



ANALISE BIOINFORMÁTICA PARA O DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES PARA O GENE *MATK* DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA ASTERACEAE VISANDO O CONTROLE DE QUALIDADE DE FITOTERAPICOS

Luiz Henrique da Silva Linhares¹, Marília Alves de Lima¹, Bruna Corina Silva de Lima¹, Alice Conceição Moraes Florêncio¹, Rodrigo Juan Martins Cardozo¹, Claudia Sampaio Andrade Lima¹, Ricardo Yara²

¹Laboratório de Biofísica Química, UFPE

²Departamento de Engenharia Biomédica, UFPE

ricardo.yara@gmail.com

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é uma prática que cresceu significativamente nos últimos anos, isto está relacionado com o resgate de ampla gama de conhecimentos a respeito das mesmas que foi acumulado por comunidades e grupos étnicos. Em regiões menos privilegiadas os tratamentos de enfermidades através do uso de plantas medicinais representam os únicos recursos para estas populações. Neste sentido, fitoterápicos produzidos a base dessas plantas são comercializados em feiras livres, mercados populares em diferentes regiões do país inclusive em grandes cidades (Maciel et al., 2001).

A venda destes produtos muitas vezes não possui certificado de qualidade e a produção é feita a partir de plantas não validadas, logo, as mesmas são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Além da possibilidade de intoxicação por plantas erroneamente identificadas e utilizadas que acaba se constituindo em um problema de saúde pública.

Os efeitos adversos das possíveis adulterações de lotes, contaminações e toxidez são frequentes (Junior et al., 2005). Em geral isto ocorre devido a equívocos na identificação das plantas a serem utilizadas, uma vez que a nomenclatura popular de diversas plantas medicinais pode variar de acordo com as regiões do país.

A família Asteraceae é a maior dentre as Angiospermae, compreendendo aproximadamente 23 mil espécies, pertencentes a 1.535 gêneros, dispostos em 17 tribos (Judd et al., 2009). Sendo que muitas das espécies de Asteraceae são utilizadas como plantas medicinais. A espécie *Acmella radicans*, por exemplo, é bastante utilizada em tratamento de inflamações, infecções, febre, tosse, resfriado, disenteria e como analgésico para aliviar dores de dente (Rios-Chavez et al., 2003).

Nos estudos de sistemática molecular de plantas, o gene da maturase K (*matK*) tem se consolidado como um o principal gene para estudos taxonomicos e filogenéticos quando comparado a outros genes, como *rbcL* e *trnT-F* (Barthet e Hilu., 2007). Ademais, as informações de sequência do *matK* geram filogenias tão robustas quanto as construídas a partir de conjuntos de dados constituídos por outros genes combinados (Hilu et al., 2003).

Baseado na necessidade de identificar se os fitomedicamentos comercializados realmente possuem os extratos vegetais descritos, a utilização de ferramentas genéticas baseado no gene *matK* é interessante pois esta possui alta correlação filogenética com diversos taxons. Entretanto, sendo este um gene relativamente

grande, existe a dificuldade de detecção deste em produtos acabados devido a problemas de integralidade dos ácidos nucleicos destas amostras.

Neste sentido, iniciadores que possam realizar amplificações de trechos menores tem importância, já que poderão amplificar o DNA a partir de amostras degradadas, possibilitando o controle de qualidade e de rastreabilidade do produto.

O objetivo do trabalho foi realizar análise de bioinformática para desenvolver iniciadores que possam promover amplificações de trechos de DNA com até 500 pb da espécie *Acmella radicans*, e que também possam ser utilizados em outras espécies da família Asteraceae.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizando as sequências disponíveis no GenBank, foram realizadas duas análises de alinhamento de iniciadores, com auxílio da ferramenta BLAST - BASIC local alignment search tool, em espécies da família Astraceae.

A primeira análise foi para verificar quais iniciadores da literatura que melhor pareavam na sequência *matK* da *Acmella radicans* (GenBank AY215758.1), para que possam vir a realizar amplificações de trechos com no máximo 500 pares de bases. Para esta análise foram utilizando os iniciadores forward *matK*-490 (5'-GAAATCTTGGTTCAAAYCCTTCG-3' Hilu et al., 2003), Reverse *matK*-1483 (5'-CCAAATACCAAATCCGWCTCTA-3' Suwanchaikasam, et al., 2013), forward *matK*-390 (5'-CGATCTATTCATTCAATATTTTC-3', forward *matK*-Kim1R 5'-ACCCAGTCCATCTGGAATCTTGGTTC-3', reverse *matK*-Kim3F 5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3' Fazekas et al., 2012), forward *matK*-1 (5'-ACTGTATCGCACTATGTATCA-3' Marx et al., 2010), e forward *matK*-XF (5'-TAATTTACGATCAATTCATTC-3' Forde et al., 2009).

Em seguida, utilizando a ferramenta para o desenvolvimento de novos iniciadores "primer-BLAST", foram projetados sete novos iniciadores para as áreas restantes da sequência, onde não havia cobertura de análise. Os iniciadores criados foram: forward *matK*-Gold (5'-GAAGCGAGGGATTCGTCAT-3'), reverse *matK*-Ace (5'-GCCATGGGGCCTTATCCATT-3'), forward *matK*-Plus (5'-GTCAATTTCAAGTTGGGTCG-3'), reverse *matK*-888 (5'-GCTTGAAAAGCCCTGGCAAA-3'), forward *matK*-Jus (5'-ATCGTTCAAGTGTGCGGCTA-3'), forward *matK*-Evo (5'-CAGACTCCATTTTGGGGCA-3'), e o reverse *matK*-Luck (5'-ACCTTACCCAGCTCATCTGG-3').

Na segunda análise, dois iniciadores da primeira análise (forward 1 e reverse 1483) e os sete criados pelo Iniciador-BLAST, mais uma vez com auxílio da ferramenta BLAST, foram analisados para verificar em quais outras espécies da família Asteraceae, podem ser utilizados. Foram estudadas sequências de *Helianthus annuus* (GenBank AY215805.1); *Acanthospermum australe* (GenBank AY215757.1); *Chromolaena odorata* (GenBank KJ637187.1); *Lactuca sativa* (GenBank GU109304.1); *Solidago virgaurea* (GenBank KP175127.1); *Calendula officinalis* (GenBank KM356075.1); *Solidago litoralis* (GenBank KP175130.1); *Vernonia baldwinii* (GenBank KT176587.1); *Acanthospermum hispidum* (GenBank FJ789804.1); *Artemisia tridentata* (GenBank AF456776.1); *Solidago canadensis* (GenBank MF159464.1); e *Artemisia vulgaris* (GenBank JN894753.1).

Através da ferramenta computacional Oligoanalyzer foi realizado o último procedimento, onde foi verificada algumas informações específicas sobre os iniciadores, tais como Temperatura de Fusão, Peso Molecular, possibilidade de formação de Estrutura em Grampo e a temperatura de fusão que isso ocorre, possibilidade de formação de homodímeros e heterodímeros etc.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira análise apenas dois dos iniciadores utilizados se parearam de forma adequada para seguir a proposta de delimitação de trechos com 500 pb, já que os outros ou não se parearam adequadamente ou foram identificados outros problemas como formação de heterodímeros, o que não ocasionaria amplificações. O forward 1 e o reverse 1483, foram os iniciadores que permaneceram e, juntos com os iniciadores criados no primer-Blast, foi possível delimitar a sequência em sete trechos, onde nenhum deles ultrapassou o limite de 500 pb.

A cobertura do gene *matK* foi quase total, e ocasionou uma perda de 8 pb entre sequências, no início da sequência a perda foi de 27 pb, antes do iniciador *matK* Forward Gold. Já no final da sequência, após o iniciador *matK* Reverse 1483, a perda foi de 81pb. A figura 1 mostra detalhadamente onde cada iniciador se alinha na sequência *matK* da *Acmella radicans*.

Na figura 2 é mostrado a cobertura do gene dos prováveis produtos de amplificação (Figura 2A), bem como o tamanho do produto de amplificação esperado para cada trecho (Figura 2B).

Nas aplicações de PCR, a sequência do iniciador tem papel fundamental para que o ensaio ocorra de maneira eficaz. Por isso, a informação dos iniciadores obtidos através da análise foi importante para averiguar se os devidos pares irão conseguir realizar as amplificações dos trechos. É preciso, por exemplo, que a temperatura de anelamento do par de iniciadores seja semelhante, ausência de complementaridade entre as extensões 3' para que não ocorra formação de dímeros, evitar sequências palindrômicas e ter uma temperatura de fusão em torno de 50° e 90° C. Na tabela 1 é mostrado algumas informações específicas de cada um dos iniciadores utilizados.

