

METODOLOGIAS PARA O ESTUDO DE FÁRMACOS VEGETAIS

Generosa Teixeira*, **Eurico S. Martins**** e **Filomena Nóbrega*****

⁺ Faculdade de Farmácia, Univ. Lisboa, Centro de Biologia Ambiental, Av. Prof Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal gteixeira@ff.ul.pt

^{**} Unidade de Botânica, IICT, Trav. Conde da Ribeira 9, 1300-142 Lisboa, Portugal esmartins@iict.pt

^{***} INRB, I.P. (ex EFN), Q.^{ta} do Marquês, Oeiras, 2780-159 Oeiras, Portugal Filomena.Nobrega@efn.com.pt

Resumo

O mecanismo de actuação, a toxicidade e os efeitos clínicos permanecem desconhecidos para a maioria dos fármacos vegetais, assentando o seu uso no conhecimento tradicional. É porém frequente encontrar plantas tóxicas que, quando ingeridas inapropriadamente e sem acompanhamento técnico, podem ser letais.

A identificação micromorfológica é útil na inventariação da diversidade e no reconhecimento de caracteres diferenciadores de fármacos vegetais.

O recurso a metodologias no âmbito da biologia molecular é uma mais-valia em relação ao complexo, moroso e dispendioso estudo fitoquímico. Usando quantidades de material muito pequenas, elas constituem também um avanço na certificação da qualidade, segurança e reprodutibilidade da composição de fármacos.

Como exemplo da sua aplicação, apresentamos um estudo realizado com plantas endémicas de Cabo Verde, usadas na medicina tradicional, *Tornabenea insularis* e *T. annua*. Estas espécies apresentam problemas taxonómicos, o que também levanta questões na sua correcta utilização.

Através da combinação dos microcaracteres foliares e dos frutos bem como da extracção de DNA e amplificação por PCR da região ITS e do gene 26S rDNA, os nossos resultados não permitem a separação dos dois *taxa*, não confirmando assim a actual classificação.

Palavras-chave: Fármacos vegetais; *Tornabenea*; Microscopia; Biologia molecular; PCR

INTRODUÇÃO

Através dos tempos o homem tem recorrido às plantas para protecção contra variadas doenças, usando-as directamente como agentes terapêuticos, mas também como fonte importante para a pesquisa de novos compostos bioactivos com potencial terapêutico (WHO, 1998; LINDE *et al.*, 2001). Estes produtos podem ser muito complexos e difíceis de classificar e delimitar. Alguns têm indicações terapêuticas e profiláticas sendo classificados como medicamentos. Os restantes encontram-se sob a alçada da legislação alimentar ou cosmética, apesar de poderem conter na sua composição plantas com importantes propriedades farmacológicas (AESGP, 1998).

Para a maioria dos produtos naturais desconhece-se o seu mecanismo de actuação, a sua toxicidade e os seus efeitos clínicos e o seu uso assenta no conhecimento tradicional. Está divulgada a ideia de que os produtos naturais, sendo naturais não são tóxicos e não

têm nem efeitos secundários, nem limites de posologia e dosagem. Tal nem sempre é verdade, e os produtos naturais só beneficiam a saúde humana desde que usados apropriadamente e com acompanhamento técnico (PHILLIPS, 2001). A comercialização destes produtos deve atender ainda à segurança e reprodutibilidade da sua composição. O cumprimento de normas de qualidade e segurança deverá ser uma imposição. Nesse sentido a avaliação botânica, através da micromorfologia, deverá ser o primeiro passo na inventariação da diversidade morfológica e estrutural e no reconhecimento de caracteres úteis na delimitação de espécies de plantas vulgarmente utilizadas para fins terapêuticos.

A aplicação de metodologias no âmbito da biologia molecular aos produtos naturais de origem vegetal é uma mais-valia em relação à complexa, morosa e dispendiosa avaliação fitoquímica. Necessitando de muito pequenas quantidades de material, os seus resultados não sofrem influências ambientais. Estas técnicas podem ser aplicadas a quaisquer produtos biológicos e constituem também um significativo avanço na certificação da qualidade, segurança e reprodutibilidade desses produtos.

