

**Universidade de Coimbra**

Faculdade de Farmácia

**Desenvolvimento de metodologias de biologia molecular  
para a deteção de *Cynara scolymus* e *Silybum marianum* em  
suplementos alimentares à base de plantas**

**Andreia Filipa Simões Batista**

**Orientador externo:** Doutora Isabel Maria Sousa Gomes Mafra

**Orientador interno:** Professor Doutor Fernando Jorge dos Ramos

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar apresentada à

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**Coimbra, julho de 2015**





“The food you eat can be either the safest &  
most powerful form of medicine or  
the slowest form of poison.”

Ann Wigmore



## **Agradecimentos**

Durante este ano, onde quase tudo foi novo, foram muitas as pessoas que me acompanharam e permitiram chegar ao fim desta etapa. Desta forma agradeço:

À Doutora Isabel Mafra, pela oportunidade que me deu com este projeto, pelos novos conhecimentos adquiridos, por toda a ajuda fornecida, pela disponibilidade constante, pelas palavras de incentivo e pela confiança que depositou em mim e no meu trabalho.

À Professora Doutora Beatriz Oliveira, por me ter aceite sem hesitação no laboratório de Bromatologia da FFUP e por ter disponibilizado todos os recursos necessários para o decorrer do meu trabalho.

Ao Professor Doutor Fernando Ramos, por aceitar o meu pedido de coorientação e se mostrar disponível para ajudar nos diferentes passos de cada etapa.

À Joana Costa, por toda a paciência e disponibilidade para me ensinar tudo o que foi necessário para o desenvolvimento deste trabalho, desde a prática à escrita, e, não menos importante, pelo companheirismo e boa disposição.

À Professora Doutora Joana Amaral pela oportunidade que me ofereceu com este trabalho, por toda a ajuda fornecida e disponibilidade sempre manifestada.

Ao Telmo e Alexandra, por toda a ajuda e a disponibilidade prestadas, assim como pelo companheirismo ao longo deste ano.

À Cristina, minha companheira de jornada, pela troca de ideias e partilha de dúvidas e incertezas.

A todas as pessoas do laboratório, pela simpatia com que me receberam e pelos momentos de descontração.

À Inês, pela amizade e que apesar da distância sempre esteve presente para me ouvir, aconselhar e ajudar.

Ao Paulo, por toda a ajuda, preocupação, motivação,... enfim por tudo! Especialmente por estar sempre presente, por me saber compreender (e aturar...) e pelo amor e carinho que sempre teve.

Com especial carinho aos meus pais e à minha irmã, por sempre acreditarem em mim, por nunca me deixarem desistir, por todo o amor e carinho e por todo o esforço que fizeram para eu poder chegar até aqui. Sem eles não teria conseguido.

**Obrigada!**



## Resumo

As plantas *Cynara scolymus* L. (Alcachofra) e a *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Cardo mariano) têm sido frequentemente incluídas em suplementos alimentares devido às suas propriedades benéficas para a saúde. De acordo com a Diretiva 2002/46/CE, os suplementos alimentares são considerados alimentos, não sendo por isso sujeitos a qualquer avaliação de segurança, qualidade ou eficácia antes da sua comercialização. Esta limitação no seu controlo pode facilitar potenciais adulterações, como a troca intencional ou acidental de material vegetal. Deste modo, metodologias analíticas específicas, tais como as baseadas na análise de ADN constituem ferramentas fundamentais para a avaliação da autenticidade destes produtos.

Assim, o objetivo deste trabalho consistiu na deteção de alcachofra e cardo mariano em suplementos alimentares para a perda de peso, usando as técnicas de PCR qualitativa e PCR em tempo real com análise por *high resolution melting* (HRM). Para tal, foram utilizadas sementes destas plantas, catalogadas por bancos de germoplasma (nacional e internacionais), e de espécies filogeneticamente próximas a estas, totalizando 43 espécies de plantas medicinais, e 17 suplementos alimentares contendo alcachofra e/ou cardo mariano.

Os extratos de ADN de todas as amostras de plantas e suplementos alimentares foram amplificados por PCR qualitativa, tendo como alvo regiões nucleares (18S rRNA) e dois genes cloroplastidiais (*rbcl* e *matK*). Os *primers* EG-F/EG-R desenhados na região nuclear foram os que apresentaram maior universalidade e capacidade de amplificação do ADN das amostras de suplementos. A especificidade dos *primers* com alvo numa região genómica da *C. scolymus* foi testada por PCR qualitativa, verificando-se que estes permitiam a amplificação de diferentes espécies do género *Cynara*. A aplicação do método possibilitou a deteção de *Cynara* spp. em algumas das amostras de suplementos alimentares. O desenvolvimento de um sistema de PCR em tempo real com análise HRM permitiu discriminar a *C. scolymus* das restantes espécies, com um nível de confiança acima de 99,4% e, ainda, confirmar a presença inequívoca de *C. scolymus* nos suplementos testados (nível de confiança >98,8%). Para a deteção de *S. marianum*, conseguiu-se desenvolver um método de PCR qualitativa específico para a espécie, mas a sua aplicação não permitiu detetar a presença de cardo mariano nos suplementos alimentares analisados.

Palavras chave: PCR, HRM, alcachofra, cardo mariano, autenticidade, suplementos alimentares à base de plantas

## Abstract

*Cynara scolymus* L. (artichoke) and *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Marian thistle) are frequently included in plant food supplements (PFS), owing to their beneficial health properties. According to Directive 2002/46 / EC, food supplements are defined as foods, so they are not subject to any quality, efficacy or safety assessments prior to their commercialisation. Thus, these products are often subjected to fraudulent practices, such as the intentional or accidental exchange of plant material. To assess their authenticity, the development of reliable and specific analytical methods is of utmost importance.

With this work, it was intended the development of DNA-based methods, namely qualitative polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR coupled with high resolution melting analysis (HRM) for the detection of *C. scolymus* and *S. marianum* in food supplements for weight loss. For this purpose, seeds from these plants and other genetically related species provided by banks cataloged germplasm (national and international), totalising 43 medicinal plants, and 17 plant food supplements, containing artichoke and/or thistle, were used in this study.

DNA extracts from all samples of plants and food supplements were amplified by PCR qualitative, targeting the nuclear regions (18S rRNA) and two plastidial genes (*rbcl* and *matK*). The EG-F/EG-R primers that were designed a conserved nuclear region showed the greatest universality, enabling positive amplification of PFS. The specificity of the primers targeting the genomic region of *C. scolymus* was assayed by qualitative PCR, allowing the amplification of different species from *Cynara* genus. The application of the proposed qualitative PCR enabled the detection of *Cynara* spp. in some samples of PFS. The development of a real time PCR system coupled with HRM analysis allowed to discriminate *C. scolymus* from other species with a high level of confidence (99.4%). Using the proposed system, it was also possible to identify the presence of *C. scolymus* in the tested PFS (level of confidence >98.8%). For the detection of *S. marianum*, it was developed a species-specific qualitative PCR method, but its application did not allow detecting the presence of thistle in the PFS under study.

Keywords: PCR, HRM, artichoke, thistle, authenticity, plant food supplements



# Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Índice.....	ix
Índice de figuras.....	xi
Índice de tabelas.....	xvi
Lista de abreviaturas.....	xvii
COMPONENTE TEÓRICA.....	1
1 Suplementos alimentares.....	3
1.1 Suplementos alimentares à base de plantas para a perda de peso.....	4
1.2 Plantas medicinais usadas em suplementos alimentares à base de plantas para a perda de peso.....	5
1.2.1 <i>Cynara scolymus</i> L.....	5
1.2.2 <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.....	7
1.3 Enquadramento jurídico.....	9
1.4 Adulterações em suplementos alimentares à base de plantas.....	12
2 Métodos utilizados para a identificação de plantas em suplementos alimentares.....	13
2.1 Observação morfológica.....	13
2.2 Análise química.....	15
2.3 Marcadores moleculares.....	16
2.3.1 PCR.....	16
2.3.2 RAPD-SCAR.....	20
2.3.3 AFLP.....	22
2.3.4 Microssatélites.....	22
2.3.5 PCR em tempo real.....	23
2.3.6 Análise por HRM.....	27
2.3.7 Sequenciação de ADN.....	28
2.3.8 DNA barcoding.....	29
3 Objetivos e âmbito de trabalho.....	31
COMPONENTE EXPERIMENTAL.....	33
4 Material e métodos.....	35
4.1 Descrição e preparação das amostras.....	35

4.2	Reagentes e soluções.....	39
4.3	Métodos de extração de ADN.....	41
4.3.1	CTAB 1% PVP .....	41
4.3.2	NucleoSpin Plant II .....	42
4.4	Avaliação e quantificação do ADN extraído.....	42
4.5	Amplificação por PCR.....	43
4.5.1	Primers (Oligonucleótidos).....	43
4.5.2	PCR qualitativa .....	45
4.5.3	PCR em tempo real e análise <i>High Resolution Melting</i> (HRM) .....	46
4.5.4	Sequenciação.....	48
5	Resultados e discussão .....	49
5.1	Avaliação dos extratos de ADN de plantas medicinais e infusões .....	49
5.2	Avaliação dos extratos de ADN de sementes.....	51
5.3	Avaliação dos extratos de ADN de suplementos alimentares à base de plantas.....	52
5.3.1	Amostras sólidas.....	52
5.3.2	Amostras líquidas.....	56
5.4	Capacidade de amplificação dos extratos de plantas e sementes .....	56
5.4.1	Primers I8SRG-F/I8SRG-R e EG-F/EG-R.....	56
5.4.2	Primers rbcL-F1/rbcL-R1 e rbcL-F2/rbcL-R2.....	59
5.4.3	Primers matk-F2/matk-R2 .....	60
5.5	Capacidade de amplificação dos extratos de suplementos alimentares à base de plantas ...	63
5.5.1	Primers EG-F/EG-R.....	63
5.6	<i>Cynara scolymus</i> .....	66
5.6.1	PCR qualitativa .....	66
5.6.2	Identificação de <i>Cynara</i> spp. nos suplementos alimentares.....	67
5.6.3	Amplificação por PCR em tempo real.....	68
5.6.4	Análise por HRM .....	69
5.6.5	Sequenciação.....	71
5.7	<i>Silybum marianum</i> .....	72
5.7.1	PCR qualitativa .....	72
5.7.2	Identificação de <i>Silybum marianum</i> nos suplementos alimentares .....	73
5.7.3	Sequenciação.....	74
6	Conclusões .....	76
7	Bibliografia.....	78

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Planta de alcachofra ainda em desenvolvimento (esquerda) e flor de alcachofra (direita; retirado de Starr e Starr, 2007).....	6
<b>Figura 2</b> A) Estrutura química da cinarina (C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> ) (Retirado de PubChem,2015 (a)). B) Estrutura química do ácido clorogénico (C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> ) (Retirado de PubChem, 2015 (b))......	6
<b>Figura 3</b> Planta de cardo mariano (esquerda) e o do seu respetivo fruto (direita; retirado de López, [s.d.]) .....	8
<b>Figura 4</b> Estrutura química de silibina A (superior) e silibina B (inferior) (Retirado de PubChem, 2015 (c))......	9
<b>Figura 5</b> Representação esquemática das etapas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). (Adaptado de (Biolabs, [s.d.])). .....	19
<b>Figura 6</b> Representação esquemática das etapas de RAPD (Adaptado de Arif <i>et al.</i> , 2010). .....	20
<b>Figura 7</b> Representação esquemática das etapas envolvidas no método RAPD-SCAR (Adaptado de Kulkarni <i>et al.</i> , 2014).....	21
<b>Figura 8</b> Representação esquemática dos marcadores microssatélites. (Retirado de <a href="http://www.informatics.jax.org/silver/figures/figure8-10.shtml">http://www.informatics.jax.org/silver/figures/figure8-10.shtml</a> ).....	23
<b>Figura 9</b> Curva de amplificação obtida pela PCR em tempo real mostrando as diferentes fases da reação (Adaptado de Ahmed, Oncology e Jenkins, 2005). .....	24
<b>Figura 10</b> Dois métodos utilizados para obter sinais fluorescentes dos produtos da PCR em tempo real. (A) SYBR Green I; (B) As sondas TaqMan ®. (Adaptado de Xu, Yang e Cheng, 2011).....	25
<b>Figura 11</b> Curva de desnaturação ( <i>melting</i> ) de um ensaio de PCR em tempo real. A linha tracejada mostra a tendência da fluorescência durante o processo de aquecimento; a baixas temperaturas o ADN está na forma de cadeia dupla e a fluorescência é 100%. À medida que a temperatura aumenta, a dupla cadeia de ADN desnatura e a fluorescência perde intensidade. Relativamente aos produtos amplificados são visíveis três picos: um à esquerda, com uma temperatura menor, que corresponde a uma curva de dissociação de dímeros de <i>primers</i> , e outros dois à direita, que correspondem a curvas de dissociação de dois produtos específicos amplificados. (Adaptado de Prada-Arismendy e Castellanos, 2011).....	26
<b>Figura 12</b> Principais regiões genómicas usadas como potenciais <i>DNA barcode</i> na identificação de plantas medicinais. Os resultados foram obtidos com base em pesquisas bibliográficas efetuadas na base de dados SciFinder entre os anos 2010-2013 usando as palavras-chave “DNA Barcode * medicinal plant”. (Adaptado de Techen <i>et al.</i> , 2014) .....	30
<b>Figura 13</b> Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico extraído pelo método CTAB-PVP de algumas plantas medicinais. Linha 1 – alcachofra (EM38); linha 2 – alcachofra (EM53); linha 3 – alcachofra (EM66); linha 4 – valeriana (EM43); linha 5 – dente de leão, linha 6 – cavalinha (EM24); linha 7 – cidreira (EM25); linha 8 – sálvia (EM28); linha 9 – cardo mariano (EM44) linha 10 – malva (EM65). M – marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). .....	49

**Figura 14** Eletroforese em gel de agarose do ADN genómico extraído pelo método NucleoSpin Plant II das sementes de alcachofra e cardo mariano (material de referência). Linhas 1 – *C. scolymus* (CyS1); linha 2 – *C. scolymus* (CyS1) (duplicado); linha 3 – *C. scolymus* (CyS2); linha 4 – *C. scolymus* (CyS2) (duplicado); linha 5 – *S. marianum* (SyM 1); linha 6 – *S. marianum* (SyM 1) (duplicado). M – Marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). ..... 52

**Figura 15** Eletroforese em gel de agarose do ADN genómico extraído pelo método NucleoSpin Plant II de algumas sementes filogeneticamente próximas às plantas de referência. Linha 7 – *Cirsium neomexicanum* (S4); linha 8 – *Cirsium quercetorum* (S5); linha 9 – *Cirsium scariosum* (S6); linha 10 – *Cirsium undulatum* (S7); linha 11 – *Jurinea consanguinea* (S8). M - marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido)..... 52

**Figura 16** Amostra SA30 gelificada..... 54

**Figura 17** Eletroforese em gel de agarose do ADN genómico extraído pelo método NucleoSpin Plant II das amostras sólidas de suplementos alimentares. Linha 1 – SA24; linha 2 – SA27; linha 3 – SA30; linha 4 – SA37, Linha 5 – SA41; linha 6 – SA42; linha 7 – SA44; linha 8 – SA40; linha 9 – SA43. M – Marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). ..... 55

**Figura 18** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas medicinais e chás com os primers 18SRG-F/18SRG-R (**A**) e EG-F/EG-R (**B**). Linha 1 - Erva príncipe (EM21); linha 2 – funcho (EM2); linha 3- dente-de-leão (EM23); linha 4 – cavalinha (EM24); linha 5-cidreira (EM25); linha 6 – camomila (EM26); linha 7- chá verde (EM 27); linha 8 – sálvia (EM28); linha 9- hortelã-pimenta (EM 29); linha 10 – borututu (EM30); linha 11 – carqueja (EM31) linha 12 – malva (EM32); linha 13 - sene (EM33); linha 14- mate verde (EM34); linha 15- tília (EM35); linha 16- uva-ursina (EM36); linha 17- S. Roberto (EM37). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.57

