

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**Suelen Rayne Serra Pereira**

**DNA Barcoding e Anatomia Foliar de Espécies Vegetais Cultivadas no Horto Medicinal  
Berta Lange de Morretes da Universidade Federal do Maranhão, pertencentes à Família  
Asteraceae**

**SÃO LUÍS**

**2018**

**Suelen Rayne Serra Pereira**

**DNA Barcoding e Anatomia Foliar de Espécies Vegetais Cultivadas no Horto Medicinal  
Berta Lange de Morretes da Universidade Federal do Maranhão, pertencentes à Família  
Asteraceae**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA  
como parte das exigências para obtenção do  
título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Profa Dra. Denise Fernandes Coutinho

Co-orientador: Pablo Henrique Gonçalves Moraes

SÃO LUÍS

2018

**Suelen Rayne Serra Pereira**

**DNA Barcoding e Anatomia Foliar de Espécies Vegetais Cultivadas no Horto Medicinal  
Berta Lange de Morretes da Universidade Federal do Maranhão, pertencentes à Família  
Asteraceae**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA como  
parte das exigências para obtenção do título de  
bacharel em Farmácia.

São Luís, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Denise Fernandes Coutinho  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Profa. Dra. Ana Zélia Silva  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

Profa. Ma. Ludmilla Santos Silva de Mesquita  
Universidade Pitágoras – MA

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer e dedicar esse Trabalho de Conclusão de Curso às seguintes pessoas:

Primeiramente, a minha Mãe e meu Pai por terem, apesar de todas as dificuldades, se dedicado a me oferecer todas as oportunidades para que eu chegasse até aqui, e, por serem meus exemplos de vida.

As minhas amigas e companheiras de curso, Alzirene Sales e Ivana Sousa, pessoas as quais tive uma inestimável felicidade por ter conhecido e partilhado todos esses 5 anos da graduação. Vocês duas foram essenciais durante essa fase da minha vida e por isso irei agradecer eternamente.

Aos meus outros amigos que fiz durante a graduação, Cassio Tomé, Felipe Fonteles, André Felipe, Gabriela Alves, André do Vale, Thiago Brito, Danilo Viana e a toda turma 86 (14.1) que me acolheram durante essa trajetória.

A Daniela Brandão, os outros mestres e equipe do laboratório de Farmacognosia II.

Aos amigos Tatiana Santos, Carolina Pimenta, Rafiza Lima que me acompanham desde o ensino médio e que são um dos pontos do meu alicerce.

A minha orientadora Profa Dra. Denise Fernandes Coutinho que sempre esteve disposta a contribuir e ajudar para um melhor aprendizado no âmbito acadêmico com esse projeto.

## RESUMO

Entre as famílias mais utilizadas no arsenal terapêutico para produção de fitoterápicos, destaca-se a família Asteraceae que se caracteriza pela presença de óleos essenciais e de inflorescência em capítulos. Dentre as inúmeras espécies dessa família, algumas foram selecionadas para serem cultivadas no Horto Medicinal Berta Lange de Morretes da Universidade Federal do Maranhão por serem utilizadas como medicinais: *Artemisia vulgaris* L., conhecida popularmente como Absinto ou Losna, que na prática popular, é conhecida por seus efeitos analgésicos e antiespasmódicos e a *Solidago chilensis* M., conhecida por Aguardente ou Arnica, que é utilizada como diurética, sedativa, antiespasmódica e cicatrizante. Com o aumento expressivo da demanda de medicamentos à base de espécies vegetais, são necessários, cada vez mais, estudos que comprovem sua eficácia, segurança e a qualidade. Várias técnicas têm sido desenvolvidas para melhorar a avaliação da qualidade de fitoterápicos e quanto à autenticidade, destacando-se a análise microscópica e macroscópica, e uma técnica mais avançada que utiliza DNA vegetal, denominada *DNA Barcoding*. O objetivo desse trabalho é avaliar sequências de DNA que possam ser empregadas com DNA *Barcode* (marcadores moleculares) e realizar caracterização macro-microscópica das espécies vegetais selecionadas, pertencentes à família Asteraceae. Para as descrições morfo-anatômicas, utilizou-se metodologia clássica descrita na literatura. Para a extração de DNA, utilizou-se o procedimento CTAB (LEROY et al., 2002), havendo a padronização da técnica, seguindo as características de cada espécie vegetal, visando o melhor rendimento das amostras de DNA. Estas foram quantificadas, amplificadas por Reação de Cadeia de Polimerase (PCR), utilizando primers que amplificam regiões diversas, e purificadas para serem sequenciadas. Após o sequenciamento desses produtos de PCR, estes foram analisados pelo programa BLAST. Obteve-se 4 amostras de DNA de cada, porém o procedimento de sequenciamento foi realizado apenas nas amostras de *Solidago chilensis* Meyen, pois foi a que demonstrou ter melhor amostra de PCR. Como resultados conclusivos foi possível padronizar protocolo de extração de DNA das espécies estudadas além da caracterização anatômica microscópica e macroscópica que podem, contribuir assim com a determinação de parâmetros de autenticidade de espécies vegetais analisadas, além disso, a análise de DNA *Barcode* proporcionou resultados que demonstram que essa etapa de identificação molecular incorporada ao processo de produção de fitoterápicos agregará melhoria na qualidade além de diminuir o uso de espécies incorretas que induz, geralmente, a inúmeras reações adversas.

**Palavras-chave:** DNA Barcoding. Microscopia. Asteraceae.

## ABSTRACT

Among the families most used in the therapeutic arsenal for phytotherapeutic production, the Asteraceae family stands out, characterized by the presence of essential oils and inflorescence in chapters. Among the numerous species of this family, some were selected to be cultivated in Berta Lange de Morretes Medical Garden of the Federal University of Maranhão because they are used medicinally as: *Artemisia vulgaris* L., popularly known as Absinth or Losna, which in popular practice is known for its analgesic and antispasmodic effects and *Solidago chilensis* M., known as Aguardente or Arnica, which is used as a diuretic, sedative, antispasmodic and healing. With the expressive increase in the demand for medicines based on plant species, more and more studies are needed to prove its efficacy, safety and quality. Several techniques have been developed to improve the evaluation of the quality of phytotherapies and authenticity, including microscopic and macroscopic analysis, and a more advanced technique using DNA, called DNA Barcoding. The objective of this work is to evaluate DNA sequences that can be used with DNA Barcode (molecular markers) and perform macro-microscopic characterization of the selected plant species belonging to the Asteraceae family. For the morpho-anatomical descriptions, the classical methodology described in the literature was used. For the extraction of DNA, the CTAB procedure was used (LEROY et al., 2002), with the standardization of the technique, following the characteristics of each plant species, aiming at the best yield of the DNA samples. These were quantified, amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR), using primers that amplify diverse regions, and purified to be sequenced. After the sequencing of these PCR products, they were analyzed by the BLAST program. Four DNA samples were obtained from each one. However, the sequencing procedure was performed only on the samples of *Solidago chilensis* Meyen, because it was the one that showed a better PCR sample. As conclusive results it was possible to standardize the DNA extraction protocol of the studied species besides the microscopic and macroscopic anatomical characterization that can, thus, contribute to the determination of authenticity parameters of the analyzed plant species, in addition, DNA analysis Barcode provided results that demonstrate that this stage of molecular identification incorporated into the phytotherapeutic production process will add quality improvement and decrease the use of incorrect species, which generally induce a number of adverse reactions.

Keywords: DNA Barcoding. Microscopy. Asteraceae.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	12
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivos Gerais .....	15
3.2. Objetivos Específicos .....	15
4. METODOLOGIA .....	16
4.1. Seleção e Coleta das Espécies .....	16
4.2. Identificação Botânica .....	16
4.3. <i>DNA Barcoding</i> .....	17
4.4. Amplificação por PCR.....	17
4.5. Sequenciamento .....	17
4.6. Aquisição de dados a partir do GenBank.....	18
4.7. Alinhamento de sequências e Análise filogenética.....	18
4.8. Espécies Vegetais Utilizadas .....	19
5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	20
5.1. Caracterização Anatômica .....	20
5.2. Extração do DNA.....	20
5.3. Quantificação de DNA.....	21
5.4. Gel de Agarose.....	22
5.5. Amplificação (PCR) .....	22
5.6. Purificação .....	22
6. RESULTADOS E DISCURSSÃO .....	24
6.1. Estudo Farmacobotânico.....	24
6.1.1. Exsicata.....	24
6.1.2. Estudos macroscópicos.....	25
6.1.3. Estudos microscópicos .....	26
6.2. <i>DNA Barcoding</i> .....	30
6.3. Gel de Agarose/ Resultado da Extração de DNA .....	31
6.4. Amplificação (PCR) .....	32
6.5. Resultados da classificação por <i>DNA Barcoding</i> e análise filogenética.....	32
7. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS .....	35



## 1. INTRODUÇÃO

Ao decorrer do processo evolutivo, as sociedades humanas foram desenvolvendo técnicas e habilidades para a utilização de plantas como fonte de nutrição e forma de combater suas patologias, conhecendo assim, por experimentação, seus efeitos benéficos e possíveis efeitos tóxicos (FERREIRA et al., 2010)

Atualmente, com o avanço tecnológico-científico em várias áreas da saúde, a busca por práticas alternativas e menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde vem crescendo exponencialmente, destacando-se entre elas, a fitoterapia. (RIBEIRO et al., 2005). Com o desenvolvimento da pesquisa científica e com recorrente necessidade pela sociedade, plantas vem sendo estudadas, visando a validação para assegurar a eficácia e segurança sendo que este propósito vem se tornando o objetivo de planos de saúde de diversos países. Tanto que, expressivamente, temos que metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em metabólitos secundários de origem vegetal, caracterizando assim sua marcante presença no âmbito farmacêutico (ALVES, 2001).