Como exemplo da aplicação destas metodologias, o presente trabalho apresenta um estudo realizado com plantas endémicas de Cabo Verde, *Tornabenea insularis* (Parl. ex Webb) Parl. ex Webb e *T. annua* Bég. Trata-se de duas espécies usadas na medicina tradicional pelas populações locais, que apresentam problemas na sua identificação. Estas foram anteriormente consideradas por CHEVALIER (1935) como pertencendo ao género *Melanoselinum*, morfológicamente muito próximo e do qual *M. decipiens* (Schrad. & Wendl.) Hoffm. é endémica de algumas ilhas dos arquipélagos dos Açores e da Madeira (HANSEN e SUNDING, 1993). Ainda a título informativo utilizámos materiais de *Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex A.W. Hill, apenas na componente molecular deste estudo.

MATERIAL VEGETAL

Foram utilizados exemplares de *T. annua* e *T. insularis* mantidos em cultura em Lisboa. Estas plantas foram obtidas por germinação de sementes, realizada em Setembro de 2006. As sementes foram recolhidas em exemplares colhidos em Cabo Verde, na Ilha de Santiago, no final de 2004, em espécimes herborizados e identificados no Herbário do Centro de Botânica, do IICT, Lisboa.

Os exemplares de *P. crispum* foram adquiridos num mercado de Lisboa e *M. decipiens* foi proveniente da ilha da Madeira e identificada no JBM. Todo o material foi

transportado para o laboratório em arcas térmicas e foi adequadamente acondicionado a -70 °C, até ao momento de extracção de DNA para análise.

MÉTODOS

Estudo micromorfológico

As observações das duas espécies de *Tornabenea* em estudo foram realizadas num microscópio óptico Nikon Labophot-2, e num microscópio electrónico de varrimento Jeol JSM-5220 LV, a 15 KV, utilizando material fresco e material fixado numa solução de glutaraldeído, 2.5 % (HAYAT, 1981).

Foi feito o destaque do tecido epidérmico na zona média das folhas, nas duas páginas e observou-se a forma, a dimensão e a orientação das células epidérmicas. Fez-se a medição de estomas, a identificação do tipo de estomas e o cálculo do índice estomático, na epiderme da página inferior. Os estomas foram classificados de acordo com STACE (1989) e o índice estomático foi calculado de acordo com EVANS (2002). Observou-se a distribuição de tricomas tectores e foram ainda feitos cortes transversais na zona média das folhas, abrangendo a nervura central, utilizando um micrótomo de Minot.

ESTUDO MOLECULAR

Extracção de DNA e amplificação por PCR da região ITS e do gene 26S rDNA

A extracção do DNA total foi realizada de acordo com o protocolo do kit de extracção DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

A região ITS, compreendendo a região espaçadora transcrita ITS1, o gene 5.8S rDNA e a região espaçadora transcrita ITS2, foi amplificada por PCR recorrendo ao kit Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen) e aos *primers* ITS4/ITS5 (STUART, *et al.*, 2000) e C28kj/Leu1 (VARGAS *et al.*, 1998; VARGAS, 2000). As reacções de amplificação foram realizadas num termociclador Hybaid Express, num volume total de 25 µL e recorrendo-se ao kit Taq PCR Master Mix (Qiagen), contendo 1x QIAGEN PCR Buffer, 3,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA. As reacções PCR foram efectuadas com 35 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo em 50 seg a 94 °C, 50 seg a 55 °C e 1 min a 72 °C, após uma desnaturação inicial a 96 °C durante 2 minutos e 2 ciclos, cada um deles consistindo em 50 seg a 94 °C,

50 seg a 40 °C e 1 min a 72 °C. Finalmente, procedeu-se a uma extensão final durante 5 min a 72 °C.

Para a amplificação do gene 26S rDNA utilizaram-se os *primers* N-nc26S1, N-nc26S7, N-nc26S10, 1499rev, 2426rev e 3331rev referidos por KUZOFF *et al.* (1998) e os *primers* LeuF2, 26S3rev, 1499F e 2426F desenhados com base em sequências de *Tornabenea*.