Tabela 1. Algumas informações dos iniciadores utilizados. Fonte: Linhares, 2017.

Iniciadores G.	Qtd de bases	T. de Fusão	Peso M.	Qtd de GC	Qtd de E. em
F. Gold	20	57.1 °C	6182.1 g/mole	55 %	3
F. Plus	20	54.0 °C	6179 g/mole	50 %	1
F. 1	21	50.6 °C	6380.2 g/mole	38.1 %	5
F. Evo	20	55.6 °C	6108 g/mole	50%	2
F. Jus	20	56.9 °C	6148 g/mole	50 %	4
R. Ace	20	57.8 °C	6151 g/mole	55 %	2
R. 888	20	56.9 °C	6099 g/mole	50 %	3
R. 1483	23	55.1 °C	7189.7 g/mole	43.5 %	10
R. Luck	20	56.4 °C	6012.9 g/mole	55 %	1

>AY215758.1 Acmella radicans maturase K
(matK) gene, complete cds; chloroplast

[illegible]**VERDE: FORWARD MATK GOLD**

AMARELO ESCURO: REVERSE MATK ACE

VIOLETA: FORWRAD MATK PLUS

AZUL: FORWRAD MATK 1

AMARELO: FORWARD MATK EVO

CINZA: REVERSE MATK LUCK

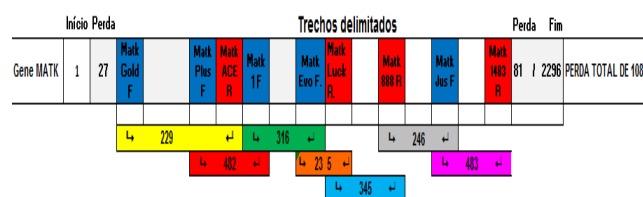
AZUL PETRÓLEO: REVERSE MATK 888

VERMELHO: FORWRAD MATK JUS

TURQUESA: REVERSE MATK 1483

Figura 1. Sequência *matK* da *Acmella radicanis* com a localização de cada iniciador. Fonte: os autores.

A



B

MATK GOLD F + MATK ACE R = 229PB
MATK PLUS F + MATK 1 R = 482PB
MATK 1 F + MATK EVO R = 316PB
MATK EVO F + MATK LUCK R = 235PB
MATK LUCK F + MATK 888 R = 345PB
MATK 888 F + MATK JUS R = 246PB
MATK JUS F + MATK 1483 R = 483PB

Figura 2. Características dos iniciadores e os possíveis produtos de amplificação (A) Imagem da localização dos parâmetros dos iniciadores espacial da delimitação; (B) Tamanho esperados dos produtos de amplificação. Fonte: os autores.

Os iniciadores puderam ser satisfatoriamente pareados com as sequências do gene *matK* das doze espécies da família Asteraceae analisadas. Onde algumas tiveram maior número de nucleotídeos pareados que outros.

Em todos os casos, a falha do pareamento não prejudicou em teoria a funcionalidade do iniciador. Na figura 3 é mostrado uma lista das espécies em que os iniciadores pareiam completamente. Nesta análise não foram consideradas a possibilidade de utilização de iniciadores degenerados, o que amplificaria o “range” de espécies com pareamento completo.

Matk Gold F	Matk Ace R.	Matk Plus F.	Matk 1 F.	Matk Evo F.
<i>Solidago litoralis</i>	<i>Acanthospermum australe</i>	<i>Solidago litoralis</i>	<i>Solidago litoralis</i>	<i>Vernonia baldwinii</i>
<i>Helianthus annuus</i>		<i>Helianthus annuus</i>	<i>Solidago virgaurea</i>	<i>Acanthospermum australe</i>
<i>Acanthospermum australe</i>		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Acanthospermum australe</i>	<i>Lactuca sativa</i>
<i>Lactuca sativa</i>		<i>Acanthospermum australe</i>	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Acanthospermum hispidum</i>
<i>Calendula officinalis</i>		<i>Calendula officinalis</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Helianthus annuus</i>
			<i>Calendula officinalis</i>	