**Figura 19** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas medicinais e chás com os primers 18SRG-F/18SRG-R (**A**) e EG-F/ EG-R (**B**). Linha 1 – alcachofra (EM38); linha 2 – passiflora (EM39); linha 3 – boldo (EM40); linha 4 – verbena (EM41); linha 5 – espinheiro alvar (EM42); linha 6 – valeriana (EM43); linha 7 – cardo mariano (EM44); linha 8 – orégãos (EM45); linha 9 – manjeriço (EM46); linha 10 – coentros (EM47); linha 11 – açafão das índias (EM48); linha 12 – pés de cereja (EM49); linha 13 – lúcia-lima (EM50); linha 14 – eucalipto (EM51); linha 15 – ginkgo biloba (EM52); linha 16 – alcachofra 2 (EM53); linha 17 – castanheiro-da-índia (EM54). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo. .... 58

**Figura 20** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas medicinais e chás com os primers 18SRG-F/18SRG-R (**A**) e EG-F/EG-R (**B**). Linha 1 – Videira (EM55); linha 2 – alecrim (EM56); linha 3 – oliveira (EM57); linha 4 – figueira (EM58); linha 5 – camomila (EM59); linha 6 – noqueira (EM60); linha 7 – procolesterol (EM61); linha 8 – chá cardio (EM62); linha 9 – chá alcachofra e dente-de-leão (EM63); linha 10 – chá gorduras localizadas (EM64); linha 11 – malva (EM65); linha 12 – alcachofra 3 (EM66); linha 13 – chá plantas mistura (EM67); linha 14 – chá detox (EM68); linha 15 – lúcia-lima (EM52); linha 16 – *Cynara humilis* (S1); linha 17 – *Cynara cardunculus* (S2). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo..... 58

**Figura 21** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas medicinais com os primers rbcL-F1/rbcL-R1. Linha 1 – erva príncipe (EM21); linha 2 – funcho (EM22); linha 3 – dente-de-leão (EM23); linha 4 – cavalinha (EM 4); linha 5 – cidreira (EM

5); linha 6 – camomila (EM26); linha 7 – chá verde (EM27); linha 8 – sálvia (EM28); linha 9 – hortelã-pimenta (EM29); linha 10 – carqueja (EM31) linha 11 – malva (EM32); linha 12 – sene (EM33); Linha 13 – alcachofra (EM38); Linha 14 – alcachofra 3 (EM66); linha 15 – valeriana (EM43); linha 16 – alcachofra 2 (EM53); linha 17 – alecrim (EM56). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo. .... 59

**Figura 22** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas medicinais com os *primers* rbcL-F2/rbcL-R2. Linha 1 – erva príncipe (EM21); linha 2 – funcho (EM22); linha 3 – dente-de-leão (EM23); linha 4 – cavalinha (EM24); linha 5 – cidreira (EM25); linha 6 – camomila (EM26); linha 7 – chá verde (EM27); linha 8 – sálvia (EM28); linha 9 – hortelã-pimenta (EM29); linha 10 – carqueja (EM31); linha 11 – malva (EM32); linha 12 – sene (EM33); linha 13 – hipericão; linha 14 – alcachofra 3 (EM66); linha 15 – valeriana (EM43); linha 16 – alcachofra 2 (EM53); linha 17 – mate verde (EM34). M – Marcador molecular 100bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo. .... 60

**Figura 23** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas medicinais com os *primers* rbcL-F1/rbcL-R1. Linha 1 – erva príncipe (EM21); linha 2 – funcho (EM22); linha 3 – dente-de-leão (EM23); linha 4 – cavalinha (EM24); linha 5 – cidreira (EM25); linha 6 – camomila (EM26); linha 7 – chá verde (EM27); linha 8 – sálvia (EM28); linha 9 – hortelã-pimenta (EM29); linha 10 – carqueja (EM31) linha 11 – malva (EM32); linha 12 – sene (EM33); linha 13 – alcachofra (EM38); linha 14 – alcachofra 3 (EM66); linha 15 – valeriana (EM43); linha 16 – alcachofra 2 (EM53); linha 17 – alecrim (EM56). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo. .... 61

**Figura 24** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras sólidas de suplementos alimentares com os *primers* EG-F/EG-R. **A** – Amostras sólidas que foram sujeitas ao pré-tratamento com tampão fosfato 1 M (pH 8; 15% de etanol); **B** – Amostras sólidas sem pré-tratamento. Linha 1 – SA24; linha 2 – SA27; linha 3 – SA30; linha 4 – SA37; linha 5 – SA40; linha 6 – SA41; linha 7 – SA42; linha 8 – SA43; linha 9 – SA44. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP- Controlo positivo; CN – Controlo negativo. .... 63

**Figura 25** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras sólidas, sem pré-tratamento, de suplementos alimentares com os *primers* 18SRG-F/18SRG-R (**A**) e rcbL-R1/rcbL-F1 (**B**). Linha 1 – SA24; linha 2 – SA27; linha 3 – SA30; linha 4 – SA37; linha 5 – SA41; linha 6 – SA42. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo. .... 64

**Figura 26** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras líquidas de suplementos alimentares com os *primers* EG-F/EG-R (**A**) e rbcL-F1/rbcL-R1 (**B**). Linha 1 – SA8; linha 2 – SA12; linha 3 – SA14; linha 4 – SA15; linha 5 – SA29; linha 6 – SA32; linha 7 – SA34; linha 8 – SA39. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo. .... 65

**Figura 27** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de algumas amostras de plantas e sementes. Linha 1 – chá planta mistura (EM67); linha 2 – chá detox (EM69); linha 3 – lúcia-lima; linha 4 – S1 (*Cynara humilis*); linha 5 – S2 (*Cynara cardunculus*); linha 6 – S9 (*Cynara syriaca*). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo. .... 66

**Figura 28** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de algumas amostras de sementes usando os *primers* CyS-FI/CyS-RI. Linha 1 – S1 (*C. humilis*); linha 2 – S2 (*C. cardunculus*); linha 3 – S9 (*C. syriaca*). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo. .... 67

**Figura 29** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras sólidas (**A**) e líquidas (**B**) de suplementos alimentares com os *primers* CyC-FI/CyC-RI. Legenda de **A**: Linha 1 – SA24; linha 2 – SA27; linha 3 – SA30; linha 4 – SA37; linha 5 – SA40; linha 6 – SA41; linha 7 – SA42; linha 8 – SA43; linha 9 – SA44. Legenda de **B**: Linha 10 - SA8; linha 11 – SA12; linha 12 – SA14; linha 13 – SA15; linha 14 – SA29; linha 15 – SA32; linha 16 – SA34; linha 17 – SA39. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo. .... 68

**Figura 30** Curva de desnaturação obtida pela amplificação das amostras do género *Cynara* por PCR em tempo real com o corante EvaGreen e com os *primers* CyC-FI/CyC-RI ..... 69

**Figura 31** Gráfico da curva de diferença por análise HRM, obtido após amplificação das amostras do género *Cynara* por PCR em tempo real com o corante EvaGreen e com os *primers* CyC-FI/CyC-RI. Cluster vermelho – *Cynara scolymus*; Cluster verde – *Cynara humilis* e *Cynara cardunculus*; Cluster azul – *Cynara syriaca*. .... 70

**Figura 32** Curvas de desnaturação normalizadas (**A**) e curvas de diferença por análise HRM (**B**), obtidas após amplificação das amostras do género *Cynara* e das três amostras sólidas de suplementos alimentares por PCR em tempo real com o corante EvaGreen e com os *primers* CyC-FI/CyC-RI. Cluster vermelho – *Cynara scolymus* mais as três amostras sólidas de suplementos alimentares; Cluster verde – *Cynara humilis* e *Cynara cardunculus*; Cluster azul – *Cynara syriaca*. .... 70

**Figura 33** Alinhamento dos produtos das espécies de *Cynara* spp. com a sequência da espécie *C. scolymus* retirada do GenBank com o número de acesso JX535388.1 obtidos por amplificação com os *primers* CyC-FS/CyC-RS. .... 71

**Figura 34** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas com os *primers* SyM-FI/ SyM-RI. Linhas 1-3 – Cardo mariano (EM44); linha 4 – boldo (EM40); linha 5 – verbera (EM41); linha 6 – espinheiro alvar (EM42); linha 7 – valeriana (EM43); Linha 8 – oregão (EM45); linha 9 – manjerição (EM46); linha 10 – coentro (EM47); linha 11 – açafão das Índias (EM48); linha 12 – pés de cereja (EM49); linha 13 – lúcia-lima (EM50); linha 14 – eucalipto (EM51); linha 15 – ginkgo biloba (EM52); linha 16 – alcachofra 2 (EM53); linha 17 – videira (EM55). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo. .... 72

**Figura 35** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas com os *primers* Sil-FI/Sil-RI. Linha 1-2 – Cardo mariano (EM44); linha 3 – boldo (EM40); linha 4 – verbera (EM41); linha 5 – espinheiro alvar (EM42); linha 6 – valeriana (EM43); linha 7 – oregão (EM45); linha 8 – manjerição (EM46); linha 9 – coentro (EM47); linha 10 – açafão das Índias (EM48); linha 11 – pés de cereja (EM49); linha 12 – lúcia-lima (EM50); linha 13 – eucalipto (EM51); linha 14 – ginkgo biloba (EM52); linha 15 – alcachofra 2 (EM53); linha 16 – castanheiro da Índia (EM54); linha 17 – videira (EM55). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo. .... 73

**Figura 36** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras sólidas (**A**) e líquidas (**B**) de suplementos alimentares com os *primers* Sil-FI/Sil-

R1. Legenda de **A**: Linha 1 – SA24; linha 2 – SA27; linha 3 – SA30; linha 4 – SA37; linha 5 – SA40; linha 6 – SA41; linha 7 – SA42; linha 8 – SA43; linha 9 – SA44. Legenda de **B**. Linha 10 – SA8; linha 11 – SA12; linha 12- SA14; linha 13 – SA15; linha 14 – SA29; linha 15 – SA32; linha 16 – SA34; linha 17 – SA39. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo. .... 74

**Figura 37** Alinhamento do produto de PCR de *Silybum mariano* com a sequência da mesma espécie retirada do GenBank com o número de acesso JX535388.1..... 75

**Figura 38** Sequenciação do produto da planta *Silybum marianum*. As setas tracejadas indicam o emparelhamento dos *primers* Sil-F1/Sil-R1 e as setas contínuas, o emparelhamento dos *primers* Sil-FS/Sil-RS (sequenciação). .... 75

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> Descrição das amostras sólidas de suplementos alimentares utilizadas no estudo. ....	36
<b>Tabela 2</b> Descrição das amostras líquidas de suplementos alimentares utilizadas neste estudo. ....	37
<b>Tabela 3</b> Lista das espécies de referência em estudo (Cys1, Cys2 e SiM) e das plantas filogeneticamente próximas (SI-S9) com as respectivas origens. ....	38
<b>Tabela 4</b> Lista das amostras de plantas medicinais e infusões usadas com as respectivas marcas e origens. ....	38
<b>Tabela 5</b> Primers usados em PCR qualitativa. ....	44
<b>Tabela 6</b> Componentes e respectivas quantidades utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com diferentes <i>primers</i> . ....	45
<b>Tabela 7</b> Condições utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com diferentes <i>primers</i> . ....	46
<b>Tabela 8</b> Componentes e respectivas quantidades utilizados nas amplificações por PCR em tempo real com os <i>primers</i> CyC-FI/RI. ....	47
<b>Tabela 9</b> Condições utilizadas nas amplificações por PCR em tempo real e na análise por HRM com os <i>primers</i> CyC-FI/ CyC-RI. ....	47
<b>Tabela 10</b> Condições utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com os <i>primers</i> CyC-FS/CyC-RS e Sil-FS/ Sil-RS. ....	48
<b>Tabela 11</b> Valores das purezas e concentrações médias do ADN extraído das plantas medicinais e infusões. ....	50
<b>Tabela 12</b> Valores das purezas e concentrações médias do ADN extraído das sementes. ....	51
<b>Tabela 13</b> Valores das purezas e concentrações do ADN extraído pelo método NucleoSpin Plant II (protocolo 2) das amostras sólidas de suplementos alimentares. ....	53
<b>Tabela 14</b> Valores das purezas e concentrações do ADN extraído pelo método NucleoSpin Plant II (protocolo 1) das amostras sólidas de suplementos alimentares pré-tratadas com tampão fosfato IM (pH8; 15% de etanol). ....	55
<b>Tabela 15</b> Resultados das amplificações por PCR dos extratos de ADN das amostras de sementes usando os primers 18SRG-F/18SRG-R, EG-F/ EG-R e rbcL-FI/rbcL-RI. ....	61
<b>Tabela 16</b> Resultados das amplificações por PCR dos extratos de ADN das amostras de plantas medicinais e chás usando os <i>primers</i> 18SRG-F/18SRG-R, EG-F/EG-R e rbcL-FI/rbcL-RI. ....	62



## Lista de abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AFLP</b>	Amplified Fragment Length Polymorphisms
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>CBoL</b>	Consortium for the Barcode of Life
<b>Ct</b>	Cycle Threshold
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótido trifosfato
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>FDA</b>	Food and Drugs Administration
<b>HRM</b>	High Resolution Melting analysis (Análise de desnaturação de elevada resolução)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA
<b>SCAR</b>	Sequence Characterized Amplified Regions
<b>SciFinder</b>	Chemical Abstracts Service
<b>SSR</b>	Simple Sequence Repeat
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de desnaturação
<b>UE</b>	União Europeia
<b>UV</b>	Ultra-violeta



---

## **COMPONENTE TEÓRICA**

---



## I Suplementos alimentares

Nos últimos anos, a popularidade dos suplementos alimentares tem crescido a uma escala mundial. Esta aceitação deve-se à fácil acessibilidade, ao baixo custo relativo, ao facto de lhes serem associados/atribuídos benefícios à saúde e ao pensamento do consumidor sobre a ausência de efeitos colaterais tóxicos (Hedegaard, Rokkjær e Sloth, 2013).

A definição de suplemento alimentar é concordante na maioria dos países. Nos Estados Unidos da América (EUA), a *Food and Drugs Administration* (FDA) entende que os suplementos alimentares são um género alimentício destinado a ser ingerido, que contém um "ingrediente dietético", tal como vitaminas, minerais, ervas, aminoácidos, enzimas ou metabolitos (Anthony *et al.*, 2013), destinado a acrescentar mais valor nutricional à dieta (FDA, 2014; Petroczi, Taylor e Naughton, 2011). À semelhança da definição anterior, na União Europeia (UE), a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (AESA ou EFSA - *European Food Safety Authority*) define estes produtos como fontes concentradas de determinados nutrientes ou outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico, cuja finalidade é complementar a dieta normal (EFSA, 2013). Ambas as definições concordam, ainda, na forma como estes géneros alimentícios chegam ao consumidor final, podendo ser adquiridos de forma doseada, como por exemplo comprimidos, cápsulas, líquidos ou pó. (EFSA, 2013; FDA, 2014).

Atualmente, existe uma panóplia de suplementos alimentares, facilmente disponíveis no mercado, seja em farmácias, supermercados, hipermercados, ervanárias ou mesmo na internet. Estes produtos podem ser comercializados como substâncias únicas ou em combinação com outras substâncias. O leque de ingredientes que podem estar presentes nestes produtos é bastante variado, incluindo, entre outros, vitaminas, minerais, óleos, aminoácidos, ácidos gordos essenciais, fibras, plantas e extratos de ervas. Dependendo da sua composição, os suplementos alimentares são usados pela sociedade atual para os mais diversos fins, destacando-se o seu interesse na estética, no melhoramento do desempenho físico e intelectual, e na manutenção da saúde (Petroczi, Taylor e Naughton, 2011).

Devido ao elevado interesse e procura destes produtos, a indústria dos suplementos alimentares tem-se revelado um importante setor de negócio em muitos países desenvolvidos (Petroczi, