

# RAPD-PCR na identificação molecular de plantas medicinais regulamentadas pelo Sistema Único de Saúde do Brasil

## RAPD-PCR in molecular identification of medicinal plants regulated by the Unified Health System in Brazil

### RESUMO

José Luiz Neves Aguiar<sup>1,\*</sup>

André Luiz Mazzei Albert<sup>1</sup>

Josino Costa Moreira<sup>II</sup>

Paola Cardarelli Leite<sup>1</sup>

O desenvolvimento de metodologia altamente discriminatória para a identificação e caracterização de genótipos das espécies de plantas medicinais regulamentadas pelo sistema público de saúde brasileiro (SUS) é de suma importância para o controle de qualidade destas espécies como matérias-primas na produção de medicamentos fitoterápicos, consequentemente, minimizar o risco sanitário associado à ineficácia terapêutica devido ao uso de matéria prima de identidade duvidosa. Por isto, foi utilizado o método RAPD-PCR para a elaboração de um perfil genético de três espécies de plantas medicinais regulamentadas pelo SUS do Brasil: *Mikania glomerata*, *Maytenus ilicifolia* e *Schinus terebinthifolius*, a partir de exemplares destas plantas, que foram cedidas pela Coleção Temática de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Os 60 iniciadores utilizados no RAPD-PCR com o DNA das três espécies geraram 1284 produtos amplificados que variaram de 100-1500 pb. Foram selecionados cinco iniciadores que geraram no total 76 fragmentos entre 200-1100 pb com astrês espécies, sendo os iniciadores OPG18, OPA7 e OPG17 para a *Mikania glomerata*, os iniciadores OPG20, OPC13 e OPA11 para a *Maytenus ilicifolia* e OPA4, OPA18 e OPG14 para a *Schinus terebinthifolius* e os iniciadores OPA17 e OPC6 para as três espécies. Os perfis resultantes permitiram a identificação eficiente das espécies. Foram identificados iniciadores que geraram um único fragmento que poderão servir para desenhar um iniciador específico, que poderá ser usado na identificação da planta em produtos como monofarmacos e associações.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fitoterápicos; Controle de Qualidade; Perfis genéticos; RAPD

### ABSTRACT

Development of a highly discriminatory method for the identification of genotypes and species of medicinal plants regulated by the Brazilian public health system (SUS) is of paramount importance for the quality control of these species as raw material in the production of herbal medicines in order to minimize the health risks associated with ineffective therapy using raw materials of uncertain identity. We used RAPD-PCR to generate genetic profiles of three medicinal plant species regulated by SUS in Brazil, *Mikania glomerata*, *Maytenus ilicifolia*, and *Schinus terebinthifolius*, from the specimens of these plants donated by the Theme Collection of Medicinal Plants of the Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. The 60 arbitrary primers used for RAPD-PCR with DNA from the three species generated 1284 amplified products ranging from 100 to 1500 bp. Five primers generating a total of 76 fragments between 200 and 1100 bp from the three species were selected: OPG18, OPA7, and OPG17 for *Mikania glomerata*; OPG20, OPC13, and OPA11 for *Maytenus ilicifolia*; OPA4, OPA18, and OPG14 for *Schinus terebinthifolius*; and OPA17 and OPC6 for the three species. The profiles generated allowed the effective discrimination of the species. Primers were identified that generated a single fragment that can serve to determine a specific marker for use in the identification of plant products either in isolation or in association.

<sup>I</sup> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>II</sup> Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTH), Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\* E-mail: jose.aguiar@incqs.fiocruz.br

Recebido: 09 jan 2014

Aprovado: 11 ago 2014

**KEYWORDS:** Herbal Medicines; Quality Control; genetic profiles; RAPD



## INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial, principalmente a dos países em desenvolvimento, utiliza a chamada medicina tradicional para suprir as suas necessidades médicas primárias. A OMS instituiu em 1977 um programa de incentivo ao estudo das plantas medicinais. Das 252 drogas consideradas básicas, 11% são de origem vegetal<sup>1</sup>. Afirma-se que o mercado mundial de drogas de origem vegetal movimentava cerca de US\$ 12,4 bilhões, sendo o consumo da Europa responsável por, aproximadamente, 50% deste mercado. No Brasil, estima-se um gasto em torno de 1 bilhão de reais/ano<sup>2</sup>.

Entretanto, nem sempre uma mesma planta tem a mesma denominação popular entre as várias regiões brasileiras, o que pode ter profundas consequências em termos de vigilância à saúde. Sendo assim, procedimentos capazes de identificar inequivocamente as espécies vegetais recomendadas é de fundamental importância para a vigilância sanitária e o controle da qualidade destes produtos. Um diagnóstico determinou que, em geral, os produtos à base de plantas medicinais produzidos na América Latina apresentam baixa qualidade, contribuem para isso a dificuldade de obter plantas medicinais em quantidade e em qualidade desejadas, a falta de conhecimentos tecnológicos e o desconhecimento ou a inexistência de processos de controle da qualidade<sup>3,4</sup>.