Matk Jus F.	Matk Luck R.	Matk 888 R.	Matk 1483 R.
<i>Acanthospermum australe</i>	<i>Chromolaena odorata</i>	<i>Chromolaena odorata</i>	<i>Solidago litoralis</i>
<i>Artemisia tridentata</i>	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Helianthus annuus</i>
<i>Lactuca sativa</i>	<i>Acanthospermum australe</i>	<i>Acanthospermum australe</i>	<i>Vernonia baldwinii</i>
<i>Helianthus annuus</i>	<i>Acanthospermum hispidum</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Chromolaena odorata</i>
<i>Chromolaena odorata</i>	<i>Solidago virgaurea</i>	<i>Solidago litoralis</i>	<i>Acanthospermum australe</i>
<i>Vernonia baldwinii</i>	<i>Vernonia baldwinii</i>	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Lactuca sativa</i>
<i>Solidago litoralis</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Vernonia baldwinii</i>	<i>Artemisia vulgaris</i>
<i>Calendula officinalis</i>	<i>Artemisia tridentata</i>		

Figura 3. Lista de outras espécies da família Asteraceae que tiveram pareamento completo dos iniciadores com sequências do gene *matK* de diversas espécies. Fonte: os autores.

CONCLUSÕES

A partir das análises de pareamento e das informações obtidas dos iniciadores, há um forte indício de que haverá a obtenção de amplificações dos trechos. Uma vez que possam ser utilizados, esses iniciadores vão servir para identificação das espécies, atuando como um controle de qualidade dos fitomedicamentos.

REFERÊNCIAS

- BARTHET, M. M.; HILU, K. W., 2007. Expression of *matK*: functional and evolutionary implications. *American Journal of Botany* 94: 1402-1412.
- BLAST - BASIC local alignment search tool. Acesso em 20, Ago, 2017. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
- FAZEKAS, A.J., KUZMINA, M.L., NEWMASER, S.G., HOLLINGSWORTH, P.M. DNA Barcoding Methods for Land Plants W. John Kress and David L. Erickson (eds.), DNA Barcodes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 858, DOI 10.1007/978-1-61779-591-6_13, Springer Science Business Media, LLC 2012.
- FORD CS, AYRES KL, HAIDER N, TOOMEY N, VAN-ALPEN-STOHL J, (2009) Selection of candidate DNA barcoding regions for use on land plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 1-11.

HILU, K. W., T. BORSCH, K. MÜLLER, D. E. SOLTIS, P. S. SOLTIS, V. SAVOLAINEN, M.W. CHASE, M. P. POWELL, L. A. ALICE, R. EVANS, H. SAUQUET, C. NEINHUIS, T. A. B. SLOTTA, G. R. JENS, C. S. CAMPBELL, L. W. CHATROU. 2003. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *American Journal of Botany* 90: 1758-1776.

Primer - Blast. Acesso em 15, Set, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F., DONOGHUE, M.J. 2009. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3ª ed. Artmed, Porto Alegre. 612p.

JUNIOR, V.F.V., PINTO, A.C., MACIEL, M.A.M., 2005. Plantas Medicinais: Cura segura? *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

MACIEL, M.A.N., PINTO, A.C., JUNIOR, V.F.V., 2002. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 3, 429-438, 2002.

MARX HE, O'LEARY N, YUAN Y-W, LU-IRVING P, TANK DC, MÚLGURA M, OLMSTEAD RG. 2010. A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. *American Journal of Botany* 97: 1647-1663.

OligoAnalyzer 3.1. Acesso em 15, Set, 2017. Disponível em: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>

Reverse Complement. Disponível em: https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

RIOS-CHAVEZ, P., RAMIREZ-CHAVEZ, E., ARMENTA, C. ; TORRES, M., J. Plant, 39, 2003, 37-41.

SUWANCHAIKASAM, P., PHADUNGCHAREON, T., SUKHADA, S., 2013. Authentication of the Thai medicinal plants sharing the same common name 'Rang Chuet': *Thunbergia laurifolia*, *Crotalaria spectabilis*, and *Curcuma aff. amada* by combined techniques of TLC, PCR-RFLP fingerprints and antioxidant activities. *Science Asia*. 39:124-133.