A comercialização de plantas medicinais, em dados estatísticos, é responsável pela movimentação global de US\$ 21,7 bilhões/ano (CARVALHO et al., 2008; KHAN et al., 2012.), além de registrar um crescimento de 5-15% ao ano, de acordo com dados divulgados pelo Banco Mundial, mostrando expressivamente a alta demanda de medicamentos oriundos da prática da fitoterapia, demonstrando sua importância na área de saúde pública (MARIN, 2014).

Entre as famílias mais utilizadas na terapêutica na produção de fitoterápicos, destaca-se a família Asteraceae que é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. São plantas que podem ser encontradas no aspecto de pequenas ervas, arbustos, ou em alguns casos, árvores. Cerca de 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, e são encontradas em todos os tipos de habitats, porém, em maior número na América do Sul. Essa família possui uma ampla abordagem na literatura em que são descritas suas inúmeras composições químicas e atividades biológicas, sendo estas, já disponíveis em diversos medicamentos (PIZZOLATTI et. al, 2005)

Dentre inúmeras plantas da família Asteraceae utilizadas na medicina popular, temos *Artemisia vulgaris* L., conhecida popularmente como Absinto ou Losna que, na prática popular, é conhecida por seus efeitos analgésicos e antiespasmódicos sendo empregada também para dispepsia, epilepsia, dores reumáticas, febres, anemias e como vermífugo (LORENZI et al., 2003); e *Solidago chilensis* M., conhecida por Erva-lanceta, arnica ou arnica-brasileira, e é utilizada popularmente como adstringente, oftálmica, diurética, mucilaginoso, vulneraria,

estomáquica, sedativa, antiespasmódica, anti-hemorragica, cicatrizante, odontálgica e no tratamento de contusões, traumatismos, feridas, varizes, frieiras, pruridos, paralisia, fraqueza das articulações, tosse convulsiva e derrame interno de sangue (MARIN, 2014).

De acordo com LORENZI & MATOS (2003) “*Artemisia vulgaris L. (Asteraceae)*, é uma espécie aromática, herbácea, perene e rizomatosa originária da Europa ou Ásia. Na composição química destacam-se o óleo essencial rico em terpenos (cineol e tuiona), flavonóides, taninos, saponinas, resinas, princípios amargos e artemisina”.

Segundo TELLES et. al. (2010) “A espécie *Solidago chilensis M* cresce abundantemente nos domínios geográficos da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa”. Em relação aos constituintes majoritários, foi identificada, nas inflorescências, a presença dos ácidos 3,4-*O*-dicafeoilquinico e 4,5-*O*-dicafeoilquinico, já nas folhas foi obtido o resultado positivo para a presença de rutina e quercetina e ácido gálico. (MARIN, 2014).

Com o aumento expressivo da demanda de medicamentos à base de espécies vegetais, são necessários, cada vez mais, estudos que comprovem a determinada eficácia e, associadamente, a segurança do mesmo quando disponibilizado à população (REZENDE; COCCO, 2002). Os produtos de origem vegetal necessitam de um controle de qualidade adequado e específico, tanto para suas matérias primas quanto para o produto final acabado, sendo este controle o determinante conclusivo para avaliação do tripé eficácia, segurança e qualidade. (DAOLIO, 2006)

Desde 1995, o Ministério da Saúde determinou que, para serem comercializados, os fitoterápicos industrializados necessitam de registro e, para isso, algumas informações técnicas são exigidas como eficácia, segurança e parâmetros de qualidade. Atualmente, a RDC 26/2014 ANVISA/MS estabelece as regras para registro e/ou notificação de fitoterápicos pela indústria nacional. Essa legislação classificou os fitoterápicos em dois tipos: medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico. Estes diferenciam-se pela forma de avaliação de sua eficácia que, para os medicamentos fitoterápicos, utilizam-se ensaios pré-clínicos e clínicos e para os produtos tradicionais fitoterápicos, são utilizados estudos de etnobotânica por tradicionalidade de uso (BRASIL, 2014)

Esta legislação estabelece que as plantas utilizadas como matéria-prima, tanto para obtenção de preparações caseiras pela população quanto as utilizadas pela indústria para produção de medicamento industrializado, precisam ser avaliadas em relação a sua qualidade quanto a autenticidade, integridade e pureza (BRASIL, 2014).

A pureza é um parâmetro importante das matérias-primas vegetais e consiste em verificar a presença de materiais estranhos que podem ser partes de outras plantas, outras partes

da mesma planta, terra, insetos, bactérias, fungos, dentre outros materiais. Os parâmetros farmacognósticos como determinação de cinzas totais e perda por dessecação, além da avaliação de presença de contaminantes microbiológicos, são os mais empregados para verificação da pureza de drogas vegetais (BRASIL, 2004).

A umidade em drogas vegetais, determinada pela técnica de perda por dessecação, acelera a atividade enzimática e conseqüentemente leva a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o crescimento de fungos e bactérias. Por isso, os valores de perda por dessecação são importantes na avaliação da qualidade da droga vegetal, no que diz respeito a pureza (BRASIL, 2014).

A autenticidade consiste em determinar se a espécie vegetal correta será utilizada para a produção do fitoterápico. Da mesma forma, toda planta na forma de droga vegetal (seca), seja para fins medicinais ou não, vendidas em mercados, feiras, supermercados ou farmácias deve ter sua autenticidade garantida, para assegurar o uso da espécie correta. A autenticidade é normalmente avaliada por meio das características morfo-anatômicas, comparando com a descrição descrita na literatura (CARDOSO, 2009).

Mais recentemente, marcadores moleculares vêm sendo utilizados, embora ainda não representem uma rotina nas indústrias. Marcadores moleculares consistem no estudo de fragmentos de DNA, a partir de várias técnicas. Apesar de ainda não ser recomendada pelas normas e regulamentos da ANVISA, a técnica de DNA *Barcoding* vem se destacando dentre as outras técnicas moleculares, (JANUARIO, 2014).

De acordo com FORD et al. (2009) “*O DNA Barcoding* deve ter uma região ideal e que atenda à alguns critérios; para facilitar a amplificação e o sequenciamento, o fragmento deve ter sequência com comprimento curto; suficientemente variável para separar espécies irmãs; e apresentar sítios conservados para o desenvolvimento de *primers* universais. ”

O grande objetivo desta técnica é fornecer um rápido e preciso método automático para identificação das espécies, utilizando regiões do DNA padronizadas (JANUARIO, 2014). Sendo assim baseada na comparação de variações intra-específica e inter-específica de sequências de DNA visando a determinação mais eficiente na identificação das espécies em estudo.

Seguindo a premissa da necessidade da autenticidade na formulação de fitoterápicos, do grande alcance que estes têm demonstrado como terapia alternativa na saúde pública em geral, é de grande importância que plantas medicinais brasileiras tenham marcadores por DNA *Barcoding* depositados em banco de dados de sequências de DNA, amplificando a abordagem dessa técnica. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar sequências de DNA que

possam ser empregadas com DNA *Barcoding* (marcadores moleculares), além de realizar a caracterização microscópica de espécies vegetais da família Asteraceae, cultivada no horto medicinal da Universidade Federal do Maranhão que apresentam potencial para desenvolvimento de fitoterápicos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

- *DNA Barcoding*:

A utilização de *DNA Barcode* como marcador molecular, associado a técnicas de autenticidade já diversamente aplicadas, torna ainda mais seguro e confiável os parâmetros estudados. Visto que, pela consolidação do uso, a técnica de *DNA Barcoding* se estabelece como um sistema universal que, através de regiões específicas do DNA, consegue realizar a identificação de vários organismos em nível específico com precisão e eficiência, (HEBERT et al., 2003).

De acordo com FORD et al. (2009) “O *DNA Barcoding* deve ter uma região ideal e que atenda à alguns critérios: o fragmento deve ter sequência com comprimento curto, para facilitar a amplificação e o sequenciamento; suficientemente variável para separar espécies irmãs; e apresentar sítios conservados para o desenvolvimento de *primers* universais”

O *DNA barcode* apresenta inúmeras vantagens quanto ao seu amplo espectro de finalidades biológicas, temos diversos exemplos de sua utilização na bibliografia pesquisada, que entre elas se destacam: inventários florísticos e delimitações na taxonomia de espécies, revisões taxonômicas detecção de espécies recém descobertas no ecossistema; também é ser utilizado como um recurso forense, podendo confirmar e auxiliar no reconhecimento de espécies de plantas sujeitas a biopirataria (COSTION et al., 2011; HEBERT et al., 2003).

O grande objetivo do *DNA Barcoding* é fornecer um método automático rápido e preciso para identificação das espécies utilizando regiões do DNA padronizadas (JANUARIO, 2014). Sendo assim baseada na comparação de variações intra-específica e inter-específica de sequencias de DNA visando a determinação mais eficiente na identificação das espécies em estudo.

- *Anatomia Foliar de Espécies Vegetais*

No ramo da ciência da fitoterapia um dos maiores obstáculos é a diversidade e variabilidade dos nomes populares, pelos quais a maioria é conhecida, e são atribuídos às plantas, que sofrem interferência, principalmente, pela variação de acordo com a região do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002).

Dessa forma, a comercialização de um fitoterápico deve ter uma consistente, base que começa com a correta identificação. Para esse resultado, a técnica de análise da anatomia foliar com estudos macroscópico e microscópicos é a mais disseminada e acessível, sendo parte essencial do controle de qualidade de medicamentos compostos por plantas medicinais (MARTINS et. al, 2006)

Para a caracterização microscópica de folhas adultas das espécies selecionadas, geralmente são obtidas secções transversais e paradérmicas à mão livre, que passam por todo um protocolo já estabelecido (KRAUS; ARDUIN, 1997). E em seguida, as lâminas seguem para o microscópio óptico. Já para a caracterização macroscópica, as folhas são submetidas a estudos macroscópicos, avaliando aspectos sensoriais, de ápice, superfície, formato, margem e venação (OLIVEIRA et al, 1998).

- *Plantas Mediciniais*

Partindo do conceito que o conhecimento de plantas medicinais é altamente popularizado, principalmente em tribos indígenas, e que essa utilização para tratamento de diversas enfermidades através de efeitos pelos metabólitos presentes em espécies vegetais é a base da medicina desde o primórdio, é compreendido sua demanda e diversas observações populares sobre a eficácia, o que contribui diretamente para o aumento da relevância desse campo medicinal, e atrai diversas pesquisas de foco científico que exploram desde a botânica, fitoquímica a farmacologia de compostos em atividade, demonstrando a enorme riqueza de um bem muito presente no Brasil: a flora altamente diversificada. (MACIEL, et. al, 2002)

Em meados dos anos 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS), através de pesquisas, mostrou que entre 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. (JUNIOR, et al, 2005)

Por definição temos que planta medicinal é: “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos, ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (OMS, 1998). Já, através da planta medicinal é possível elaborar uma formulação que seja comercializada, dentre as normas que as legislam, e assim caracterizando um fitoterápico. (JUNIOR, et al, 2005)

A comercialização de plantas medicinais, em dados estatísticos, é responsável pela movimentação global de US\$ 21,7 bilhões/ano (CARVALHO et al., 2008; KHAN et al., 2012.), além de registrar um crescimento de 5-15% ao ano, de acordo com dados divulgados pelo Banco Mundial, mostrando expressivamente a alta demanda de medicamentos oriundos da prática da fitoterapia, demonstrando sua importância na área de saúde pública. (MARIN, 2014).

- *Familia Asteraceae*

- *Artemisia vulgaris* L

A *Artemisia vulgaris* L., conhecida popularmente como Absinto ou Losna, tem importante papel na medicina popular, e é conhecida por seus efeitos analgésicos e

antiespasmódicos sendo empregada também para dispepsia, astenia, epilepsia, dores reumáticas, febres, anemias e como vermífugo. (LORENZI et al., 2003)

De acordo com LORENZI & MATOS (2003) “*Artemisia vulgaris* L. (Asteraceae), é uma espécie aromática, herbácea, perene e rizomatosa originária da Europa ou Ásia. Na composição química destacam-se o óleo essencial rico em terpenos (cineol e tuiona), flavonóides, taninos, saponinas, resinas, princípios amargos e artemisina”.

- *Solidago chilensis* M.

A *Solidago chilensis* M., conhecida por Erva-lanceta, arnica ou arnica-brasileira. É utilizada na medicina popular como adstringente, oftálmica, diurética, mucilagínosa, vulneraria, estomáquica, sedativa, antiespasmódica, anti-hemorrágica, cicatrizante, odontálgica e no tratamento de contusões, traumatismos, feridas, varizes, frieiras, pruridos, paralisia, fraqueza das articulações, tosse convulsiva e derrame interno de sangue. (MARIN, 2014)

Segundo TELLES et. al. (2010) “A espécie *Solidago chilensis* M cresce abundantemente nos domínios geográficos da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa”. Em relação aos constituintes majoritários, foi identificada, nas inflorescências, a presença dos ácidos 3,4-*O*-dicafeoilquinico e 4,5-*O*-dicafeoilquinico. Nas folhas foi obtido o resultado positivo para a presença de rutina e quercetina e ácido gálico. (MARIN, 2014).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos Gerais

Determinar parâmetros de autenticidade através da técnica de DNA *Barcoding* (marcadores moleculares) e pela descrição morfo-anatômica das espécies *Artemisia vulgaris* L. e *Solidago chilensis* M .

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Levantar as espécies vegetais cultivadas no Horto Medicinal Berta Lange de Morretes da Universidade Federal do Maranhão que pertencem à família Asteraceae e com potencial para desenvolvimento de fitoterápicos;
- Realizar a descrição morfológica e anatômica dos farmacógenos das espécies selecionadas;
- Padronizar protocolo de extração de DNA das espécies selecionadas;
- Obter a sequência de regiões do DNA nuclear e cloroplastidial destas espécies;
- Comparar a variação intra-específica (dentro de exemplares da mesma espécie) e inter-específica (entre espécies do mesmo gênero) das sequências de DNA extraído de diferentes exemplares das espécies estudadas e com as do mesmo gênero depositadas no GenBank, para determinar o DNA *Barcoding* mais eficiente na identificação dessas espécies;
- Realizar a caracterização microscópica das folhas das espécies selecionadas;
- Contribuir com a determinação de parâmetros de autenticidade de espécies vegetais, empregadas na medicina popular e com potencial para desenvolvimento de fitoterápicos.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Seleção e Coleta das Espécies

A seleção das espécies vegetais utilizadas nesse trabalho, baseou-se principalmente na viabilidade, ou seja, espécies pertencentes ao Horto Medicinal Berta Lange de Morretes da Universidade Federal do Maranhão; na preferência a família Asteraceae, visto que esse trabalho especifica a utilização da mesma e o potencial para desenvolvimento de fitoterápicos. A partir desses critérios, foi levantado uma lista com as espécies que cumpriam esses requisitos, onde obteve-se a *Artemisia vulgaris* L. (Losna) e a *Solidago chilensis* M. (Aguardente) para a realização dos experimentos.

A coleta foi realizada pela manhã, em todas as vezes em que foi necessária. Para a realização da exsicata e da caracterização anatômica foram retirados ramos representativos com todos os constituintes (ramos, flores e etc.), já para a extração de DNA, foram coletados apenas algumas folhas de cada espécie vegetal.

### 4.2. Identificação Botânica

Nessa etapa, foram utilizadas metodologias para a caracterização macroscópica e microscópica, sendo estas:

**Caracterização microscópica:** Para a caracterização anatômica das folhas adultas das espécies selecionadas, foram obtidas secções transversais e paradérmicas à mão livre, que foram decoloradas com hipoclorito de sódio, coradas com fucsina e azul de astra, e montadas entre lâmina e lamínula (KRAUS; ARDUIN, 1997). Em seguida, as lâminas foram observadas em microscópio óptico.

**Caracterização macroscópica:** Para complementação da caracterização e determinação de parâmetros de autenticidades, as folhas foram submetidas a estudos macroscópicos, avaliando aspectos sensoriais, de ápice, superfície, formato, margem e venação (OLIVEIRA et al, 1998).

Para a identificação botânica das espécies escolhidas, também foram realizadas as exsicatas, com parceria com o Laboratório de Estudos Botânicos (LEB) associado a Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

### **4.3. DNA Barcoding**

A extração de DNA foi realizada em folhas jovens das espécies selecionadas, utilizando o procedimento CTAB (LEROY et al., 2002), havendo a padronização da técnica, segundo as características de cada espécie vegetal, visando obter o melhor protocolo para obtenção de DNA de qualidade e em concentração adequada, a partir desses materiais. O DNA genômico total de cada amostra foi isolado usando protocolo de CTAB e mantido em refrigeração até a reação de amplificação. O controle de qualidade do DNA foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1%.

Para escolha do melhor marcador molecular para identificação desta espécie, as amostras de DNA serão amplificadas por PCR (Reação de Cadeia de Polimerase), utilizando *primers* que amplificam regiões diversas. Considerando que os *primers* de regiões intergênicas nucleares são considerados os melhores marcadores de plantas e apresentam a vantagem de serem sequencias curtas, as amplificações serão realizadas com *primers* da região ITS 1 e 2 (internal transcribed spacer) (LUM; HIRSCH, 2011).

### **4.4. Amplificação por PCR**

As reações de PCR apresentavam um volume total de 25 µL contendo de 10-20 ng de amostra de DNA, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM de cada dNTP, 10mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 10 µM de cada oligonucleotídeo (ITS2-B e ITS2-D) e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As reações também continham 6% do volume total de DMSO. O protocolo de amplificação consistia de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 90 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C, precedidos por 3 minutos a 95°C e seguidos por 10 minutos a 72°C. O DNA de uma amostra de *Passiflora* sp. coletada do Horto Medicinal Berta Lange de Morretes foi usado como controle positivo, enquanto que água bidestilada estéril foi usada como controle negativo.

Todos os produtos de PCR foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de Tris-acetato-EDTA (TAE) e um transiluminador de luz azul. Um marcador molecular de 100 pares de bases foi utilizado para estimar o tamanho de cada fragmento amplificado.

### **4.5. Sequenciamento**

O preparo das amostras e reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo da empresa BPI Biotecnologia. Em suma, as amostras de PCR foram avaliadas em gel de agarose 2% corados com UniSafe Dye, visualizado sob luz UV. A quantificação dos produtos de PCR purificados realizada por fluorescência em aparelho Qubit (ThermoFischer).

Para a realização do sequenciamento foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos nas reações de amplificação de PCR (ITS2-B e ITS2-D). A reação de sequenciamento foi realizada com BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied) e a reação de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio. Dessa forma, os produtos purificados de PCR foram diretamente sequenciados bidireccionalmente usando o ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

#### **4.6. Aquisição de dados a partir do GenBank**

Todas as sequências de ITS2 foram obtidas a partir do GenBank após resultado da ferramenta Blast. Sequências com bases ambíguas (mais que 10 N's na sequência inteira) ou aquelas pertencentes a espécies não nomeadas (sequências com 'sp.' no nome da espécie) foram evitadas.

#### **4.7. Alinhamento de sequências e Análise filogenética**

A montagem e edição da sequência consenso foram realizadas usando CodonCode Aligner V 3.5 (Codon-Code Co., USA). Previamente à montagem, a sequência foi cortada baseada nos valores de qualidade.

O alinhamento das sequências foi conduzido pelo programa MUSCLE (Edgar, 2004) usando os parâmetros padrões e, subsequentemente, avaliado por inspeção visual.

Foi realizada uma análise filogenética usando o método de substituição Neighbor-Joining no programa MEGA7 (Kumar et al., 2016) através do modelo Kimura 2 Parâmetros (K2P). Os ramos da árvore foram testados por *bootstrap* com 1.000 réplicas.

#### 4.8. Espécies Vegetais Utilizadas

- *Artemisia vulgaris* L (Losna) e *Solidago chilensis* Meyen (Aguardente)

Figura 1: A- Ramo representativo da *Artemisia vulgaris* L.; B -Ramo representativo da *Solidago chilensis* Meyen.



Fonte: Autor (2017)

## 5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 5.1. Caracterização Anatômica

Folhas, caule e aspectos microscópicos de *Artemisia vulgaris* L. e *Solidago chilensis* Meyen foram analisadas para determinação de suas características morfológicas e anatômicas, a fim de determinar parâmetros para identificação da espécie vegetal. Foram utilizados materiais frescos recém-colhidos do Horto Medicinal Berta Lange de Morretes. A análise macroscópica e microscópica foi feita de acordo com a literatura científica (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2011).

Na microscopia, foram realizados cortes transversais e paradérmicos, em todas as vezes que foi necessário, seguindo de descoloração com hipoclorito de sódio e, posterior coloração dos cortes, tendo como objetivo melhorar a visibilidade das características desejadas. Logo após, foram submetidos a análise através de microscópio ótico.

### 5.2. Extração do DNA

Para a extração, foi utilizado o protocolo apresentado na metodologia, sendo este protocolo aplicado posterior a um método de preparação das amostras, nos quais foram testados de 2 maneiras diferentes, visando um melhor resultado.

#### **Método 1:**

1. Macerar o material seco (adicionar uma gota do tampão de extração); transferir para os microtubos
2. Completar o volume com Tampão de Extração (aproximadamente 800  $\mu$ L) e CTAB (Calcular o volume).
3. Adicionar  $\beta$ -mercapo- etanol
4. Adicionar proteinase K

#### **Método 2:**

1. Em um Becker, coloca-se 20 ml de Tampão de Extração;
2. Adicionar 0,2g de PVP;
3. Adicionar 4  $\mu$ L de CTAB;
4. Adicionar 20  $\mu$ L de  $\beta$ -mercapo-etanol
5. Maceração do material seco com 1 gota dessa solução

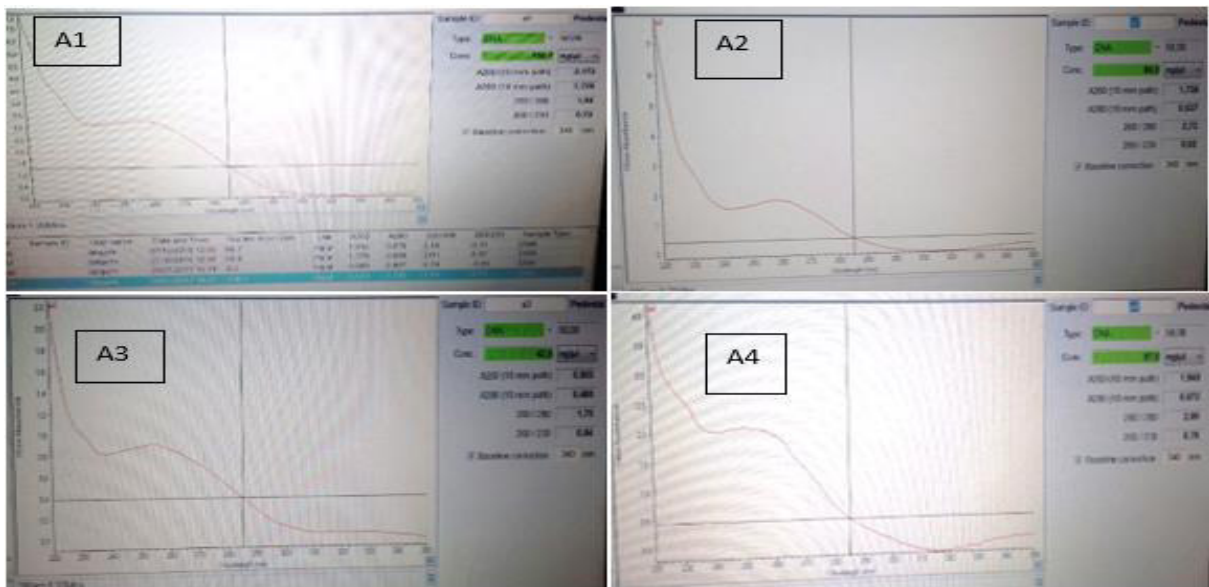
6. Coloca-se nos microtubos, completando com 700  $\mu\text{L}$  de solução.

Onde, o método 2 foi o de melhor aplicabilidade para as espécies da família Asteraceae usadas nesse trabalho.

### 5.3 Quantificação de DNA

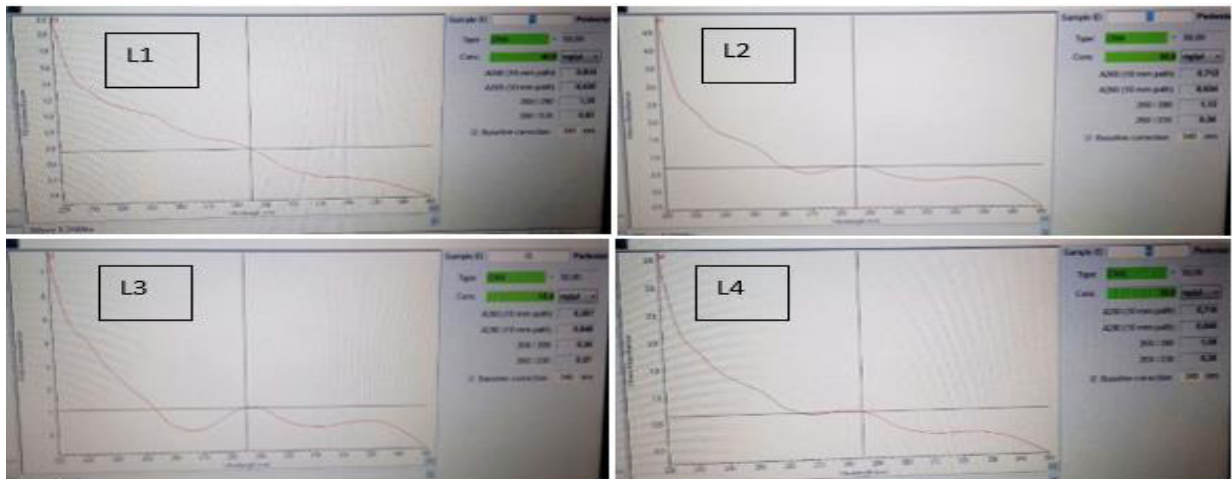
Após a extração do DNA vegetal das plantas mencionadas, é necessário quantificar o DNA, para que assim seja possível a continuação do procedimento padrão. A quantificação de DNA foi realizada com o auxílio do equipamento específico, denominado NanoDrop™.

Figura 2: Gráfico com resultado da quantificação de DNA das amostras de *Solidago chilensis* Meyen.



Fonte: Autor (2017)

Figura 3: Gráfico com resultado da quantificação de DNA das amostras de *Artemisia vulgaris* L.



Fonte: Autor (2017)

#### 5.4 Gel de Agarose

Para a preparação do gel, pesou-se 0,8g de agarose e diluiu em 100mL de TAE 1% no *enlenmeyer*. Amistura foi levada ao micro-ondas (por 30 a 50 segundos) e homogeneizada, logo após foi colocada na forma e posicionado os pentes no liquido para assim esperar solidificar e virar o gel utilizado nesse procedimento. Após a solidificação, o gel foi colocado na cuba e foi coberto por uma camada de TAE 1%.

No primeiro poço foram colocados 3  $\mu$ L de LADDER (Controle positivo) + 1uL de Saffer dye (corante) e nos seguintes 3  $\mu$ L de amostras de DNA + 1uL de Saffer dye. Foram feitos 9 poços, nos quais continham: Amostra controle; A1, A2, A3, A4 (Amostras de Aguardente); L1, L, L3, L4 (Amostras de Losna). Foi utilizado voltagem de 80 e corrente de 300 por um tempo de 45 minutos.

Por último, o gel foi retirado da cuba e colocado no transluminador, e com as luzes apagadas, foi analisado a aparência ou não das bandas de DNA e constatado se as extrações do DNA dessas plantas foram obtidas com sucesso.

#### 5.5 Amplificação (PCR)

Para a preparação do supermix foram utilizados: 13,7  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O; 1,5  $\mu$ L de DMSO, 2,5  $\mu$ L de PF (Tampão); 1,5  $\mu$ L de DNTP; 1,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>; 1,3  $\mu$ L de P1 (primer); 1,3  $\mu$ L de P2 (primer); 0,2  $\mu$ L de Taq e 1,5uL de DNA.

Em um microtubo foram colocados todos os materiais do supermix, com valores adaptados para todas as amostras. Foram separados outros microtubos e neles foram colocados o valor calculado (23,5  $\mu$ L) de supermix em cada um, e depois foi adicionado 1,5  $\mu$ L de DNA. Logo após, os microtubos foram colocados no termociclador e assim foi iniciado o processo que seguiu o protocolo padrão para esse tipo de amostra (ITS2) que consiste em 35 ciclos de 3 etapas, sendo estas: desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (55°C por 1 minuto e 30 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto e 30 segundos), sendo que no início do procedimento ocorre uma fase única de pré desnaturação, na temperatura de 95°C por 5 minutos, e no final do processo ocorre outra fase de extensão em uma temperatura de 72°C por um período de 10 minutos.

#### 5.6 Purificação

Etapa realizada após a visualização em gel do resultado da PCR, em que, primeiramente, o local em que a banda de DNA foi visualizada no gel é cortada, pesada, colocada em um *epENDORF* e assim é iniciado o processo de purificação utilizando o kit Invitrogen.

Na primeira etapa, o gel contido no *eppendorf* foi solubilizado com 1000  $\mu\text{L}$  de Gel Solubilization Buffer (L3), colocado no banho maria à 50°C por 15 minutos e depois foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de isopropanol no tubo.

Na segunda etapa, o volume no *eppendorf* (aprox. 1400  $\mu\text{L}$ ) foi recolocado em tubos específicos com colunas, e assim levados para a centrífuga (13.000 RPM por 1 minuto), após centrifugação o *flow-trough* (volume contido abaixo da coluna foi descartado). Essa etapa foi realizada duas vezes, visto que o volume dos tubos com colunas era inferior ao volume no *eppendorf*.

Na terceira etapa, foi adicionada 500  $\mu\text{L}$  de Wash Buffer (W1) aos tubos com coluna, levados a centrífuga (13.000 RPM por 1 minuto), após centrifugação o *flow-trough* foi descartado. Foi realizada outra centrifugação, por 3 minutos, com o tudo de coluna, sem nenhum reagente, apenas para remover possíveis impurezas.

Na quinta etapa, as colunas são retiradas e colocadas em *recovery tubes*, após isso, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de Elution Buffer (E1). Os tubos foram incubados por 1 minuto em temperatura ambiente e depois foram levados para a centrifugação a 13.000 RPM por 1 minuto.

Na sexta e última etapa, foram armazenados os *recovery tubes* com o DNA purificado à -20°C, no refrigerador.



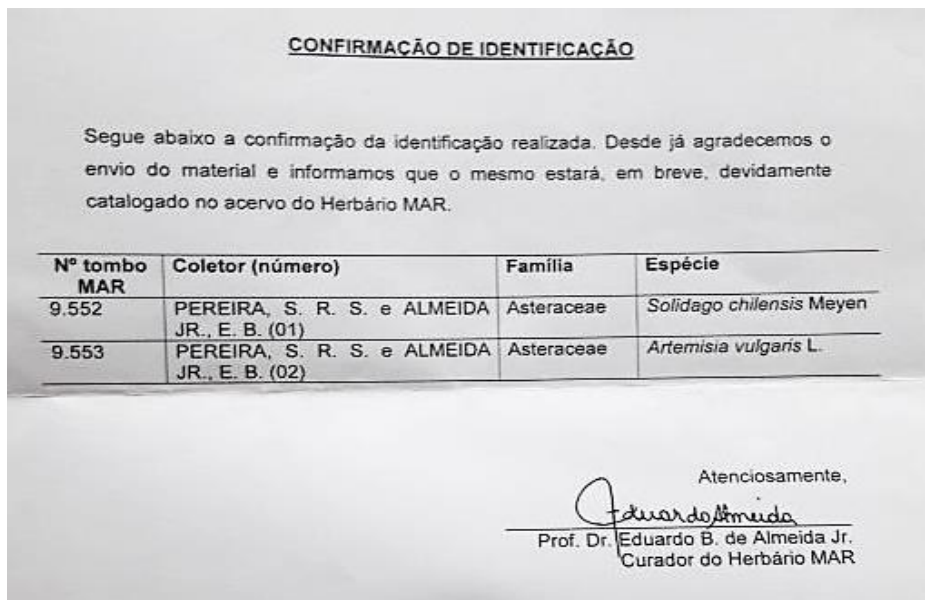
## 6. RESULTADOS E DISCURSSÃO

### 6.1. Estudo Farmacobotânico

#### 6.1.1. Exsicata

As exsicatas foram identificadas e catalogadas no acervo do Herbario MAR, pela equipe do Laboratorio de Estudos Botânicos (LEB), sendo caracterizadas como *Solidago chilensis* Meyen com o número de tombo MAR 9.552 e *Artemisia vulgaris* L. de número de tombo MAR 9.553, sendo essas afirmações asseguradas pelo documento a seguir:

Figura 4: Comprovante de Identificação das especies vegetais



Fonte: Autor (2017)

As duas especies vegetais analisadas já encontram-se catalogados no site splink.com, catalogadas, assim, também no acervo eletrônico do herbário.

Figura 5: Acervo eletrônico da catalogação da exsicata da *Solidago chilensis* Meyen



Fonte: Autor (2017)

Figura 6: Acervo eletrônico da catalogação da exsicata da *Artemisia vulgaris* L.



Fonte: Autor (2017)

## 6.1.2. Estudos macroscópicos

### 6.1.2.1. *Artemisia vulgaris* L. (Losna)

Folhas e caule de *Artemisia vulgaris* L. foram estudadas para posterior determinação dos seus aspectos morfológicos e anatômicos.

As folhas apresentam consistência membranácea, formato elíptico com reentrâncias, caracterizando aspecto multifendido. Quanto a coloração, apresentam se concolores. São folhas peninérvias e apresentam pecíolo curto, além de base assimétrica. O caule possui aspecto cilíndrico.

As características morfológicas observadas nas folhas e caule de *Artemisia vulgaris* L. coincidem com a descrição realizada por Konowalik & Kreitschitz (2012). Os detalhes das folhas da espécie estudada encontram-se na Figura 12.

Figura 7: Partes aéreas de *Artemisia vulgaris* L.



Legenda: c: caule; f: folhas. Fonte: Autor (2017).

### 6.1.2.2. *Solidago chilensis* Meyen (Aguardente)

Folhas e caule de *Artemisia vulgaris* L. foram coletadas para determinação dos seus aspectos morfológicos e anatômicos.

As folhas de composição completa apresentam consistência membranácea, simetria, contorno linear com margem serrilhada, ápice agudo, base decorrente e limbo de subdivisão inteiro. Quanto a coloração são folhas concolores. Possui superfície lisa. O caule foi classificado como cilíndrico.

Figura 8: Partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen.



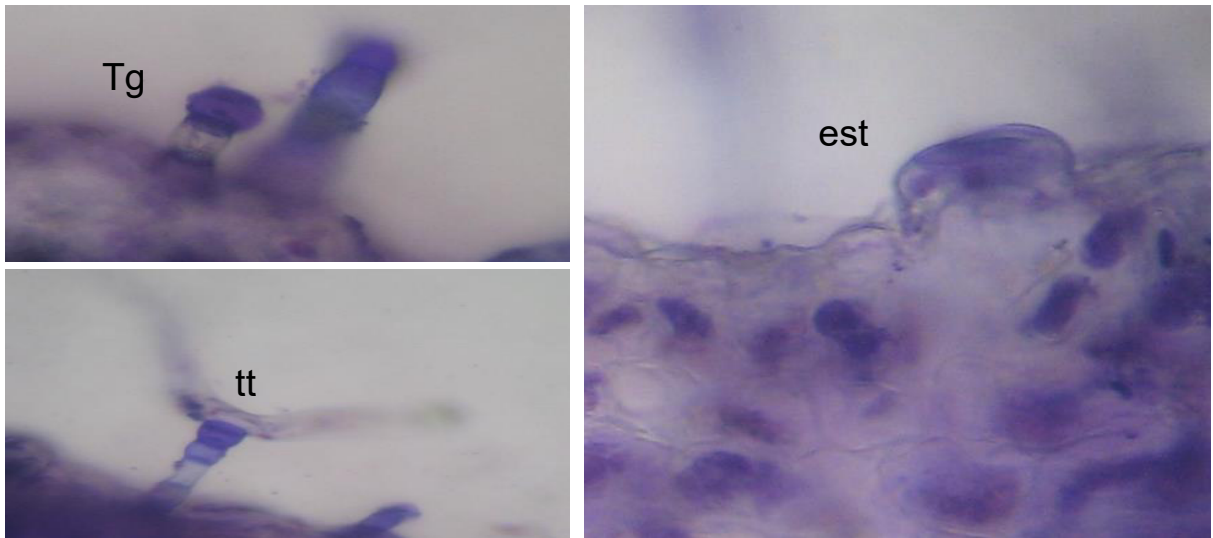
Legenda: c: caule; f: folhas. Fonte: Autor (2017).

### 6.1.3. Estudos microscópicos

#### 6.1.3.1. *Artemisia vulgaris* L. (Losna)

As folhas de *Artemisia vulgaris* L. apresentam como principais características: epiderme uniestratificada, formada por células maiores e cilíndricas na face superior e menores e achatadas na face inferior e cobertas por cutícula espessada; estômatos restritos a face inferior, caracterizando a folha como hipoestomática e localizados em pedestais. Também, há a presença de tectores que são ramificados, dando um aspecto aveludado à face inferior dessas folhas, e tricomas glandulares.

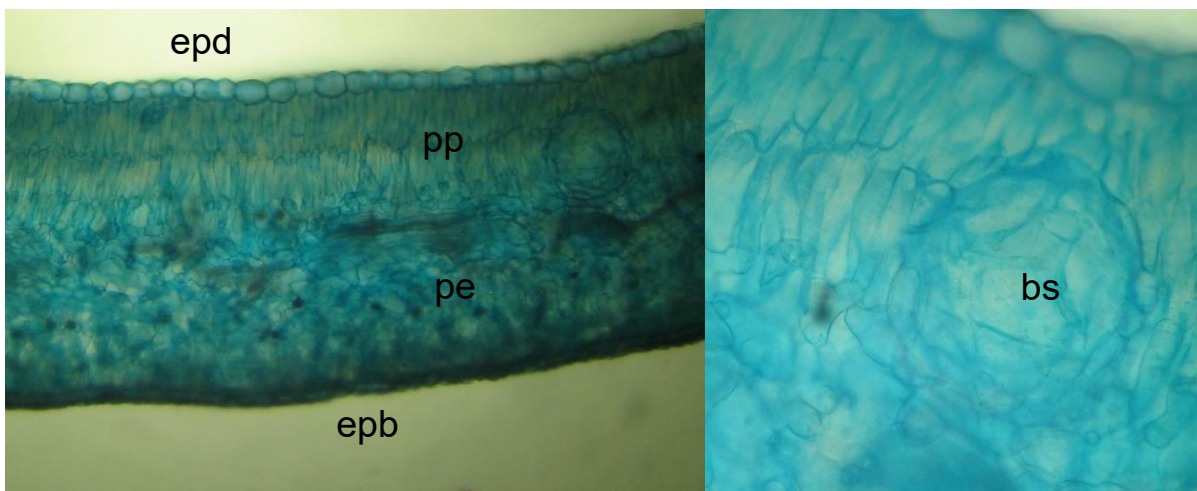
Figura 9: *Artemisia vulgaris* L.: corte paradérmico das folhas, demonstrando detalhe da epiderme e dos tricomas.



Legenda: tt: tricomas tectores; tg: tricomas glandulares; est: estômatos. Fonte: Autor (2017).

O mesofilo é do tipo dorsiventral, apresentando parênquima paliçádico e parênquima esponjoso. Foram observadas bolsas secretoras e colênquima anelar. Já na parte central, é visível um feixe colateral com xilema voltado para face adaxial e floema para a abaxial.

Figura 10: *Artemisia vulgaris* L.: corte transversal das folhas com mesofilo dorsiventral.



Legenda: epd – epiderme adaxial; epb – epiderme abaxial; pp – parênquima paliçádico; pe – parênquima esponjosos; bs – bolsa secretora. FONTE: Autor (2017).

Na região subepidérmica, há duas camadas de colênquima anelar, seguido de parênquima cortical. É observado endoderme e fibras esclerenquimáticas, que formam o periciclo e iniciam o cilindro central. Os feixes demonstram organização eustélica, mas como indicação de união entre os feixes, o que caracteriza crescimento secundário (Figura 11).

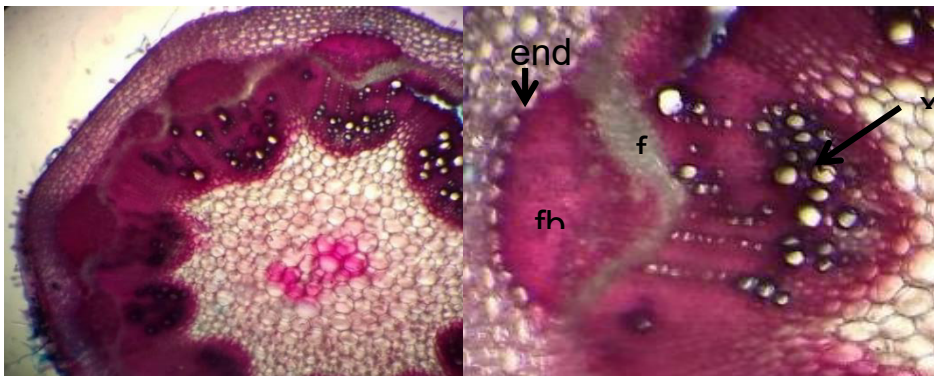
Figura 11: Aspecto da nervura central da *Artemisia vulgaris* L.



Legenda: est – estômato; co- colênquima; f - floema; x - xilema; p – parênquima. FONTE: Autor (2017).

O caule de *Artemisia vulgaris* L. (Figura 12) apresenta formato cilíndrico e encontra-se em estrutura primária, caracterizado pela presença de epiderme uniestratificada, mas demonstra características de estrutura secundária, principalmente na formação dos vasos. Na epiderme, pode-se observar presença de estômato, cutícula espessada e numerosos tricomas.

Figura 12: Aspecto do caule de *Artemisia vulgaris* L.

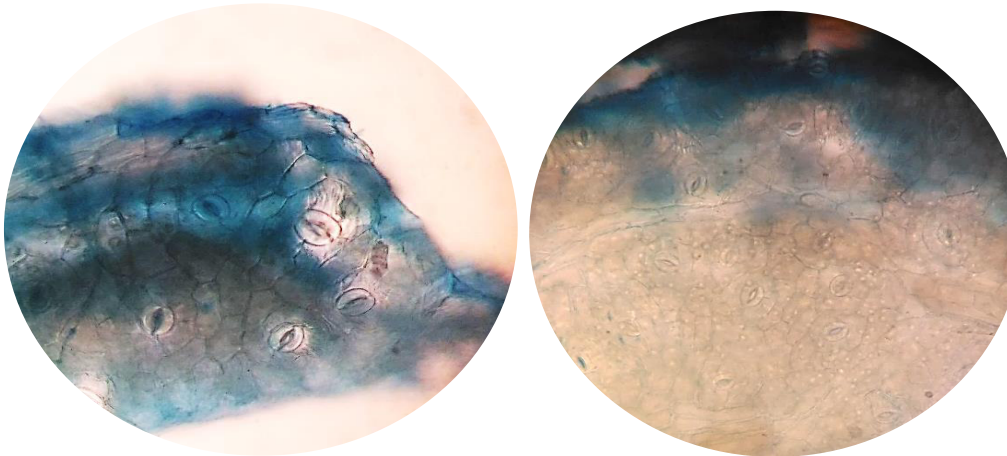


Legenda: end – endoderme; fb – fibras esclerenquimáticas; f – floema; x – xilema. FONTE: Autor (2017).

### 6.1.3.2. *Solidago chilensis* Meyen. (Aguardente)

Através de cortes paradérmicos, as folhas de *S. chilensis* (Figura 13) foram analisadas e constatadas que possuem como principal característica ser classificada como anfistomática, pois apresenta estômatos anisocíticos e anomocíticos, com predominância desta última. As suas células epidérmicas têm paredes com contorno sinuoso.

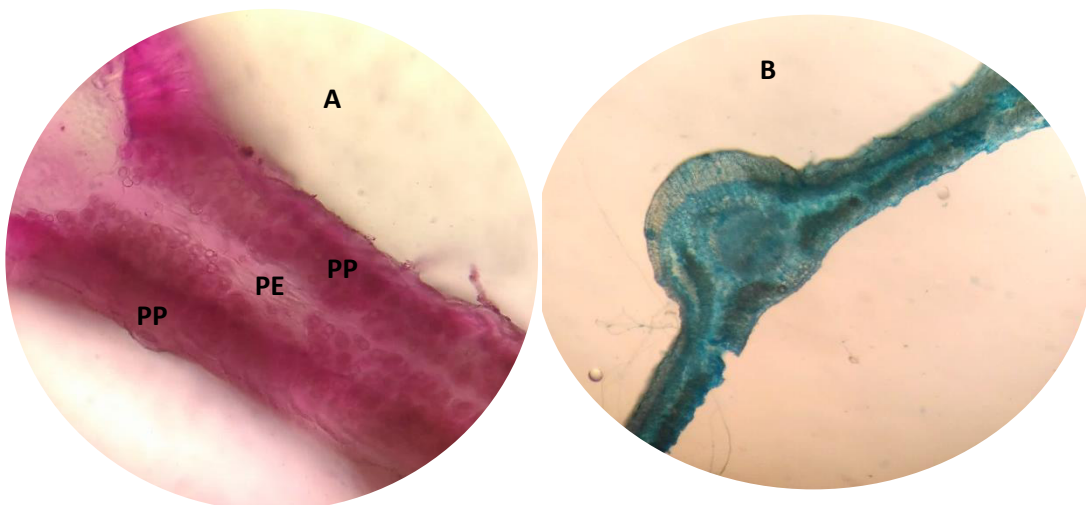
Figura 13: *Solidago chilensis* Meyen.: corte paradérmico das folhas.



FONTE: Autor (2017)

O mesofilo de *Solidago chilensis* Meyen (Figura 14) é classificado como isobilateral, pois apresenta camadas de parênquima paliçádico junto as faces da epiderme a central constituída por parênquima esponjoso. Alguns feixes vasculares são observados pela extensão do mesofilo, sendo estes cercados por bainha parenquimática.

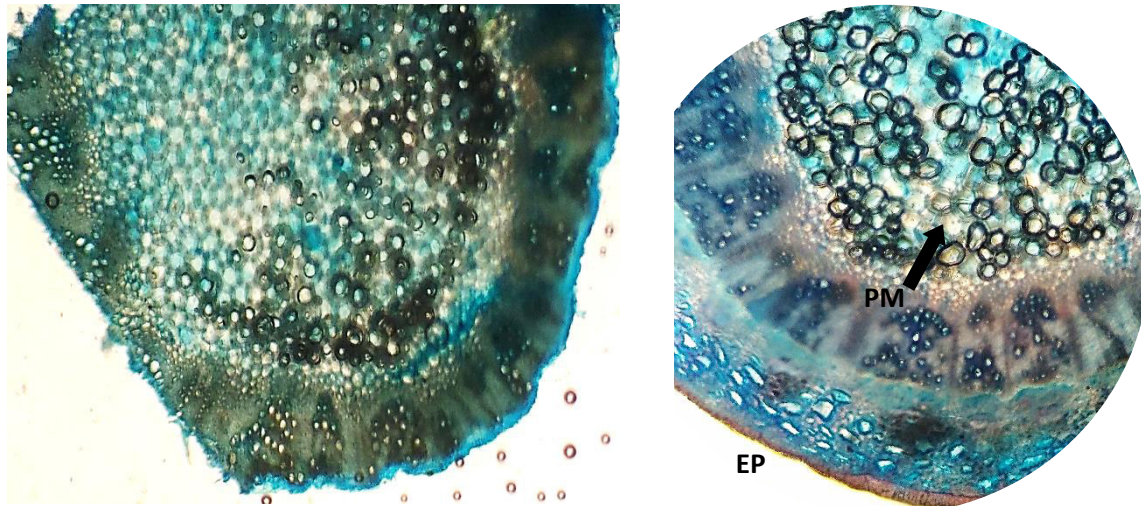
Figura 14: Aspecto do mesofilo da *S. chilensis*



Legenda: PP: parênquima paliçádico; PE: parênquima esponjoso. A: Mesofilo ampliado 40x; B: Corte transversal da folha de *Solidago chilensis* Meyen. FONTE: Autor (2017)

O caule de *Solidago chilensis* Meyen (Figura 15) possui formato cilíndrico e apresenta parênquima medular bem delimitado ocupando a parte central, sendo este classificado como aerênquima. Os feixes vasculares de floema e xilema são distribuídos por todo o caule formando um anel e demonstram organização eustélica ectoflóico, caracterizando-o como estrutura secundária. Possui também, logo após a epiderme, feixe de parênquima.

Figura 15: Aspecto do caule da *Solidago chilensis* Meyen



Legenda: EP: Epiderme; PM: Parenquima medular. FONTE: Autor (2017)

## 6.2. DNA *Barcoding*

Amostras de DNA foram extraídas de folhas jovens das espécies estudadas a partir da técnica do CTAB. Para cada amostra foram utilizadas metodologias específicas para fragmentação das folhas e liberação das moléculas de DNA. Através dessas técnicas, amostras de DNA que demonstraram bons rendimentos.

Através da quantificação, obteve-se o resultado abaixo:

Figura 16: Resultados em planilha da quantificação das amostras vegetais

Quantificação de amostras			
Losna	Concentração	Contaminação (260/280)	DNA/proteína (260/230)
L1	40,8	1,3	0,62
L2	35,6	1,12	0,3
L3	15,4	0,36	0,07
L4	35,8	1,08	0,38
Aguardente	Conc.	Contaminação	DNA/proteína
A1	158,7	1,84	0,73
A2	86,9	2,73	0,62
A3	42,6	1,75	0,84
A4	97	2,89	0,75

Resultados expressivos das 3 principais vertentes analisadas na quantificação de DNA: concentração, contaminação e porcentagem DNA/proteína.

Pelos resultados de concentração as amostras A1, A4 da Aguardente e L1, L2 e L4 mostraram-se melhores, e na porcentagem DNA/proteína os melhores resultados foram da L1 e L4 juntamente com a A3 e A4.

Na quantificação de DNA, usou-se um espectrofotômetro NanoDrop, em que esse aparelho determina a concentração de DNA pela fórmula de Lambert-Beer:

$$C = \frac{Abs \times e}{b}$$

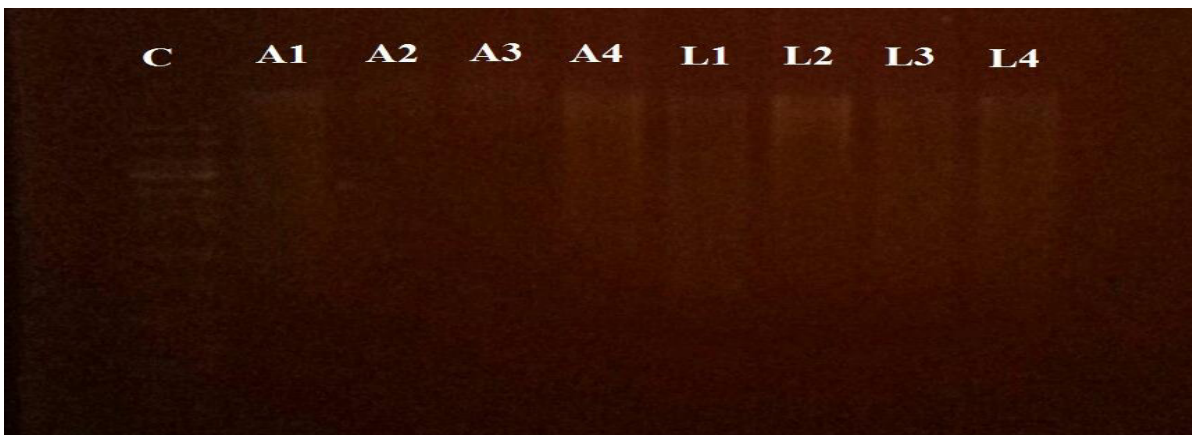
Onde “C” é a concentração de DNA (ng/ul); “Abs” a absorvância; “e” o coeficiente de extinção (quando se trata de DNA, o valor utilizado é 50ng.cm/L) e “b” a altura da coluna criada no espectrofotômetro (1cm). Com absorvância a 260nm obtém-se um valor, que multiplicado por 50 indica a concentração de DNA na amostra, em ng/ul; Com a “Abs” em 280 e 230 verifica-se a pureza da amostra (Os valores devem estar próximos de 1.8). (CARVALHO, 2017)

### 6.3. Gel de Agarose/ Resultado da Extração de DNA

Após a aplicação das amostras de DNA no gel de agarose, observou-se a formação de bandas de DNA, sendo visivelmente distintas de acordo com as amostras, propiciando então uma forma de distinguir e selecionar as melhores amostras de cada planta para prosseguir com as posteriores análises, além de demonstrar que o protocolo de extração foi eficiente para esse tipo de amostra, determinando assim sua eficácia e aplicabilidade.

A partir das análises das bandas de DNA aparentes, notou-se que as melhores amostras foram as: A1 e A4 da Aguardente, e L2 e L4 da Losna.

Figura 17: Resultados das amostras de DNA no gel de agarose, a partir da sua observação em um transluminador.



Legenda: “C” representa a amostra controle; A1, A2, A3 e A4 amostras de DNA da *Solidago chilensis* Meyen; L1, L2, L3 E L4 representam as amostras de DNA da *Artemisia vulgaris* L. FONTE: Autor (2017)



#### 6.4. Amplificação (PCR)

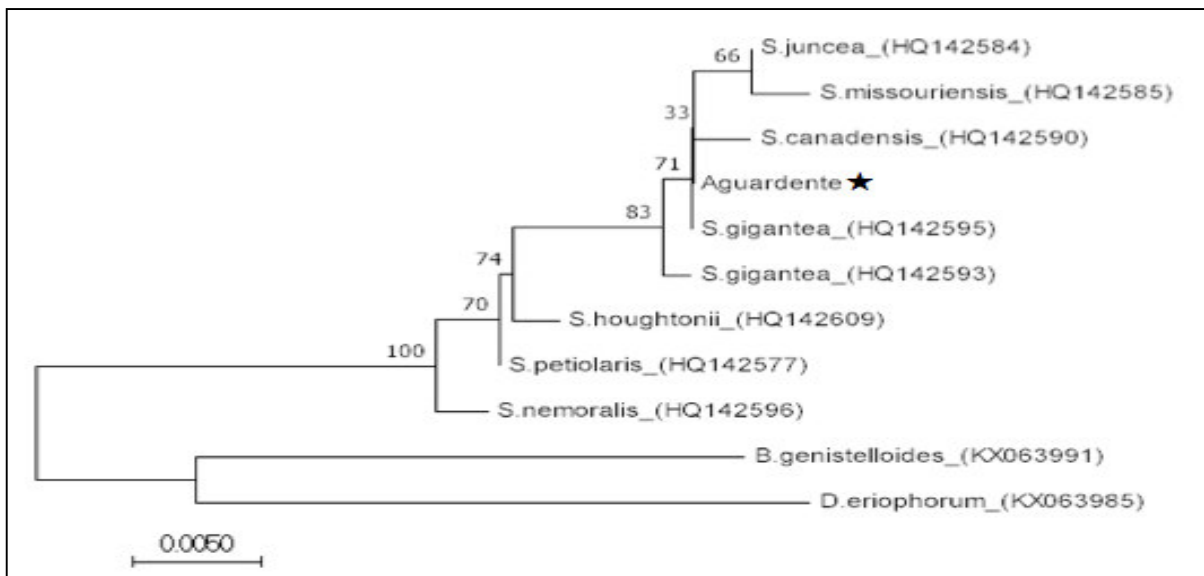
Os resultados da amplificação foram visualizados diretamente no gel de agarose, porém o gel foi manuseado de forma diferente, visto que os volumes das amostras no PCR são diferentes. Foram colocados em cada poço 25  $\mu$ L de amostra e 5  $\mu$ L de Saffer dye, além do controle positivo e controle negativo (6  $\mu$ L de cada um + 2  $\mu$ L de Saffer dye). A corrida em gel foi feita com voltagem de 105, corrente de 300 pelo tempo de 25 minutos.

Após o decorrido tempo, foi observado no transluminador as bandas de DNA e notou-se que houve amplificação das amostras A1 e L4 (Aguardente e Losna, respectivamente), e com esse resultado deu-se prosseguimento ao processo de purificação e sequenciamento com essas amostras específicas.

#### 6.5. Resultados da classificação por *DNA Barcoding* e análise filogenética.

Para a construção da árvore filogenética, foram utilizadas as sequências nucleotídicas da região ITS2. Na presente análise filogenética, todas as sequências foram cortadas até o mesmo comprimento de 434 pares de bases. O resultado confirmou relações filogenéticas próximas ao gênero *Solidago*. A relação mais próxima com a espécie *S. gigantea* também foi evidenciada (Figura 18).

Figura 18. Árvore filogenética baseada nas sequências de ITS2 obtidas a partir do resultado de similaridade pela ferramenta Blast.



FONTE: Autor (2017)

As sequências foram comparadas usando o método *neighbor-joining* com Kimura 2 parâmetros. Entre parênteses estão os números de acesso no GenBank para cada sequência. A

barra de escala indica o número de mutações por posição de sequência. Os números sobre os nós indicam o valor percentual de 1.000 réplicas de *bootstrap*.

O DNA barcode tem auxiliado a rejuvenescer a taxonomia, bem como a entender e a monitorar a biodiversidade (Maia et al., 2012). Segundo Gao et al. (2010), ITS2 é o melhor DNA barcode para a família Asteraceae. Esta abordagem amplia significativamente a aplicação da técnica de DNA barcode para resolver problemas de classificação na família Asteraceae aos níveis de gênero e espécies (Gao et al., 2010).

A região ITS2 apresenta várias vantagens que a tornam uma candidata promissora para DNA barcode como marcadora para a classificação taxonômica e identificação de plantas medicinais, visto que ITS2 tem tanto alta taxa de identificação correta quanto elevada eficiência de amplificação (Chen et al., 2010).

É interessante notar que a *S. chilensis* Meyen é a espécie que ocorre no Brasil (Valverde et al., 2012). No entanto, nenhum dos resultados de busca por similaridade realizada pelo Blast identificou sequências de ITS 2 de *S. chilensis* ou qualquer outra sinonímia desta mesma espécie.

Por outro lado, a comparação da sequência ITS2 do presente estudo exibiu 100% de identidade com a espécie *S. gigantean* (número de acesso: HQ142595). A região ITS2 possui uma forte habilidade para agrupar amostras de plantas em seus gêneros corretos e tem uma acurácia relativamente alta para agrupar as amostras em suas espécies corretas, o que se torna de grande valor prático para os indivíduos sem treinamento taxonomico adequado (Gao et al., 2010).

Sendo assim, determinada a sequência de DNA Barcode que posteriormente poderá ser utilizada para testes de autenticidade dessa espécie vegetal, por possíveis órgãos fiscalizadores ou instituições de pesquisas, em estudos que tenham proposito de garantir a qualidade, eficácia e segurança de amostras vendidas comercialmente.

## 7. CONCLUSÃO

- Foi possível padronizar protocolo de extração de DNA das espécies *Artemisia vulgaris* L. e *Solidago chilensis* Meyen;
- As caracterizações microscópicas e macroscópicas das espécies selecionadas permitiram a obtenção de parâmetros que podem ser utilizados nos testes de autenticidade dessas matérias-primas vegetais;
- O ITS2 foi determinado como melhor DNA Barcode para a identificação de espécies vegetais da família Asteraceae.
- A inclusão da identificação molecular pela técnica de DNA Barcoding mostrou-se eficiente e de extrema aplicabilidade nos testes de autenticidade de amostras vendidas comercialmente.
- Foi possível contribuir com a determinação de parâmetros de autenticidade de espécies vegetais analisadas.

## REFERÊNCIAS

ALVES, H.M.A. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 03, p.10 -15. 2001

BRASIL. Resolução RDC N° 48 de 16 de Março de 2014. Aprova o “Regulamento Técnico pra Registro de Fitoterápicos”. Orgão Emissor: ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/docs/Resolucao%20RDC%2048%20de%2016032004.PDF>>.

Carvalho, A.C.B.; Balbino, E.E.; Maciel A.; Perfeito, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.314-319, 2008.

CARVALHO, L.F. **Adaptação de técnicas de Imunohistologia e de um novo modelo animal ao estudo de infeccoes por micobacterias**. 2017. Universidade do Algarve. Disponível em <<https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/274/10/MATERIAIS%20E%20METODOS.pdf>> Acesso em 02/10/2018

CHEN S.L.; YAO H.; HAN J.; et al. Validation of the ITS2 Region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. **PLOS One**, 2010.

COSTION, C.; FORD, A.; CROSS, H.; CRAYN, D.; HARRINGTON, M.; LOWE, A. Plant DNA Barcodes Can Accurately Estimate Species Richness in Poorly Known Floras. **Plos One**. v. 6, n.11, p. e26841, 2011.

DAOLIO, Cristina. **Aplicação de Técnicas Espectométricas, Cromatográficas e Quimiométricas na Avaliação da Autenticidade de Plantas Utilizadas como Fitoterápicos**. 2006. 162 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

EDGAR R.C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5:113.

EZENDE, H.A.; COCCO M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola Enfermagem**, USP; 36(3): p.282-8, 2008.

FERREIRA, Vitor F.; PINTO, Ângelo C. **A fitoterapia no mundo atual**. 2010. 33 v. Curso de Química, Sociedade Brasileira de Química, São Paulo, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010000900001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000900001)>.

GAO et al.: Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family. *BMC Evolutionary Biology* 2010

JANUARIO, Bianca Belon. **APLICAÇÃO DE CÓDIGOS DE BARRAS DE DNA (DNA BARCODING) NA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Senna Mill.* (Fabaceae) e *Casearia Jacq.* (Salicaceae) PARA ESTUDOS DE VARIABILIDADE GENÉTICA**. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2014

KONOWALIK, KAMIL. KREITSCHITZ. “Morphological and Anatomical Characteristics of *Artemisia Absinthium* Var. *Absinthium* and Its Polish Endemic Variety *A. Absinthium* Var. *Calcigena*.” *Plant Systematics and Evolution*, vol. 298, no. 7, 2012, pp. 1325–1336.

KRAUS, J. E. & ARDUIN, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*, EDUR, Seropédica, 198 p. 1997.

KUMAR S.; STECHER G.; TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016

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

Maia VH, Mata CSd, Franco LO, Cardoso MA, Cardoso SRS, et al. (2012) DNA Barcoding Bromeliaceae: Achievements and Pitfalls. **PLOS ONE 7**

MARIN, Rafaela. **Solidago chilensis Meyer: desenvolvimento de métodos analíticos, extratos secos qualificados, avaliação farmacológica in vivo e produção de comprimidos**. 2014. 216 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014

PALHARES, Rafael Melo. **Aplicação da tecnologia de DNA Barcode em espécies vegetais aprovadas pela ANVISA e comercializadas no Brasil e elaboração de metodologia para certificação de fitoterápicos**. 2015. 78 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015

PIZZOLATTI, Moacir Geraldo; BRIGHENTE, Inês Maria Costa; VERDI, Luiz Gonzaga. GÊNERO *Baccharis* (ASTERACEAE): ASPECTOS QUÍMICOS, ECONÔMICOS E BIOLÓGICOS. **Quim. Nova**, Florianópolis, v. 28, n. 1, p.85-94, 2005.

RIBEIRO, A.G.; LEITE, J.P.V.; DANTAS-BARROS, A.M.. **Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional**. Revista Brasileira de Farmacognosia: Brazilian Journal of Pharmacognosy, Belo Horizonte, v. 15, n. 01, p.65-70, 24 jan. 2005.

SOUZA, DOUGLAS M.F. DE et al . Anatomical, phytochemical and histochemical study of *Solidago chilensis* Meyen. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, 2017 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-37652017005011105&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652017005011105&lng=en&nrm=iso)>. Access on 20. Jul. 2017. Epub June 29, 2017.

TELES, A.M., BORGES, R.A.X. *Solidago* - Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB005503>>.