Considerando a aprovação e a regulamentação da produção, distribuição e o uso de 71 plantas medicinais, particularmente, sob a forma de drogas vegetais no Sistema Único de Saúde (SUS), pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, este trabalho teve por objetivo demonstrar a utilização da técnica de RAPD-PCR na identificação de três espécies de plantas medicinais regulamentadas pelo Sistema Único de Saúde do Brasil: a *Mikania glomerata* (guaco), a *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) e a *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia)<sup>5,4</sup>. Estas plantas foram selecionadas devido ao amplo uso popular.

O guaco pertence à família da Asteraceae e seu uso medicinal é no combate à tosse e problemas respiratórios<sup>3</sup>; a espinheira-santa pertence à família da Celastraceae e é usada em displasias, gastralgias hiperclorídricas, anti-flatulência e anti-ulcerogênico; a aroeira-da-praia pertence à família da Anacardiaceae e possui propriedades antialérgica, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiulcerogênica e cicatrizante<sup>6</sup>.

Métodos como o DNA “*fingerprinting*” RAPD-PCR e RFLP-PCR são algumas das técnicas atualmente usadas nestas caracterizações<sup>7,8,9</sup>. A técnica RAPD-PCR consiste na amplificação de DNA genômico por PCR utilizando iniciadores de sequência arbitrária com 10 nucleotídeos<sup>10</sup>.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras das plantas

O trabalho foi desenvolvido no Setor de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fiocruz. As folhas das três espécies de plantas estudadas foram obtidas por meio de coletas provenientes

da Coleção Temática de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. As folhas foram colocadas em sacos seláveis de polietileno e transportadas para o laboratório. As folhas foram desinfetadas com álcool (70% v/v), em seguida lavadas com água esterilizada e álcool (96% v/v) e mantidas congeladas a - 20°C até a extração do DNA.

### Isolamento do DNA Genômico

O DNA genômico foi isolado a partir de amostras de folhas que foram desinfetadas, retirou-se as partes duras e as nervuras das folhas. As amostras foram colocadas em um gral estéril contendo nitrogênio líquido, completamente moídas, com auxílio de um pistilo estéril e, em seguida, submetidas à extração de DNA.

Na extração do DNA do guaco foram utilizados os detergentes Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS 20% m/v)<sup>11</sup>. Cerca de 150 mg do material moído foram extraídos com 1000 µL de detergente CTAB (20 g CTAB/L; 1,4 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl; 20 mM EDTA, pH 8,0) e aquecidos a 65°C em banho seco durante 90 minutos e posteriormente centrifugado a 14000 g por 10 minutos. À 500 µL de sobrenadante foram adicionados de 200 µL clorofórmio e, após centrifugação a 14000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e, nele, foi adicionado um segundo tampão contendo CTAB (5 g CTAB/L; 40 mM NaCl; pH 8,0). Após incubação à temperatura ambiente por 90 minutos, o tubo foi centrifugado a 14000 g por 10 minutos e o sedimento foi dissolvido em NaCl (1,2 M) e adicionado de 350 µL de clorofórmio. Após nova centrifugação a 14000 g por 10 minutos o sobrenadante foi tratado com igual volume de álcool isopropílico gelado e incubado por 24 h a - 20°C, em seguida foi centrifugado a 14000 g por 10 minutos a 4°C e o sedimento contendo o DNA extraído foi secado à temperatura ambiente e adicionado de 100 µL de água purificada. O material foi deixado por 24 h a 4°C e posteriormente ressuspensão com leve agitação.

Na extração do DNA da espinheira-santa e da aroeira-da-praia foi utilizada uma solução de CTAB com β-mercaptoetanol. Este protocolo utiliza PVPP (polivinilpolipirrolidona) 2 % (m/v) em água para eliminar produtos interferentes nas reações de PCR<sup>13</sup>. Cerca de 150 mg do material moído foram extraídos com 700 µL de tampão de extração EB CTAB (para 100 mL de tampão: 2g CTAB/L; 2 g PVPP; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA pH 8,0; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mL mercaptoetanol) e aquecidos a 65°C em banho seco durante 120 minutos e posteriormente centrifugado a 14000 g por 10 minutos. À 500 µL de sobrenadante foram adicionados de 500 µL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1 v/v) e agitado por 5 minutos. Após centrifugação a 14000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, neste tubo foi adicionado isopropanol (2/3 do volume de sobrenadante) e incubado à temperatura ambiente por 90 minutos. Após centrifugação a 14000 g por 10 minutos, o sedimento foi lavado com tampão WB (76 % Etanol; 10 mM acetato de amônia) e seco ao ar. O conteúdo foi ressuspensão com 300 µL de TE 1 X (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e adicionado de 5 µL de RNase (10 mg/mL). Após a incubação por 30 minutos a 37°C, adicionou-se 200 µL de solução de NaCl (5 M) e reprecipitou-se com



2/3 do volume do conteúdo de etanol gelado (100%). Após incubação por 20 minutos a -20°C, centrifugou-se a 14000 g por 10 minutos e o precipitado foi secado à temperatura ambiente e adicionado de 50 µL de água purificada. O material foi deixado por 24 h a 4°C e posteriormente ressuspensão com leve agitação.

A pureza e concentração do DNA isolado foram determinadas espectrofotometricamente (GeneQuant-pro, Amersham Biosciences).

### Análise da RAPD-PCR

Para a reação da RAPD-PCR foi utilizado o “kit Ready-To-Go RAPD Analysis Bead” (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. Neste estudo foram utilizados 60 iniciadores com cada DNA: OPA1 a 20, OPC1 a 20 e OPG1 a 20 (Operon Technology and Life Biosynthesis Incorporated).

As otimizações referentes à diluição do DNA e a avaliação da reprodutibilidade da Reação em Cadeia pela Polimerase (RAPD-PCR) utilizando a “bead” foi realizada através de RAPD-PCR utilizando o DNA do guaco de procedência do Rio de Janeiro, usando o DNA concentrado (após a extração) e o DNA diluído 10 vezes com os iniciadores OPA 1 e OPA 10.

As reações de RAPD-PCR foram realizadas homogenizando 15 µL de água (grau BM), uma “bead”, 5 µL de iniciador diluído e 5 µL de DNA diluído (10 vezes), sendo a quantidade de DNA entre 25 e 50 ng para as três espécies. As condições da termociclagem foram: um ciclo de 95°C por 5 minutos; seguido de 45 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto e 72°C durante 2 minutos; extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para visualização dos fragmentos da RAPD-PCR foi preparado um gel contendo 2% (p/v) de agarose em tampão TBE pH 8,0 contendo de 3 µL de brometo de etídio (10 mg/mL). A eletroforese foi desenvolvida por 120 minutos com tensão constante de 85 V em cuba apropriada.

### Análise de dados

Foram determinados o número de fragmentos visíveis a olho nu com intensidade média e alta no RAPD-PCR com o DNA de cada espécie de planta medicinal utilizando os 60 iniciadores do estudo<sup>13</sup>.

Dos 60 iniciadores utilizados no RAPD-PCR de cada espécie, foram selecionados três iniciadores específicos para cada planta medicinal, que geraram fragmentos entre 200 e 1100 pb. Escolheu-se um iniciador que não gerou fragmento, um iniciador que gerou o maior número de fragmentos e um iniciador que gerou apenas um fragmento. Quando não foi encontrado um iniciador que gerou um fragmento, foi escolhido o iniciador que gerou um fragmento com intensidade alta no intervalo de pb do estudo.

Também foram selecionados dois iniciadores comuns dos 60 utilizados no RAPD-PCR das três espécies que produziram fragmentos distintos no intervalo entre 200 e 1100 pb que puderam ser utilizados na caracterização das espécies.

Com os cinco iniciadores selecionados, três específicos e dois comuns, foram gerados um perfil genético inequívoco (“fingerprint”) para cada espécie de planta. Destes perfis foi gerada uma matriz, onde os fragmentos do RAPD-PCR foram pontuados como ausência de fragmento (0), presença de um fragmento (1). Em alguns intervalos de 100 pb, foi necessário pontuar como presença de dois fragmentos (1,1) ou como presença de três fragmentos (1,1,1).

Esta matriz permitiu a comparação entre os perfis obtidos utilizando os dois iniciadores comuns que produziram fragmentos distintos com o DNA das três espécies de plantas. As comparações foram efetuadas através dos cálculos do coeficiente de dissimilaridade  $((b+c)/(2a+b+c))$  e dos coeficientes de similaridade Sorensen-Dice  $(2a/(2a+b+c))$ . Sendo  $a = 1,1$  (presença de banda de mesmo peso molecular nos perfis comparados);  $b = 1,0$  e  $c = 0,1$  (presença de banda de determinado peso molecular em um perfil e ausência de banda de mesmo peso molecular no outro perfil) e  $d = 0,0$  (ausência de banda de mesmo peso molecular nos perfis comparados)<sup>14</sup>.

A matriz também permitiu efetuar uma análise multivariada para cada planta através da análise hierárquica de cruster. A análise de cluster foi utilizada para o agrupamento de 19 locos na faixa de pb do estudo, com os cinco iniciadores de cada planta. O agrupamento foi feito com base em distância euclidiana e o método utilizado foi o da média entre grupos<sup>15</sup>. Esta análise foi utilizada para a construção de um dendrograma para cada planta, para isto foi utilizado o Programa Action versão 2.6, da Estatcamp. Como os dados foram binários, para efetuar esta análise foram necessários pontuar com 1 os intervalos de 100 pb que apresentaram dois fragmentos (1,1) e três fragmentos (1,1,1).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de uma solução de PVPP (polivinilpirrolidona) para eliminar produtos interferentes nas reações de PCR<sup>12</sup> mostrou-se eficiente na extração do DNA da espinheira-santa e da aroeira-da-praia. As condições para o desenvolvimento da Reação em Cadeia pela Polimerase (RAPD-PCR) mostrou-se adequadamente otimizada, os perfis mostraram-se eficientes, evidenciando um padrão de amplificação reprodutível. Este fato pode ser verificado quando comparamos os fragmentos obtidos de replicatas de RAPD-PCR no gel “A” mesmo com o DNA concentrado ou diluído 10 vezes (pista 2 e 5 com OPA 1 e pistas 6 e 9 com OPA 10). Observa-se, também, que quando comparamos os géis “A” e “B” obtidos de RAPD-PCR desenvolvidas em dias diferentes verificamos os mesmos fragmentos de pb obtidos utilizando o OPA 1 (pistas 2 e 5 do gel “A” com a pista 1 do gel “B”) e OPA 10 (pistas 6 e 9 do gel “A” com a pista 10 do gel “B”) (Figura 1). Portanto, sugere-se, quando possível, a utilização dos reagentes necessários à PCR na forma de esferas (kit Ready-To-Go RAPD Analysis Bead, Amersham Biosciences).

Os perfis RAPD-PCR utilizando o DNA das três espécies de plantas com os 60 iniciadores geraram produtos amplificados que variam de 100 a 1500 pb. Foram gerados 436 fragmentos pelos iniciadores OPA (1-20), 398 fragmentos gerados pelos iniciadores OPC(1-20)

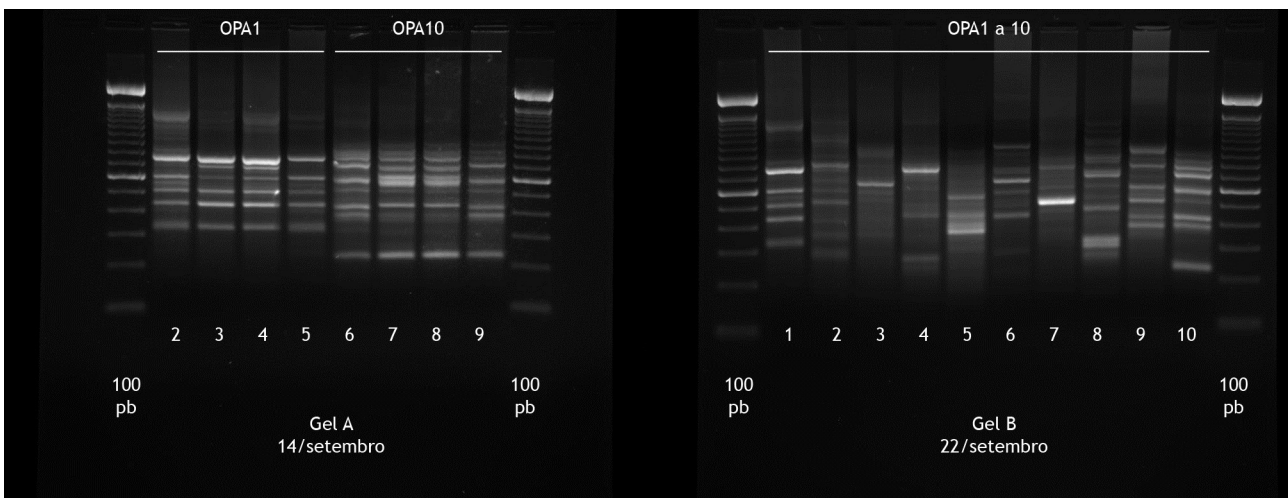


Figura 1. Gel A: Perfil em um gel (RAPD-PCR) usando o iniciador OPA 1 com DNA do guaco do Rio de Janeiro concentrado (pista 2) e diluído (pista 5) e DNA do Paraná concentrado (pista 3) e diluído (pista 4); usando o iniciador OPA 10 com DNA do guaco do Rio de Janeiro concentrado (pista 6) e diluído (pista 9) e DNA do Paraná concentrado (pista 7) e diluído (pista 8). Gel B: Perfil RAPD-PCR em um gel usando 10 iniciadores OPA (1 a 10) com DNA do guaco do Rio de Janeiro.

e 450 fragmentos gerados pelos iniciadores OPG (1-20), totalizando 1284 fragmentos observados para as três espécies de plantas (Tabela 1). Os iniciadores que geraram um único fragmento poderão servir para desenhar iniciadores para a PCR específica, para utilização na identificação da planta em produtos como monofarmacos ou em associações de plantas.

O perfil (“fingerprint”) dos fragmentos entre 200 e 1100 pb de RAPD-PCR para cada espécie do estudo gerados pelos

iniciadores selecionados pode ser observado na Figura 2. Para o guaco, foram selecionados os três iniciadores específicos: OPG18 (5'-GGCTCATGTG-3'), pois não gerou fragmento na faixa selecionada; OPA7 (5'-GAAACGGGTG-3'), por ter gerado um fragmento com intensidade alta a olho nu em 500 pb e não haver iniciador que gerou apenas um fragmento; e OPG17 (5'-ACGACCGACA-3'), por ser o iniciador que gerou o maior número de fragmentos. Para a espinheira-santa foram selecionados os três iniciadores específicos: OPG20 (5'-TCTCCCTCAG-3'),

Tabela 1. Número de fragmentos obtidos do RAPD-PCR (entre 100-1500 pb) das três espécies de plantas medicinais e os 60 iniciadores do estudo.

Primer	G	E	A	Primer	G	E	A	Primer	G	E	A
OPA01	7	12	5	OPC01	3	7	8	OPG01	11	3	6
OPA02	8	11	5	OPC02	10	6	6	OPG02	11	4	11
OPA03	6	10	4	OPC03	8	2	0	OPG03	11	6	11
OPA04	8	9	0	OPC04	7	2	5	OPG04	10	4	12
OPA05	5	7	9	OPC05	11	4	14	OPG05	9	4	10
OPA06	10	6	3	OPC06	7	2	6	OPG06	7	0	11
OPA07	4	8	4	OPC07	11	9	8	OPG07	10	0	11
OPA08	13	10	7	OPC08	7	6	13	OPG08	7	2	10
OPA09	10	4	5	OPC09	9	2	10	OPG09	7	2	11
OPA10	9	7	5	OPC10	5	4	7	OPG10	14	4	10
OPA11	12	15	7	OPC11	6	4	10	OPG11	8	2	11
OPA12	12	5	6	OPC12	8	3	3	OPG12	12	6	14
OPA13	4	8	7	OPC13	8	1	8	OPG13	9	3	12
OPA14	10	2	1	OPC14	8	4	6	OPG14	7	1	17
OPA15	4	3	1	OPC15	11	5	10	OPG15	12	3	10
OPA16	13	9	13	OPC16	9	2	10	OPG16	9	1	13
OPA17	7	6	3	OPC17	3	1	1	OPG17	15	3	13
OPA18	9	12	1	OPC18	4	3	9	OPG18	2	0	2
OPA19	6	11	7	OPC19	11	6	17	OPG19	12	3	12
OPA20	9	6	16	OPC20	9	6	13	OPG20	4	0	5
Total	436			Total	398			Total	450		

G: Guaco; E: Espinheira-santa; A: Aroeira-da-praia.

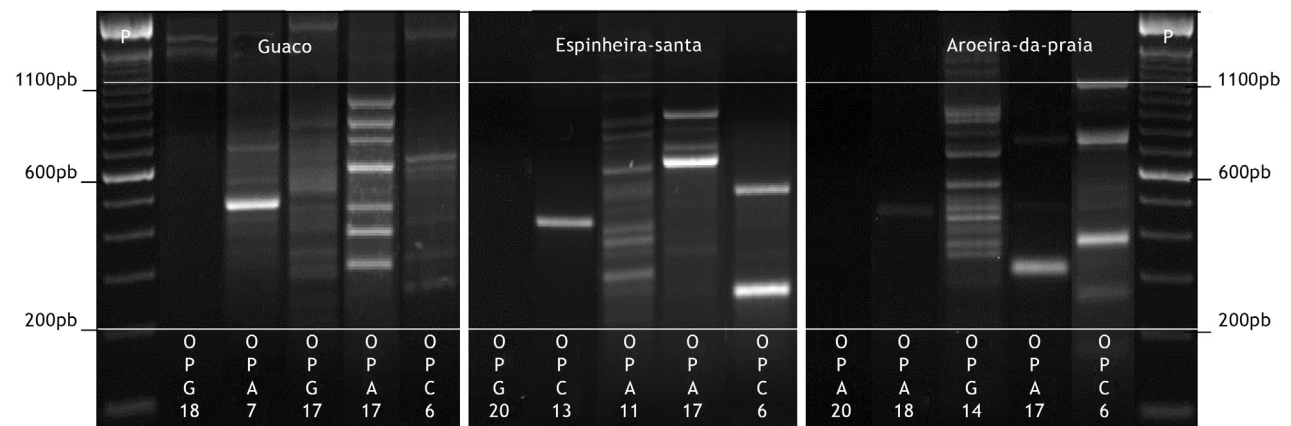


Figura 2. Perfil dos fragmentos do RAPD-PCR das três plantas que foram gerados pelos iniciadores selecionados para a elaboração do perfil (“fingerprint”) entre 200 e 1100 pb. Pista P: padrão molecular 100 pb.

pois não gerou fragmento; OPC13 (5'-AAGCCTCGTC-3'), por ter gerado apenas um fragmento; OPA11 (5'-CAATCGCCGT-3'), por ser o iniciador que gerou o maior número de fragmentos. Para a aroeira-da-praia foram selecionados os três iniciadores específicos: OPA4 (5'-AATCGGGCTG-3'), pois não gerou fragmento; OPA18 (5'-AGGTGACCGT-3'), por ter gerado apenas um fragmento; OPG14 (5'-GGATGAGACC-3'), por ser o iniciador que gerou o maior número de fragmentos. Também foram selecionados os dois iniciadores comuns, OPA17 (5'-GACCGCTTGT-3') e OPC6 (5'-GAACGGACTC-3') que geraram fragmentos distintos no intervalo de pb do estudo com as três espécies.

A matriz dos fragmentos entre 200 e 1100 pb apresenta um total de 76 fragmentos gerados pelos iniciadores selecionados, dos quais: 30 fragmentos gerados com o DNA do guaco, 22 fragmentos gerado com o DNA da espinheira-santa e 24 fragmentos gerados com o DNA da aroeira-da-praia (Tabela 2).

A soma dos parâmetros coeficientes de similaridade de Sorensen-Dice (% SD) e de dissimilaridade (% D) utilizando os iniciadores OPA17 e OPC6 individualmente na comparação entre o guaco e a espinheira-santa, entre o guaco e a aroeira-da-praia e entre a espinheira-santa e a aroeira-da-praia foi de 100% (Tabela 2).

O produto de RAPD-PCR obtido nos permitiu distinguir as três espécies de plantas, mesmo com o uso de dois iniciadores comuns (OPA17 ou OPC6), uma dissimilaridade média foi verificada entre o guaco e a espinheira-santa (84,6 %), entre a espinheira-santa e a aroeira-da-praia (63,5 %) e entre guaco e aroeira-da-praia (52,7 %). Entretanto, a combinação de mais três iniciadores específicos (iniciador que não gerou fragmento, iniciador que gerou um fragmento ou o iniciador que gerou um fragmento com intensidade alta e o iniciador que gerou o maior número de fragmentos) mostrou uma melhor confiabilidade.

Os dendrogramas referentes às plantas do estudo estão ilustrados na Figura 3.

Apenas três países da América Latina (Argentina, Brasil e México) possuem farmacopeias oficiais atualizadas ou em processo

de atualização. Nas farmacopeias oficiais, a grande maioria das monografias corresponde a fármacos sintéticos. As monografias de plantas medicinais constituem minoria e são, principalmente, de plantas de origem europeia. A IV edição da Farmacopeia Brasileira contém 41 monografias de plantas medicinais, das quais, apenas algumas são de plantas brasileiras. A falta de especificações para determinar a autenticidade, a pureza e qualidade do material vegetal é um dos fatores limitantes para isto<sup>3</sup>. Tradicionalmente, os métodos subjetivos, com base nas características morfológicas, tais como: forma, cor, textura e odor são utilizados para a discriminação de medicamentos à base de plantas medicinais. No entanto, estes métodos são difíceis de serem aplicados com precisão para a discriminação e autenticação. O uso de técnicas cromatográficas e marcador químico para padronizar preparações botânicas também é limitado porque os medicamentos têm fontes variáveis e complexidade química, que é afetada pelo crescimento, condições de armazenamento e épocas de colheita<sup>16,17</sup>. Portanto, é urgentemente necessário desenvolver novas metodologias adequadas para a identificação das diferentes espécies de plantas.

O estudo da variabilidade genética de plantas medicinais é de muita importância, tanto em nível da variabilidade interespecífica, quanto em nível da variabilidade intraespecífica. Entretanto, em nível intraespecífico, essas diferenças ainda não estão suficientemente estudadas. Atualmente, a preocupação com a perda da variabilidade e a extinção de espécies com potencial medicinal têm gerado demanda por trabalhos de coleta, preservação e estudo sobre tais plantas. A conservação e manejo eficiente destas espécies medicinais, a composição genética dos acessos coletados em diferentes regiões deve ser avaliada<sup>18</sup>. Neste sentido, os “fingerprint” genéticos gerados neste estudo poderão contribuir para avaliar a qualidade das matérias-primas de regiões diferentes utilizadas na produção dos medicamentos fitoterápicos no Brasil.

Outro grande problema que concerne às plantas medicinais é a biopirataria. Um exemplo ilustrativo de biopirataria em nosso país é o que ocorre com o chá de quebra-pedra (*Phyllanthus* sp.), o qual, nas comunidades tradicionais, é utilizado para fins diuréticos e problemas renais. Esta planta foi processada



Tabela 2. Matriz dos fragmentos que foram gerados pelos iniciadores selecionados para a elaboração do perfil (“fingerprint”) entre 200 e 1100 pb.

	Guaco					Espinheira-santa					Aroeira-da-praia				
	OPG 18	OPA 7	OPG 17	OPA 17	OPC 6	OPG 20	OPC 13	OPA 11	OPA 17	OPC 6	OPA 4	OPA 18	OPG 14	OPA 17	OPC 6
1100 pb	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1000-1100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9000-1000	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
800-900	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1,1	0	0
800	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
700-800	0	0	1	0	1,1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
700	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
600-700	0	1	1,1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
600	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
500-600	0	1	1,1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
500	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
400-500	0	1	1,1	1	1	0	1	1,1	0	0	0	1	1,1	1	1
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
300-400	0	0	1,1	1	1,1	0	0	1,1,1	1	0	0	0	1,1,1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
200-300	0	0	1,1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
200 pb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total			30					22					24		
			G - E					E - A					G - A		
			OPA17	OPC6				OPA17	OPC6				OPA17	OPC6	
a			2	0				2	1				2	3	
b			5	6				4	1				5	3	
c			4	2				1	4				1	2	
%SD			30,8	0,0				44,4	28,6				40,0	54,5	
%D			69,2	100,0				55,6	71,4				60,0	45,5	
%D <sub>m</sub>			84,6					63,5					52,7		

%SD: Coeficientes de similaridade Sorensen-Dice; %D: Dissimilaridade; %D<sub>m</sub>: Dissimilaridade média. G: Guaco, E: Espinheira-santa; A: Aroeira-da-praia. 0: Ausência de fragmento; 1: Presença de um fragmento, 1,1: Presença de dois fragmentos; 1,1,1: Presença de três fragmentos (1,1,1). a = 1,1; b = 1,0; c = 0,1; d = 0,0.

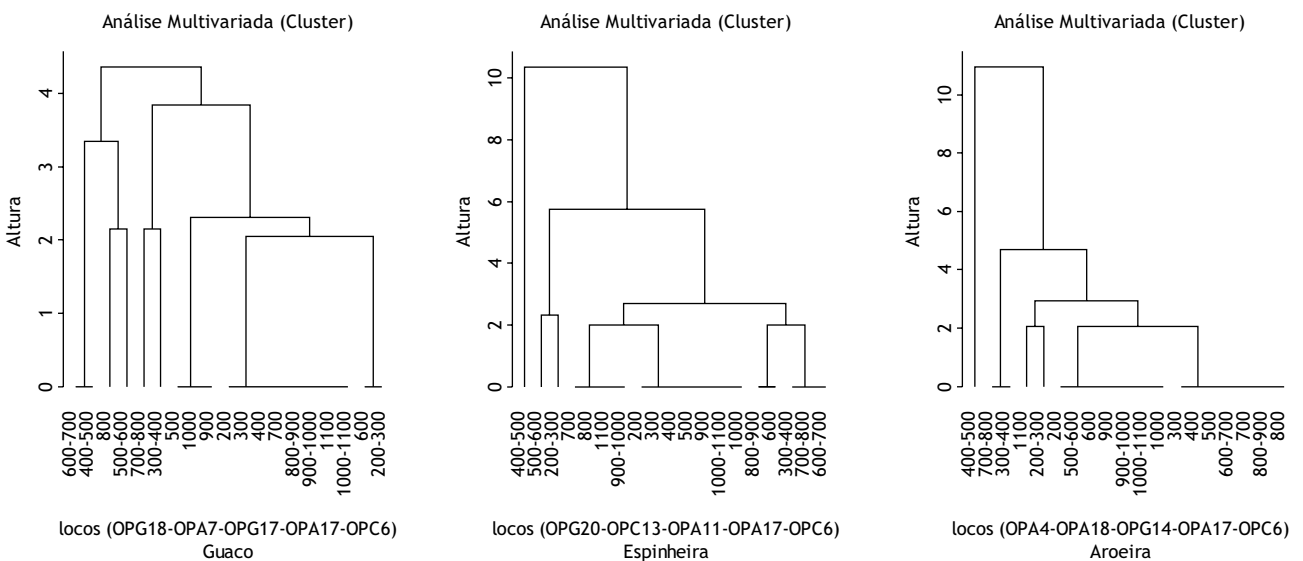


Figura 3. Dendrogramas das distâncias euclidianas dos agrupamentos dos 19 locos gerados pelos iniciadores selecionados para a elaboração do perfil (“fingerprint”) entre 200 e 1100 pb das três plantas do estudo.



sinteticamente por um laboratório norte-americano, revendida para o Brasil na forma de remédio industrializado e consumido pelos próprios brasileiros, sem que o país ou a população fossem beneficiados financeiramente<sup>19</sup>. Portanto, estes perfis, também, poderão ser utilizados como mais uma ferramenta, auxiliando na prevenção da biopirataria destas plantas medicinais.

A técnica RAPD-PCR foi escolhida, principalmente, devido à sua rapidez, relativa acessibilidade, alto polimorfismo, pequena quantidade de material biológico necessário para a extração do DNA, não ser necessário conhecimento prévio do genoma, possuir menor custo, necessitar de um pequeno número de etapas, pouco tempo para obter os resultados e facilidade de implementação<sup>20</sup>.

## CONCLUSÃO

A escolha de cinco iniciadores para elaboração de um perfil (“fingerprint”) genético mostrou-se adequada na caracterização das três espécies do estudo. Os perfis identificados através da utilização dos 60 iniciadores poderá servir de base para futuros trabalhos nesta área com as outras 68 plantas medicinais regulamentadas. Os resultados alcançados poderão contribuir para elaboração de um Banco de Perfis (“fingerprint”) genético das plantas regulamentadas pelo Sistema Único de Saúde do Brasil, desta forma, auxiliando no controle de qualidade destas espécies como matérias-primas na produção de medicamentos fitoterápicos.

## REFERÊNCIAS

1. Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001;39(5):603-13. [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00154-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00154-9)
2. Cragg GC, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J Natural Products*. 1997;60(1):52-60. <http://dx.doi.org/10.1021/np9604893>
3. Gilbert B, Ferreira JLP, Alves LF. Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas. Curitiba: Abifito; 2005.
4. Gonçalves MLQ. Boas práticas para medicamentos fitoterápicos em escala magistral no setor público [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
5. Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18(2):314-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200028>
6. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2a ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2008.
7. Hon CC, Chow YC, Zeng FY, Leung FCC. Genetic authentication of ginseng and other traditional chinese medicine. *Acta Pharmacol Sin*. 2003;24(9):841-6.
8. Novak J, Gausgruber-Gröger S, Lukas B. DNA-based authentication of plant extracts. *Food Res Int*. 2007;40(3):388-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.015>
9. Vural HC. Genomic DNA isolation from aromatic and medicinal plants growing in Turkey. *Scient Res Essay*. 2009;4(2):59-64.
10. Lacerda DR, Acedo MDP, Lemos Filho JP, Lovato MB. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymentia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Mol Ecol*. 2001;10(5):1143-52. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01264.x>
11. Cardarelli LP. Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. *Food Control*. 2005;16(10):859-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.07.010>
12. Aldrich J, Cullis CA. RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using KlenTaq 1 DNA polymerase, chelex 100, and gel purification of genomic DNA. *Plant Mol Biol Report*. 1993;11(2):128-41. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02670471>
13. Collard BCY, Mackill DJ. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Mol Biol Report*. 2009;27(1):86-93. <http://dx.doi.org/10.1007/s11105-008-0060-5>
14. Emygdio BM, Antunes IF, Choer E, Nedel JL. Eficiência de coeficientes de similaridade em genótipos de feijão mediante marcadores RAPD. *Pesq Agropec Bras*. 38(2):243-50. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2003000200011>
15. Cruz CD, Regazzi AJ. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: Editora UFV; 1994.
16. Joshi K, Chavan P, Warude D, Patwardhan B. Molecular markers in herbal drug technology. *Curr Sci*. 2010;87(2):159-65.
17. Arif IA, Bakir HÁ, Khan AH, Al Farhan AA, AL Homaidan AH, Bahkali AH et al. Application of RAPD for molecular characterization of plant species of medicinal value from an arid environment. *Genet Mol Res*. 2010;9(4):2191-8. <http://dx.doi.org/10.4238/vol9-4gmr848>
18. Carvalho MF, Albuquerque Junior CL, Guidolin AF, Farias FL. Aplicação da análise multivariada em avaliações de divergências genética através de marcadores moleculares dominantes em plantas medicinais. *Rev Bras Plantas Med*. 2009;11(3):339-46. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722009000300017>
19. Silva SR, Buitrón X, Oliveira LHM, Marcus Vinícius M. Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio. Brasília, DF: IBAMA; 2001 [acesso em: 17 jul 2005]. Disponível em: <[http://www.traffic.org/publications/traffic\\_portu.pdf](http://www.traffic.org/publications/traffic_portu.pdf)>
20. Weder JKP. Influence of experimental conditions on the reproducibility of RAPD-PCR identification of legumes and cereals. *LWT Food Sci Technol*. 2002;35(3):233-8. <http://dx.doi.org/10.1006/fstl.2001.0844>



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite [http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt\\_BR](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR).