,8 ns
<u>5^o estágio</u>					
controle	5	97 ± 21	34,4 ± 7,6	0,687 ± 0,127	49,9 ± 5,8
AA 1,1mg/g	6	97 ± 19 ns	1,7 ± 10,6 ‡	0,544 ± 0,078 ns	-13,8 ± 26,1 ‡

1) N= número de indivíduos

AA= ácido aristolóquico

FNP= fração neutra polar

AL= fração de ácidos labdanóicos

Diferenças significativas pelo Teste de U de Mann-Whitney em relação ao controle

‡ = P < 0,05

ns= não significativo

IV. CONCLUSÕES

1) A análise química de folhas de 11 espécies de Aristolochia permite a separação em três grupos baseados na presença ou ausência de ácidos aristolóquicos (AAs) e ácidos labdanóicos (ALs). O grupo I (A. sessilifolia, A. melastoma, A. rumicifolia, A. arcuata, A. macroura e A. triangularis) tem AAs mas não ALs. Nas espécies do grupo II (A. odora e A. elegans) faltam AAs e ALs. No grupo III (A. esperanzae, A. cymbifera e A. galeata) há ALs mas não AAs nas folhas. Neste grupo os AAs estão presentes nos ramos, flores e raízes, mas os ALs não foram detectados nos ramos e flores. Todas as espécies analisadas apresentaram quantidades relativamente grandes de precipitáveis com reagente de Mayers.

2) A análise química de 17 espécies de Troidini mostrou a existência de AAs em todas as espécies em concentrações muito variáveis, mas inferiores às relatadas na literatura para outras espécies que se alimentam de Aristolochia. Acredita-se que os Troidini sequestram os AAs das plantas hospedeiras. Larvas de B. polydamae criadas em folhas de A. galeata (sem AAs), entretanto, ainda apresentaram AAs nas mesmas concentrações que indivíduos criados em espécies de Aristolochia com AAs, indicando a possibilidade de síntese destes compostos pelas larvas. Além de AAs, todas as espécies analisadas apresentaram quantias muito maiores de alcálóides, que também podem ter um papel na defesa destes organismos contra predadores, bem como precursores para síntese de AAs.

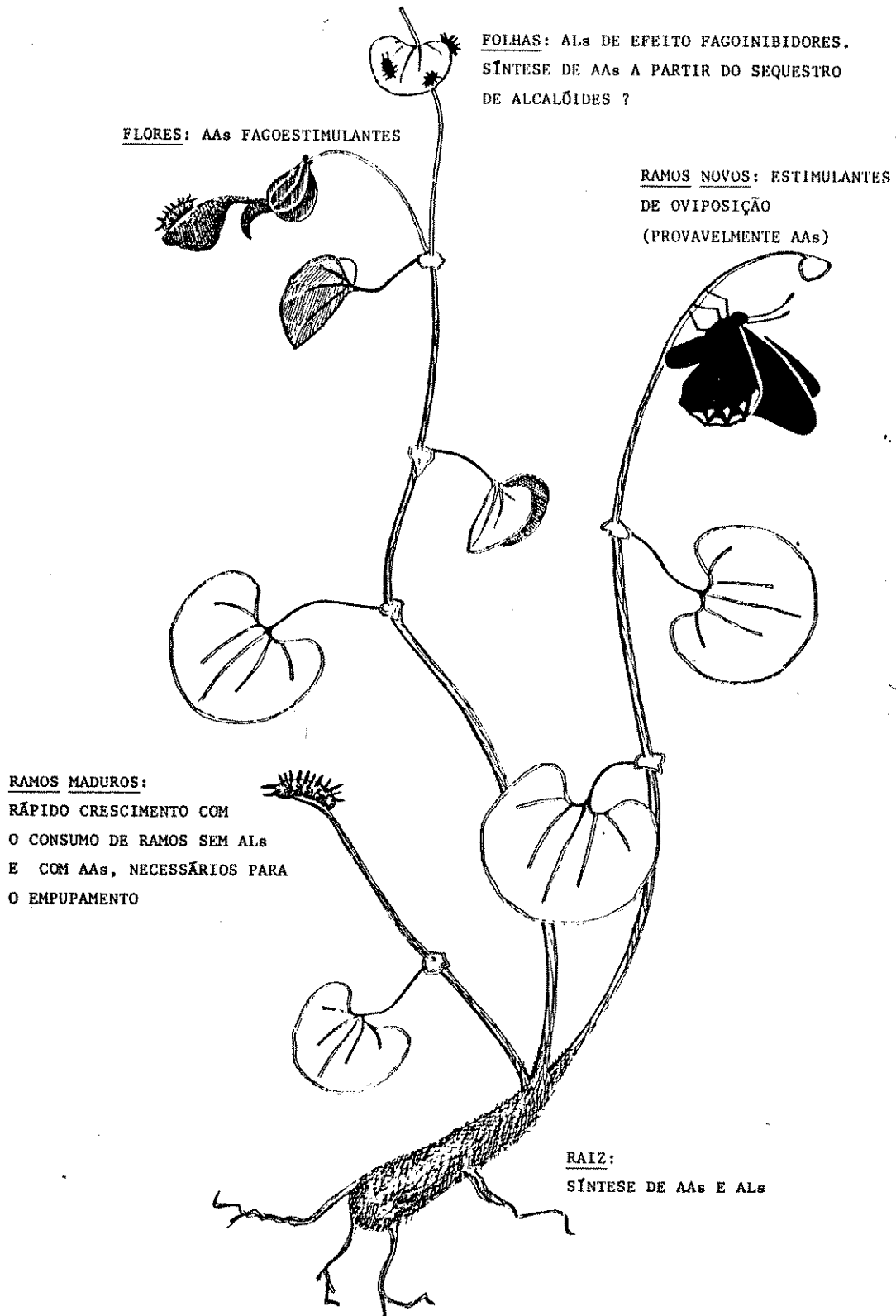


FIGURA 19: Mediações químicas da interface Troidini/Aristolochia.
Exemplo com B. polydamas e A. galeata. AAs= ácidos aristolóquicos,
ALs= ácidos labdanóicos.

3) A criação de diversas espécies de Troidini em diferentes espécies de Aristolochia mostrou um melhor desenvolvimento e sobrevivência em A. melastoma e A. arcuata. Somente espécies mais polífagas como P. neophilus e B. polydamas conseguiram se alimentar das Aristolochia do Grupo III. Apesar de B. polydamas sobreviver em A. galeata é necessário a ingestão de AAs para o total desenvolvimento. A. elegans, A. macroura e A. esperanzae diminuíram a ECI das larvas de algumas espécies de Troidini, indicando a existência de compostos tóxicos. Os ALs de A. esperanzae e de A. galeata apresentaram efeitos fagoinibidores nas espécies testadas sendo que larvas de P. neophilus e B. polydamas mostraram-se mais tolerantes a estes compostos. A fração neutra polar de galeata mostrou efeito fagoinibidor em larvas de P. bunichus e B. polystichtus, que são espécies oligófagas. Os AAs estimularam o consumo de larvas de P. neophilus e B. polydamas. Estes resultados evidenciam diferentes aspectos de mediação química na interface Troidini/Aristolochia (veja Figura 19).

4) Larvas de Papilio anchisiades tiveram sua eficiência (ECI) muito diminuída com 1,1mg/g de AA, indicando um efeito tóxico deste composto. Este resultado reforça a hipótese de compostos secundários mediando a especificidade dos Papilionidae à suas plantas hospedeiras. Inexplicavelmente os ALs tiveram um efeito de aumentar a ECI quando aplicados em concentração relativamente baixa.

5) Os resultados deste trabalho somados às informações disponíveis na literatura permitem reformular a hipótese de coevolução sequencial entre Troidini/Aristolochia proposta por Brown et al. (1991). Podemos supor que a presença de AAs é um estágio primitivo do caráter, uma vez que todos os gêneros de Aristolochiaceae apresentam estes compostos. Zerynthiini e parte dos Parnassiini (tribos mais primitivas que Troidini) alimentam-se de Aristolochiaceae primitivas acumulando AAs de suas plantas hospedeiras. A espécie mais primitiva analisada (A. sessilifolia) apresenta AAs, e Euryades corethrus (a espécie mais primitiva de Troidini analisada neste trabalho), que utiliza A. sessilifolia, sequestra estes compostos. A pressão dos Troidini que utilizam os AAs como sinais químicos para o reconhecimento da planta hospedeira pela fêmea e pelas larvas pode ter levado a progressiva perda destes compostos nas folhas (espécies do grupo II). Com isto espécies adaptadas a esta ausência teriam que biossintetizar estes compostos à partir de precursores da planta hospedeira (como alcalóides) para defesa contra predadores. Outro passo seria a produção de outros compostos de defesa pelas Aristolochia. Espécies mais derivadas (grupo III) sintetizam ALs como defesa contra os fitófagos. Algumas espécies conseguem tolerar estes compostos, mas apresentam um desenvolvimento lento nestas plantas, devendo ingerir AAs existentes em outros tecidos vegetais para completar o desenvolvimento, característica existente já nos Troidini que se alimentam das espécies do grupo II. A vantagem da utilização destas espécies, apesar da possibilidade de uso das Aristolochia mais primitivas, poderia ser o escape de inimigos naturais (como

parasitóides) que não reconheceriam estas espécies como hospedeiras. A Figura 20 representa um resumo desta hipótese de coevolução.

6) Para testar esta e outras hipóteses de coevolução nas interações inseto/planta mediadas por compostos secundários deveria-se utilizar hipóteses filogenéticas dos fitófagos e das plantas hospedeiras acrescentadas ao conhecimento ecológico. Com o conhecimento da especificidade de cada fitófago, através da criação em diferentes plantas hospedeiras e de registros de campo, pode-se verificar se as filogenias propostas dos dois grupos (Figura 19) apresentam uma sequência de relações entre taxa mais primitivos dos dois lados até taxa mais derivados de fitófagos utilizando taxa mais derivados de plantas hospedeiras, o que poderia indicar coevolução por cladogênese paralela. Os conhecimentos de ecologia química esclareceriam as bases da especificidade dos fitófagos e poderiam auxiliar quando existem evidências de evolução por colonização de uma nova planta hospedeira.

Desta maneira a hipótese aqui sugerida só terá mais evidências científicas com um maior acúmulo de informações a respeito da ecologia química da interação Troidini/Aristolochia e de hipóteses de relacionamento filogenético dos fitófagos e de suas plantas hospedeiras.

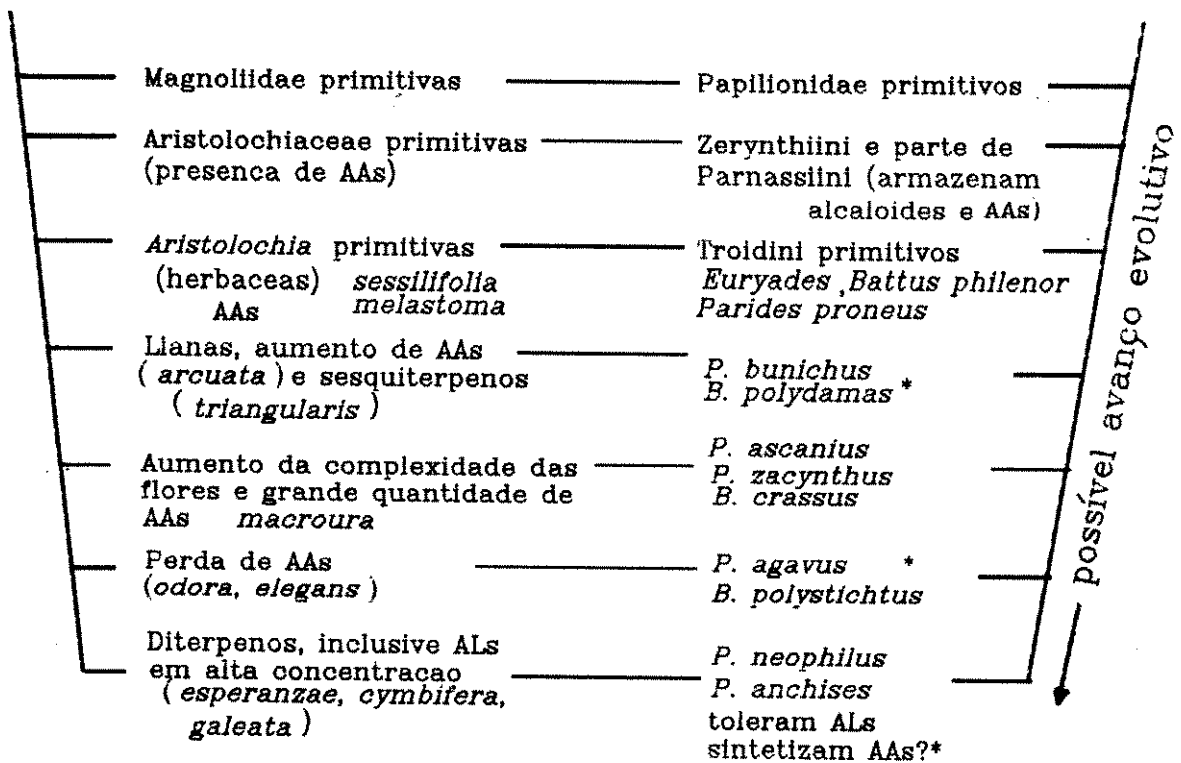


Figura 20: Hipótese de coevolução sequencial para a interação Troidini/Aristolochia (baseada nos resultados deste trabalho e de Brown *et al.* 1991a).

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benson WW, Brown Jr KS, Gilbert LE (1975) Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. *Evolution* 29: 659-680
- Bowers MD (1990) Recycling plant natural products for insect defense. Pp 355-386 in Evans DL & Schmidt JO (eds) *Insect Defenses: Adaptative Mechanisms and Strategies of Prey and Predators*. Albany: SUNY Press
- Brower LP (1984) Chemical defense in butterflies. Pp 109-134 in Vane-Wright RI & Ackery PR (eds) *The Biology of Butterflies*. London: Academic Press
- Brower LP, Brower JVZ (1964) Birds, butterflies, and plant poisons: a study in ecological chemistry. *Zoologica* 49: 137-159
- Brown Jr KS (1987) Chemistry at the Solanaceae/Ithomiinae interface. *Ann Missouri Bot Gard* 74: 359-397
- Brown Jr KS, Damman AJ, Feeny P (1981) Troidine swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae) in southeastern Brazil: natural history and foodplant relationships. *J Res Lepid* 19: 199-226
- Brown Jr KS, Djerassi C (1964) Alkaloid Studies XLVI. The alkaloids of *Aspidosperma obscurinervium* Azembuja: a new class of heptacyclic indole alkaloids. *J Am Chem Soc* 64: 2451-2463
- Brown Jr KS, Trigo JR, Francini RB, Morais ABB, Motta PC (1991a) Aposematic insects on toxic host plants: coevolutionary patterns at a chemically unstable interface. Pp 375-402 in Price PW, Lewinsohn TM, Fernandes GW & Benson WW (eds)

- Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Brown Jr KS, Klitzke CF, Berlingeri C, Santos FER (1991b) Chemical ecology of larval hostplants of neotropical swallowtails. In Abstracts of the VIII Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology. Dijon: France
- Brown Jr KS, Klitzke CF, Berlingeri C, Santos FER (no prelo 1992) Neotropical swallowtails: chemistry of food plant relationships, population ecology and biosystematics. In Scriber Jm, Tsubaki Y & Lederhouse RC (eds) Swallowtail Butterflies: their Ecology and Evolution. Ithaca: Cornell University Press
- Chai F (1986) Field observations and feeding experiments on the responses of rufous-tailed jacamars (*Galbula ruficauda*) to free-flying butterflies in a tropical rain forest. *Biol J Linn Soc* 29: 161-189
- Chen ZL, Zhu DY (1987) *Aristolochia* alkaloids. Pp 29-65 in Brossi A (ed) *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* vol 31. New York: Academic Press
- Chew FS, Robbins RK (1984) Egg-laying in butterflies. Pp 65-79 in Vane-Wright RI & Ackery PR (eds) *The Biology of Butterflies*. London: Academic Press
- Conover WJ (1980) *Practical Nonparametric Statistics*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Cortes D, Dadoun H, Ribeiro Paiva RL, De Oliveira AB (1987) Nouveaux alcaloides bisbenzylisoquinoleiques isolés des feuilles de *Aristolochia gigantea*. *J Nat Prod* 50: 910-914

- Ehrlich FR, Raven PH (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608
- El-Sebakhy N, Waterman PG (1984) (-)-(R,R')-7'-O-Methyl-cuspidaline from the leaves of *Aristolochia elegans*. *Phytochem* 23: 2706-2707
- Feeny P (1991) Chemical constraints on the evolution of swallowtail butterflies. Pp 315-340 in Price FW, Lewinsohn TM, Fernandes GW & Benson WW (eds) Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Futuyma DJ (1983) Evolutionary interactions among herbivorous insects and plants. Pp 207-231 in Futuyma DJ, Slatkin M (eds) Coevolution. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Futuyma DJ, Slatkin M (eds) (1983) Coevolution. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Habib AMM, El-Sebakhy N (1981) Ent-kaurane-16,17-diol and (-)-cubebin as natural products from *Aristolochia elegans*. *Pharmazie* 36: 291-294
- Hoehne FC (1942) Aristolochiaceas. *Flora Brasiliica* 25: 1-141
- Hoehne FC (1947) Novas espécies e contribuições para o conhecimento do gênero *Aristolochia* na América do Sul. *Arq Bot Est São Paulo* 2: 95-103
- Janzen DH (1980) When is it coevolution? *Evolution* 34: 611-612
- Lopes LMX, Bolzani VS (1988) Lignans and diterpenes of three *Aristolochia* species. *Phytochem* 27: 2265-2268
- Lopes LMX, Bolzani VS, Trevisan LMV (1987) Clerodane diterpenes from *Aristolochia* species. *Phytochem* 26: 2781-2784

- Mabry TJ, Gill JE (1979) Sesquiterpene lactones and other terpenoids. Pp 501-537 in Rosenthal GA, Janzen DH (eds) *Hervivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. New York: Academic Press, Inc.
- Mayer R, Weiming C, Gullmann A, Will G, Rucker G (1989) Manshurolide from *Aristolochia manshuriensis*. *Planta Medica* 55: 641
- Miller JS (1987) Host-plant relationships in the Papilionidae (Lepidoptera): parallel cladogenesis or colonization? *Cladistics* 3: 105-120
- Miller JS, Feeny P (1989) Interspecific differences among swallowtail larvae (Lepidoptera: Papilionidae) in susceptibility to aristolochic acids and berberine. *Ecol Entom* 14: 287-296
- Mitter C, Brooks DR (1983) Phylogenetic aspects of coevolution. Pp 65-98 in Futuyma DJ, Slatkin M (eds) *Coevolution*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Mix DB, Guinaudeau H, Shamma M (1982) The aristolochic acids and aristolactams. *J Nat Prod* 45: 657-666
- Morais ABB, Brown Jr KS (no prelo 1992) Environmental factors affecting troidine guilds (Papilionidae) in southeastern Brazil. *J Res Lepid*
- Munavalli S, Viel C (1969a) Etude chimique, taxinomique et pharmacologique des Aristolochiacées I. *Ann Pharm Fran* 27: 449-464
- Munavalli S, Viel C (1969b) Etude chimique, taxinomique et pharmacologique des Aristolochiacées II. *Ann Pharm Fran* 27: 519-533

- Munavalli S, Viel C (1969c) Etude chimique, taxinomique et pharmacologique des Aristolochiacées III. *Ann Pharm Fran* 27: 601-614
- Nahrstedt A (1989) The significance of secondary metabolites for interactions between plants and insects. *Planta Medica* 55: 333-338
- Nishida R, Fukami H (1989a) Ecological adaptation of an Aristolochiaceae-feeding swallowtail butterfly, *Atrophaneura alcinous*, to aristolochic acids. *J Chem Ecol* 15: 2549-2563
- Nishida R, Fukami H (1989b) Oviposition stimulants of an Aristolochiaceae-feeding swallowtail butterfly, *Atrophaneura alcinous*. *J Chem Ecol* 15: 2565-2575
- Odendaal FJ, Rausher MD, Benrey B, Nunez-Farfan J (1987) Predation by *Anolis* lizards on *Battus philenor* raises question about butterfly mimicry systems. *J Lepid Soc* 41: 141-144
- Otero LS, Brown Jr KS (1986) Biology and ecology of *Parides ascanius* (Cramer, 1775) (Lep., Papilionidae), a primitive butterfly threatened with extinction. *Atala* 10/12: 2-16
- Pfeifer HW (1966) Revision of the north and central american hexandrous species of *Aristolochia* (Aristolochiaceae). *Ann Missouri Bot Gard* 53: 115-196
- Rausher MD (1981) Hostplant selection by *Battus philenor*: the roles of predation, nutrition and plant chemistry. *Ecol Monogr* 51: 1-20
- Rothschild M (1973) Secondary plant substances and warning colouration in insects. Pp 59-83 in van Emden HF (ed) *Insect/Plant Relationships*. London: Symp R Ent Soc

- Rothschild M, Reichstein T, von Euw J, Aplin R, Harman RRM (1970) Toxic Lepidoptera. *Toxicon* 8: 93-299
- Rucker G, Langmann B, Siqueira NS (1981) Inhaltsstoffe von *Aristolochia triangularis*. *Planta Medica* 41: 143-149
- Scriber JM (1986) Origins of the regional feeding abilities in the tiger swallowtail butterfly: ecological monophagy and the *Papilio glaucus australis* subspecies in Florida. *Oecologia* 71: 94-103
- Seigler DS (1979) Toxic seed lipids. Pp 449-470 in Rosenthal GA, Janzen DH (eds) *Hervivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. New York: Academic Press, Inc.
- Spencer KC (1988) Chemical mediation of coevolution in the *Passiflora-Heliconius* interaction. Pp 167-240 in Spencer KC (ed) *Chemical mediation of coevolution*. San Diego: Academic Press, Inc.
- Urzúa A, Priestap H (1985) Aristolochic acids from *Battus polydamas*. *Biochem Syst Ecol* 13: 169-170
- Urzúa A, Rodriguez R, Cassels BK (1987) Fate of ingested aristolochic acids in *Battus archidamas*. *Biochem Syst Ecol* 15: 687-689
- Urzúa A, Salgado G, Cassels BK, Eckhardt G (1983) Aristolochic acids in *Aristolochia chilensis* and the *Aristolochia*-feeder *Battus archidamas*. *Coll Czech Chem Commun* 48: 1513-1519
- von Euw J, Reichstein T, Rothschild (1968) Aristolochic acid-I in the swallowtail butterfly *Pachlioptera aristolochiae* (Fabr.) (Papilionidae). *Isr J Chem* 6: 659-670
- Waldbauer GP (1968) The consumption and utilization of food by insects. *Adv Insect Physiol* 5: 229-288

Zar JH (1984) Biostatistical Analysis. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, Inc.

APENDICE I

Peso das frações (em miligramas) das extracções de diferentes espécies de Aristolochia (para 160 gramas de material fresco).

Espécie	Coleta ¹	Parte do vegetal	H ₂ O	Neutra apolar	Acida apolar	Fenol apolar	Neutra polar	Acida polar	Fenol polar	Prec. alc. ²
<u>A. sessilifolia</u>	02X90 VM	folhas	78	3493	91	16	107	80	37	282
<u>A. melastoma</u>	20V190 CA	folhas	78	2678	30	13	55	63	15	170
<u>A. rumicifolia</u>	01X90 BU	folhas	78	3614	25	13	279	38	35	485
<u>A. odora</u>	03X90 BS	folhas	78	3229	23	16	106	10	18	239
<u>A. arcuata</u>	05V190 CA	folhas	75	3833	18	21	44	41	07	274
<u>A. macroura</u>	18IV90 CA	folhas	72	3187	47	18	59	67	07	-
	03I91 CA	folhas		1078	39	14	130	59	13	258
<u>A. triangularis</u>	08V90 SJ	folhas	75	1131	20	11	38	29	09	788
	24VII191 IA	folhas		1367	48	95	69	63	32	-
<u>A. elegans</u>	04X90 RD	folhas	75	3239	25	08	175	16	11	69
<u>A. esperanzae</u>	09I91 UR	folhas	75	5015	1315	291	132	136	24	-
		flores	92	480	363	73	102	58	01	-
	30III191 MO	folhas		5113	739	1329	273	88	145	448
		flores		530	80	63	28	45	28	138
<u>A. cymbifera</u>	04X90 RD	folhas	75	4628	529	595	172	47	60	189
	10X190 IT	folhas		4575	785	2610	250	100	65	185
		flores	92	805	55	34	73	18	11	205
<u>A. galeata</u>	16V90 SJ	folhas	75	4864	275	4608	135	68	39	36
	13VI90 CA	folhas		8468	667	1500	82	26	79	259
	31I91 SJ	folhas		5854	787	1065	284	112	90	52
		ramos	68	581	74	53	41	18	18	205
		flores	92	920	48	28	60	12	02	90
		pecíolos	83	751	80	172	61	18	12	67
		raízes	43	754	69	761	64	19	11	459
	24VII191 IA	folhas		3699	134	1805	160	83	96	-

1) Data, local de coleta: BU= Burarama, ES; BS= Barra de São João, RJ; CA= Campinas, SP; IA= Itirapua, SP; IT= Itatiaia, RJ; MD= Morraria Grande, MS; RD= Rio Dourado, RJ; SJ= Serra do Japi, Jundiaí, SP; UR= Urucum, MS; VM= Viçosa, RS.

2) Precipitado alcaloidal com Reagente de Mayer.

APÊNDICE II

Cromatografia em camada fina de algumas frações de Aristolochia

AA= padrão de ácido aristolôquico

Folhas de: ME= A. melastoma, AR= A. arcuata, TR= A. triangularis, MA= A. macroura

ES= A. esperanzae, GA= A. galeata, SE= A. sessilifolia, RU= A. rumicifolia,

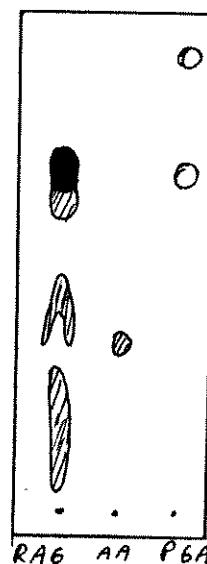
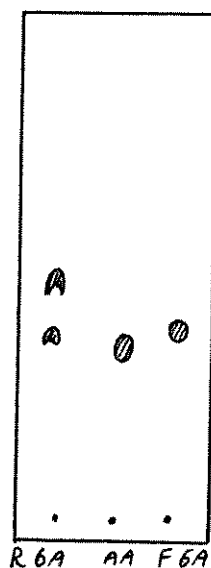
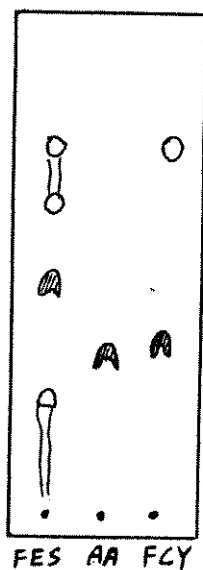
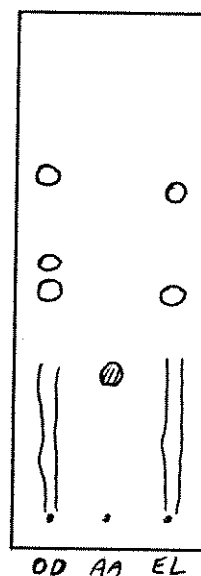
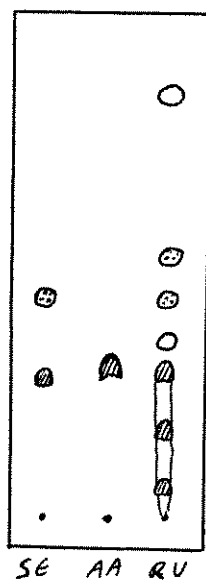
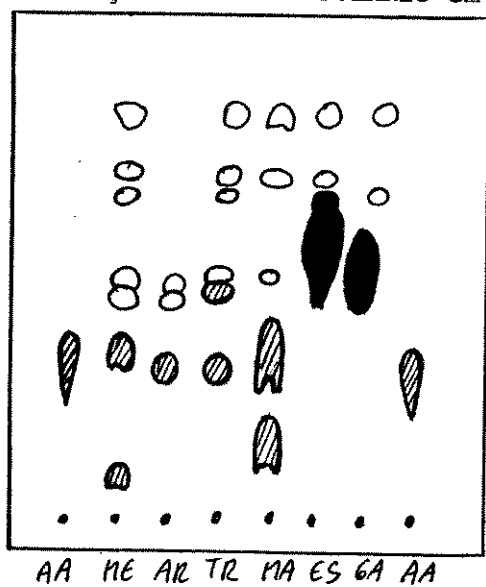
OD= A. odora, EL= A. elegans. Flores: FES= esperanzae, FCY= cymbifera.

PGA= pecíolos de galeata, RAG= raiz de galeata, RGA= ramos de galeata.

▨ marron no UV e amarelo no visível, □ violeta no UV, ~~▨~~ amarelo no UV

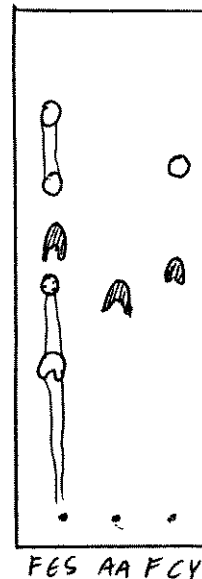
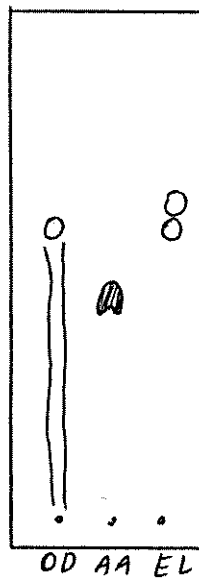
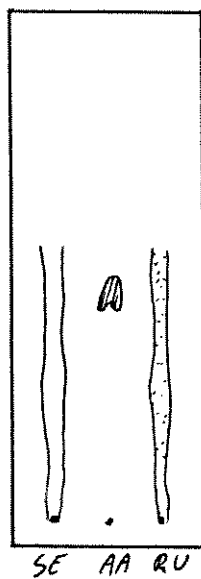
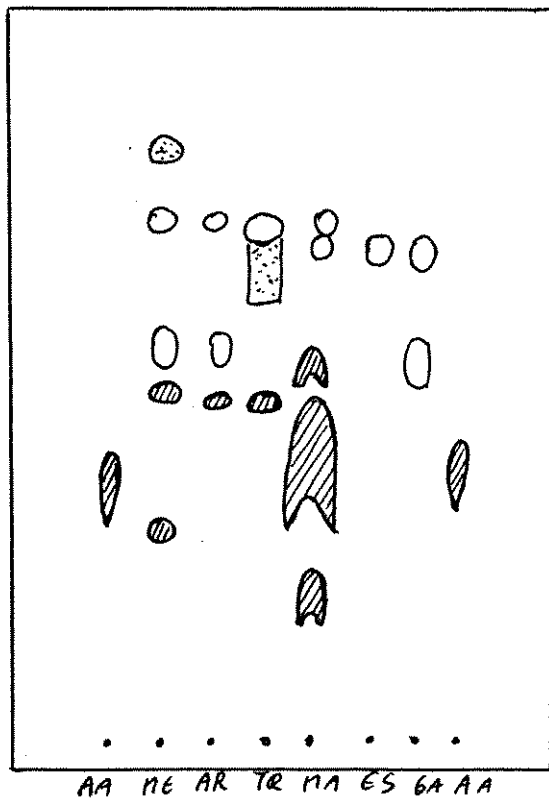
■ visualização somente com sulfato cérico.

FRAÇÕES ÁCIDAS APOLARES em CHCl_3 -MeOH 9:1

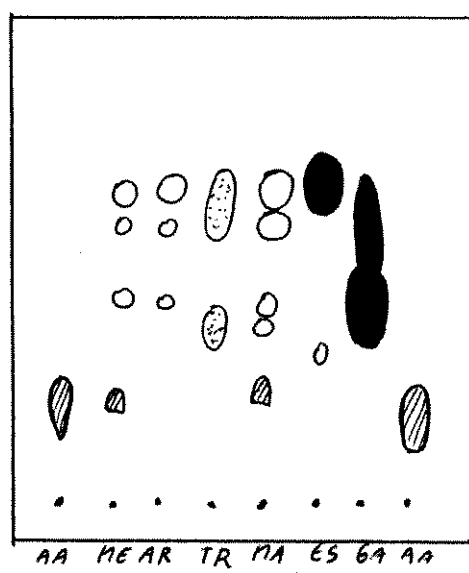
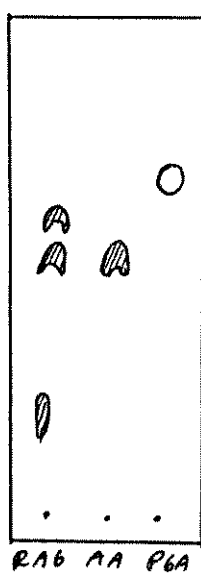
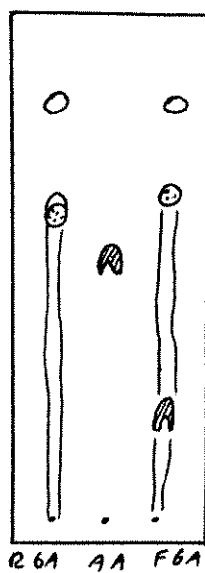


continuação

FRAÇÕES ÁCIDAS POLARES em CHCl_3 -MeOH 8:2

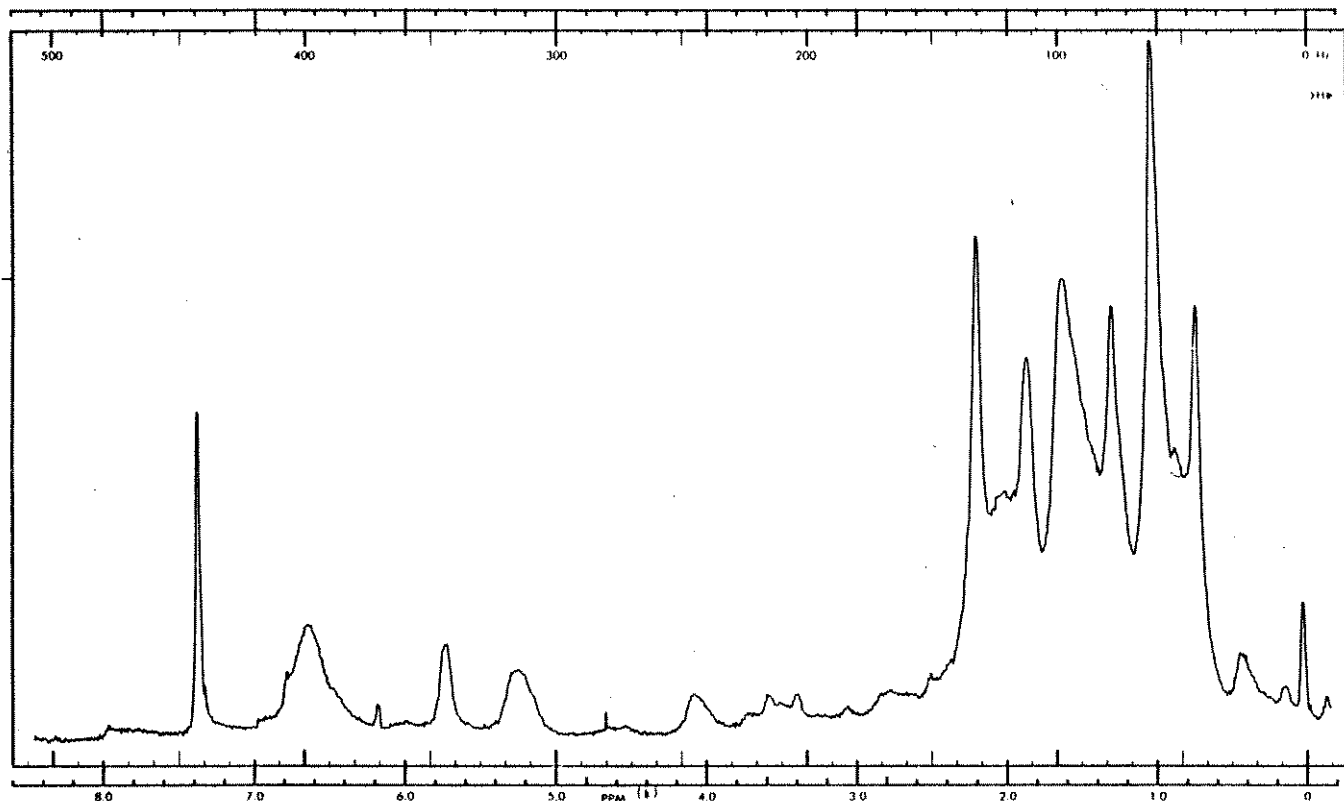


FRAÇÕES FENÓLICAS APOLARES em CHCl_3 -MeOH 95:5



APÊNDICE III

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (60MHz) de algumas frações ácidas apolares de folhas de algumas espécies de Aristolochia



SWEEP OFFSET (Hz): -
 SPECTRUM AMPLITUDE: 46
 INTEGRAL AMPLITUDE: 36
 SPINNING RATE (RPS): 36

MANUAL
 SWEEP TIME (SEC): 150
 SWEEP WIDTH (Hz): 25
 FILTER: 1:1:1:1:1:1:1:1
 RF POWER LEVEL: 0.05

AUTO 1
 (250)
 (500)
 (2)
 (.05)

SAMPLE: Ácidos Totais (apolares)
 de A. *esperanzae* - Urucum
 SOLENT: CCl_4

REMARKS:



STONER ISOTOPE CHEMICALS
 40 JONES RD. WALTHAM, MASS. 02154, U.S.A.
 CH. BUCHSBERG, CH 2004, BERNE, SWITZERLAND
 P.O. BOX 1134, MONTREAL 101, CANADA

DATE: 16/1/71
 PRINTED IN U.S.A.

OPERATOR K. Brown

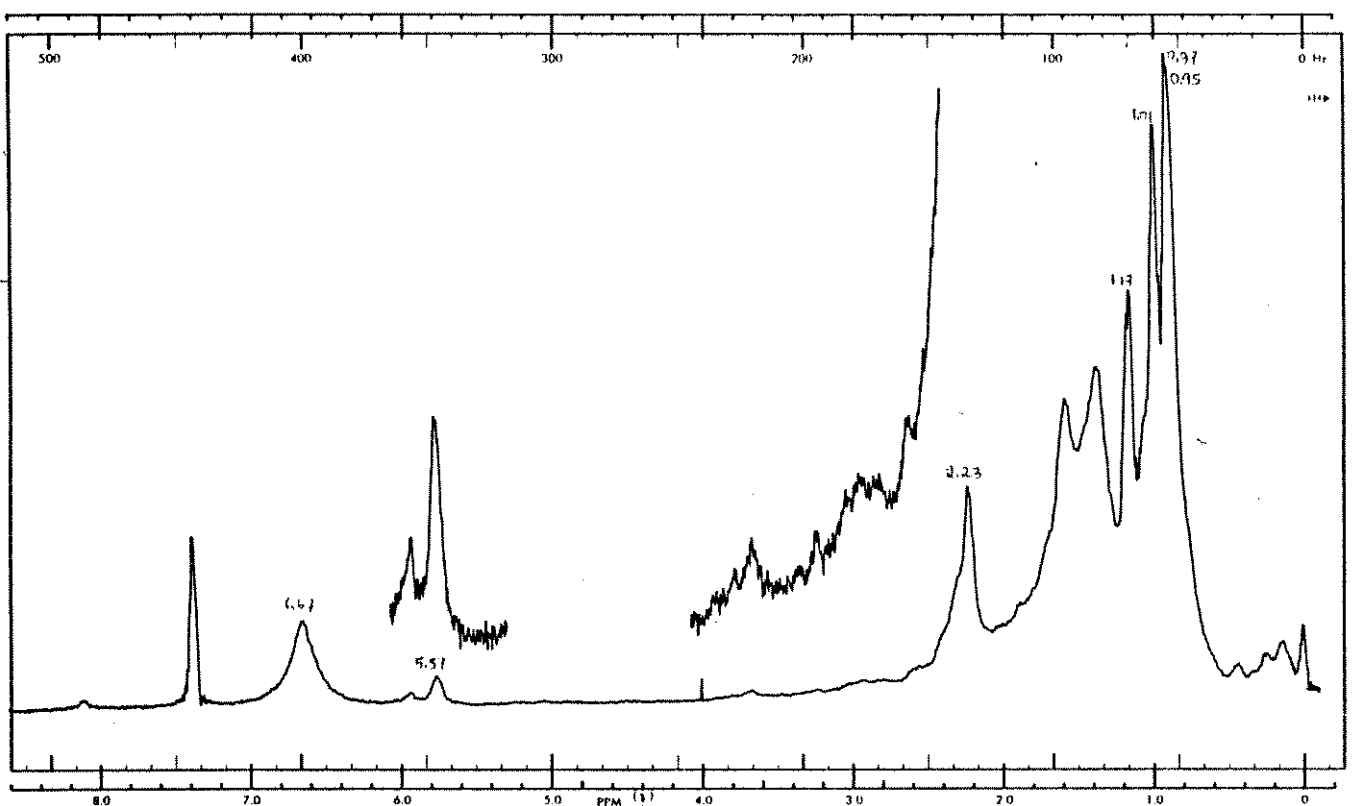
60 MHz NMR
 SPECTRUM NO.

PA 24

CHART S-60T

A. *esperanzae*

continuação



SWEEP OFFSET (Hz): 0
 SPECTRUM AMPLITUDE: 6,340
 INTEGRAL AMPLITUDE:
 SPINNING RATE (RPS): 20

MANUAL
 SWEEP TIME (SEC): 10
 SWEEP WIDTH (Hz): 75
 FILTER: 1000
 RF POWER LEVEL: 0.95

AUTO 1
 (250)
 (500)
 (1 2)
 (1 05)

SAMPLE: *Hydrolyzed ...*
 (optimal) *A. galeata*
 0.1%
 SOLVENT: *CDCl₃*

REMARKS: *60 MHz NMR spectrum of ... + 2,2,2-trifluoroethanol (30%)*
10/10/90

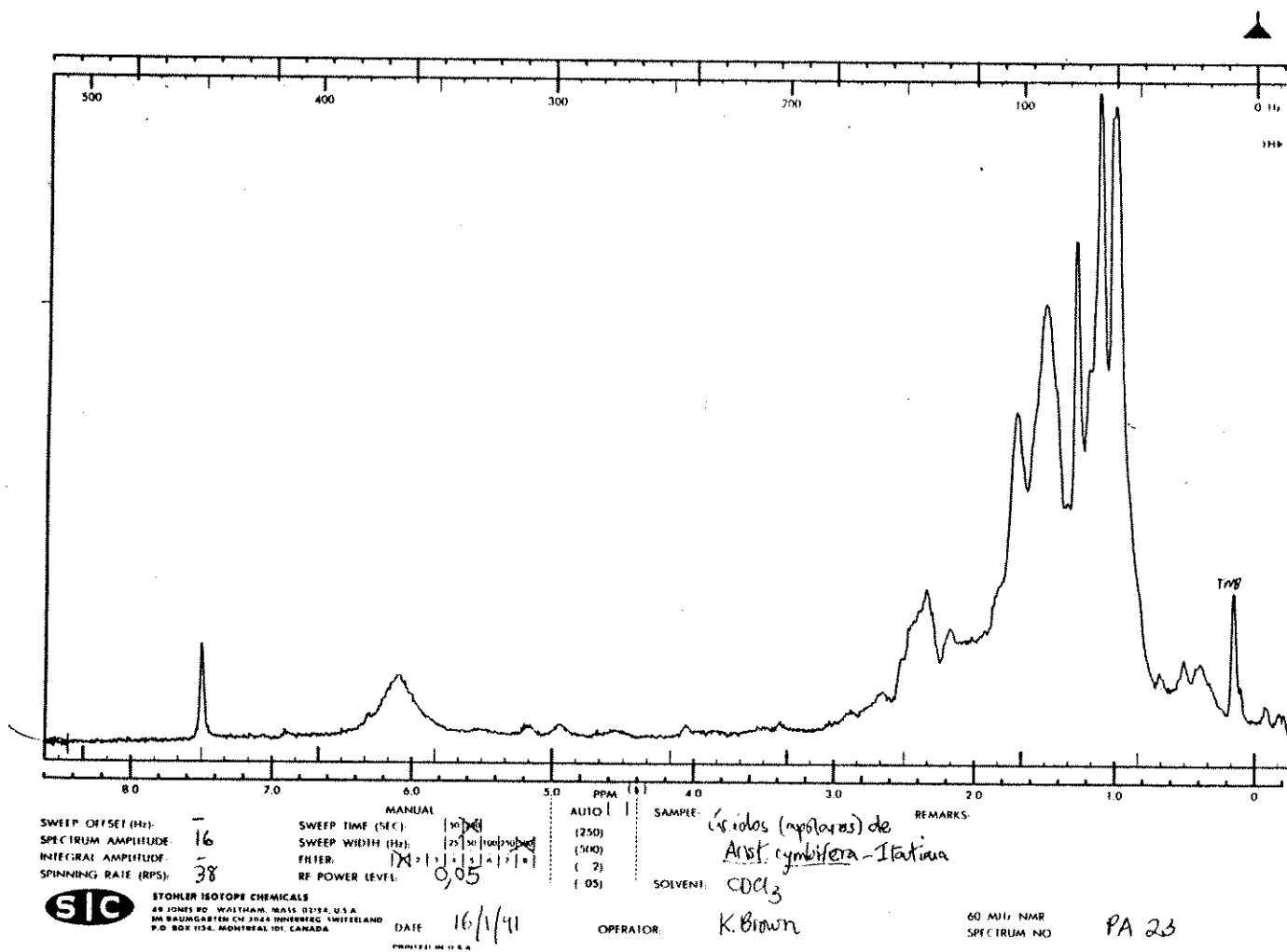
SIC STOHLER ISOTOPE CHEMICALS
 49 JONES RD. WALTHAM, MASS 02154, U.S.A.
 300 RÄDINGSGÄSSCHEN CH 2004 INNERSBERG, SWITZERLAND
 P.O. BOX 1134, MONTREAL 101, CANADA

DATE: 15/8/90
 OPERATOR: K. Brown
 60 MHz NMR SPECTRUM NO: 1210

PRINTED IN U.S.A.
 CHART 5-60T

A. galeata

continuação

A. cymbifera