As reacções de amplificação foram realizadas num volume total de 50 µL, contendo 1x QIAGEN PCR Buffer, 3,0 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 10% DMSO e 100 ng de DNA. As reacções PCR foram efectuadas com 30 ciclos de amplificação, cada ciclo consistindo em 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 3,5 min a 72 °C, após uma desnaturação inicial a 94 °C durante 3 minutos. Finalmente, procedeu-se a uma extensão final durante 15 min a 72 °C. Os produtos PCR obtidos para a região ITS e para o gene 26S rDNA foram purificados utilizando-se o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), seguindo-se as instruções fornecidas pelo fabricante, e sequenciados pela empresa STAB Vida.

Análise de sequências

As sequências foram alinhadas utilizando-se os programas BioEdit ver. 7.0.7 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) e Geneious Pro 3.0.4. (<http://www.geneious.com/>). As análises de homologia foram realizadas recorrendo-se ao algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e as relações filogenéticas foram estabelecidas usando o algoritmo Neighbor-Joining do programa MEGA ver. 3.1 (KUMAR *et al.*, 2004) (<http://www.megasoftware.net>) com análise de *bootstrap* de 500 reposições.

RESULTADOS

Estudo micromorfológico

As duas espécies de *Tornabenea* apresentam microcaracteres muito semelhantes a nível das suas folhas: são folhas pubescentes com tricomas de cobertura nas duas páginas, mais visíveis sobre as nervuras e margens (Estampa 1A), distribuindo-se ao acaso e sem orientação definida (Estampa 1B). São tricomas unicelulares com micropapilas, rodeados na base por 8 células epidérmicas, dispostas radialmente. Estes tricomas apresentam

dimensões variáveis com a sua localização na folha: em *T. annua* na página inferior o comprimento sobre a nervura é de $280 \pm 70 \mu\text{m}$, no limbo de $187 \pm 17 \mu\text{m}$ e na margem de $84 \pm 20 \mu\text{m}$. Em *T. insularis* os tricomas são em menor número tendo dimensões semelhantes na nervura e na margem, mas menores no limbo, $132 \pm 8 \mu\text{m}$.

Em ambos os taxa a epiderme superior é constituída por células poligonais de dimensão variável e sem orientação definida, com uma razão comprimento/largura de 1,3. A epiderme inferior apresenta-se semelhante mas com células de menor dimensão e parede celular mais sinuosa e estriada (Estampa 1C). A razão entre comprimento/largura é de 1,4. Os estomas encontram-se distribuídos pelas duas epidermes foliares, embora em maior número na epiderme inferior. Nas duas espécies encontram-se estomas, sem orientação definida (Estampa 1C), de tipo anisocítico, paracítico, com predominância do tipo diacítico. A razão comprimento/largura é de 1,5 e o valor do índice estomático encontrado foi de 22,3 para *T. annua* e de 20,1 para *T. insularis*.

Em corte transversal as folhas dos dois taxa apresentam um mesófilo bifacial ocupando o parênquima em paliçada cerca de metade da sua espessura (Estampa 1D). O parênquima lacunoso tem poucos espaços intercelulares e as nervuras são salientes apenas na página inferior e os tecidos condutores encontram-se envolvidos por uma bainha (Estampa 1D). As nervuras são acompanhadas por canais secretores, localizados superior e inferiormente em relação aos vasos de transporte, sendo o canal inferior sempre de maior diâmetro (Estampa 1D). Cada canal é delimitado por um anel de células secretoras (Estampa 1E).

Os frutos são esquizocarpos, com dois mericarpos monospermicos e unidos pelo carpóforo, apresentando-se estreitamente alados. Este aspecto é mais evidente em *T. annua* onde as margens podem surgir frequentemente dentadas, (Estampa 1F). Em vista dorsal é possível a observação de tricomas sobre as costas, também mais frequentes em *T. annua*.

Estudo Molecular

A região ITS tem sido utilizada com o objectivo de esclarecer os níveis taxonómicos inferiores, família, género e espécie, por ser específica para cada espécie e por apresentar baixas variações dentro de cada género (PLUNKETT *et al.*; 1997; JOBES e THIEN, 1997; BLATTNER, 1999; SPALIK e DOWNIE, 2006).

Neste estudo, para as quatro amostras analisadas (duas amostras de cada espécie), as sequências de DNA obtidas para a região ITS, com uma dimensão de 680 bp, foram alinhadas e detectou-se, numa das amostra de *T. insularis*, uma variação nucleotídica por substituição. Para confirmar a existência desta variação, fez-se o mesmo estudo com o conjunto de *primers* C28kj/Leu1, obtendo-se para a região ITS uma dimensão de 950 bp. Pela análise deste alinhamento verifica-se a mesma variação nucleotídica detectada no alinhamento anterior. Pode considerar-se que estes resultados mostram uma semelhança de 100% na região ITS entre as duas espécies *T. annua* e *T. insularis*.

Com o recurso aos registos das sequências na base de dados GenBank, foram analisadas as sequências homólogas, completas e parciais, que revelaram uma identidade superior a 90 %. Consideraram-se apenas as sequências X17534 e AY552527, por apresentarem a região ITS completa, e procedeu-se ao seu alinhamento múltiplo (Figura 1), registando-se as dimensões das respectivas regiões ITS. Da análise deste alinhamento podemos verificar que para as sequências referidas, em *Daucus carota* subsp. *carota*, as regiões ITS1 e ITS2 também apresentam algumas variações nucleotídicas. Podemos ainda verificar que existe uma grande homologia entre este taxon e as duas espécies de *Tornabenea* em estudo.

Para verificar a possibilidade de inclusão do género *Tornabenea* no género *Melanoselinum* ou no género *Petroselinum*, analisaram-se também as sequências de *M. decipiens* e de *P. crispum*. O alinhamento de todas as sequências mostrou que as espécies de *Tornabenea* não devem ser incluídas em qualquer dos outros géneros considerados e as análises de homologia revelaram ainda que estão filogeneticamente mais próximo de *D. carota* do que dos restantes taxa (Figura 2).

Para o gene 26S rDNA o alinhamento das sequências mostrou que as duas amostras de *T. annua* e uma das amostras de *T. insularis* são 100% similares e que a outra amostra de *T. insularis* apresenta duas variações nucleotídicas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A identificação de fármacos vegetais deve ser iniciada pela sua descrição macroscópica e microscópica seguida de outros ensaios que sejam necessários. Os fármacos vegetais podem ser plantas inteiras mas, na maioria dos casos, são fragmentadas ou pulverizadas. Nesta situação os microcaracteres têm grande importância, uma vez que

não dispomos de plantas e de órgãos completos. Os microcaracteres relativos à epiderme têm particular destaque na identificação de fármacos vegetais. Caracteres como a forma e orientação das células epidérmicas, o tipo, distribuição e orientação de estomas e de tricomas, não são considerados caracteres plásticos, não sofrendo alterações provocadas pelas condições ambientais, sendo por isso caracteres de grande valor taxonómico, fornecendo dados adicionais para a identificação de espécies (METCALFE e CHALK, 1950; STACE, 1989).

Os resultados micromorfológicos obtidos apontam para que *T. insularis* e *T. annua* apresentam nas suas estruturas vegetativas um grande número de microcaracteres semelhantes. Também as estruturas vegetativas e reprodutoras bem como o número de cromossomas em exemplares colhidos em Cabo Verde apresentam uma elevada semelhança (GROSSO *et al.*, 2008).

Com base nos resultados do estudo molecular, pode concluir-se que *T. annua* é idêntica a *T. insularis* no que se refere às sequências da região ITS e do gene 26S rDNA, ou seja, são indistintas, ainda que existam algumas diferenças nucleotídicas por substituição.

Os resultados indicam também que o género *Tornabenea* não deve ser incluído no género *Melanoselinum* nem no género *Petroselinum*.

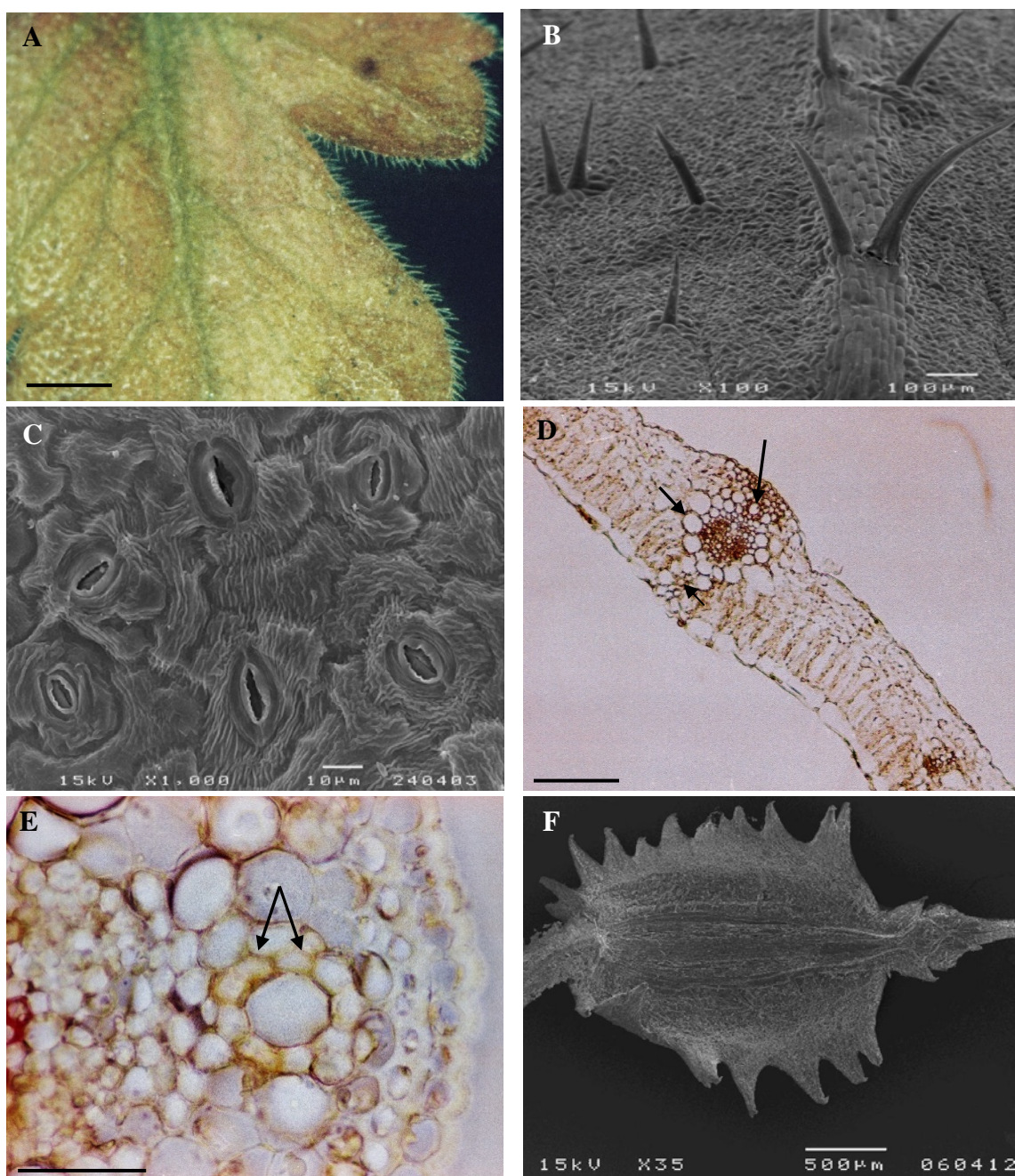
O presente estudo micromorfológico e molecular contribui para o esclarecimento na identificação e classificação de espécies vegetais pertencentes ao género *Tornabenea*. Tal esclarecimento não tinha sido possível com a metodologia tradicional.

A obtenção de resultados é rápida e segura, necessitando de pequenas quantidades de materiais. As metodologias aqui usadas podem ser aplicadas a qualquer material biológico, para a confirmação de composição, despiste de contaminantes e adulterações, constituindo também um significativo avanço na certificação da qualidade, segurança de diferentes amostras.

REFERÊNCIAS

- AESGP (1998), Herbal medicinal products in the European Union. In *The Association of the European Self-Medication Industry Study carried out on behalf of the European Commission*, Belgium, 1 – 104.
- BLATTNER F. (1999), Direct Amplification of entire ITS region from poorly preserved plant material using recombinant PCR. *BioTechniques*. 27: 1180 – 1186.
- CHEVALIER A. (1935), Plants nouvelles de l'Archipel des Iles du Cap Vert. *Bulletin du Museum d'Histoire Naturelle*. Paris, sér. 2, 7: 137-144.

- EVANS W. C. (2002), *Trease and Evans Pharmacognosy* (15th edition). Saunders Company Ltd., London. 585 pp.
- GROSSO A C, RODRIGUES L, GOMES I, MARTINS E., TEIXEIRA G. (2008), Preliminary data on microcharacters and chromosome number in *Tornabenea* species (Apiaceae) from Cape Verde Islands. *Plant Biosystems*, 142: 87 – 93
- HANSEN A., SUNDING P. (1993), Flora of Macaronesia. Checklist of vascular Plants, 4. Revised ed. *Sommerfeltia* 17: 30
- HAYAT M. (1981), *Principles and techniques of electron microscopy. Biological Applications* (2nd edition). Edward Arnold Publ., London. 234 pp.
- JOBES D., THIEN L. (1997), A Conserved Motif in the 5,8S Ribosomal RNA (rRNA) Gene is a Useful Diagnostic Marker for Plant Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. *Plant Molecular Biology Reporter*. 15: 326 – 334.
- KUMAR S., TAMURA K., NEI M. (2004), MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5:150-163.
- KUZOFF R.K., SWEERE J.A., SOLTIS D.E., SOLTIS P.S., ZIMMER E.A. (1998), The Phylogenetic Potential of Entire 26S rDNA Sequences in Plants. *Molecular Biology Evolution*, 15(3): 251–263.
- LINDE, K., RIET, G., HONDRAS, M., VICKERS, A., SALLER, R., MELCHART, D. (2001), Systematic reviews of complementary therapies – an annotated bibliography. Part 2: Herbal medicine. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 1 – 5 (in <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/1/5>) (acesso Jan 2005).
- METCALFE C., CHALK L. (1950), *Anatomy of Dicotyledons*. Volume 1. Clarendon Press, Oxford Sciences Publication, Oxford. Pp. xii – xix; 712 – 724.
- PLUNKETT G.M., SOLTIS D.E., SOLTIS P.S. (1997), Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on matK and rbcL sequence data. *American Journal of Botany*, 84: 565–580.
- PHILLIPS, G. (2001), Quality and safety of herbal medicines: changing attitudes towards control. *Pharmaceutical Journal*, 267: 484-485.
- STUART P., ILIA J. LEITCH, M. D. BENNETT, M. W. CHASE, A. R. LEITCH (2000), Ribosomal DNA evolution and phylogeny in Aloe (Asphodelaceae). *American Journal of Botany*, 87:1578-1583.
- SPALIK K., DOWNIE S.R. (2006), The Evolutionary History of Sium Sensu Lato (Apiaceae): Dispersal, Vicariance and Domestication as Inferred from its rDNA Phylogeny. *American Journal of Botany* 93(5): 747–761.
- STACE, C. (1989), *Plant Taxonomy – Biosystematics*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge. pp 67 – 85.
- VARGAS P., BALDWIN B., CONSTANCE L., (1998), Nuclear ribosomal DNA evidence for a Western North American Origin of Hawaiian and South American species of *Sanicula* (Apiaceae). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 235-240.
- VARGAS P., (2000), A phylogenetic study of *Saxifraga* sect. *Saxifraga* (Saxifragaceae) based on nrDNA ITS sequences. *Plant Systematics Evolution*, 223: 59-70.
- WHO. (1998), *Guidelines for the Appropriate Use of Herbal Medicines*, Regional Office for Western Pacific, Manila.



Estampa 1. **A** - lupa; **B**, **C** e **F** - MEV; **D** e **E**, - MO. **A** – *T. insularis*, pormenor de folha pubescente, página inferior (10x, barra = 2 mm); **B** – *T. insularis*, pormenor de folha pubescente, página inferior; **C** – *T. insularis*, pormenor de tecido epidérmico, página inferior; **D** – *T. annua*, corte transversal de folha: bainha dos vasos condutores (seta média); canal secretor superior (seta pequena); canal secretor inferior (seta grande) (200x, barra = 100 µm); **E** – *T. annua*, pormenor de canal secretor com anel de células secretoras envolvente (setas) (800x, barra = 15 µm); **F** – *T. annua*, mericarpo, vista dorsal.

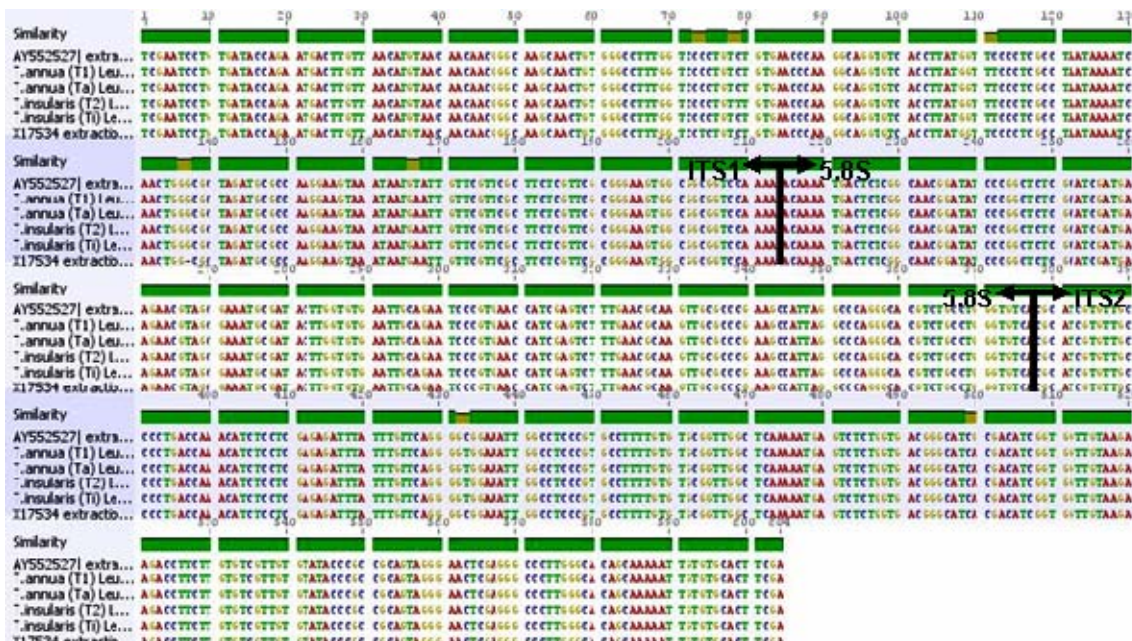


Figura 1 - Alinhamento múltiplo das seqüências para as amostras T1, T2, Ta e Ti para a região ITS com os primers C28kj/Leu1 e das seqüências X17534 e AY552527.

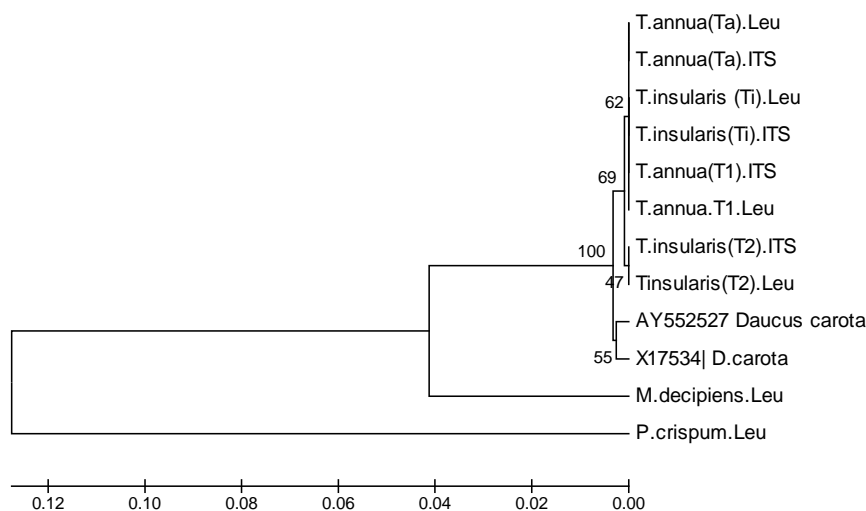


Figura 2 – Dendrograma baseado nas seqüências nucleotídicas da região ITS, obtido com o programa MEGA versão 3.1, utilizando o algoritmo Neighbor-Joining.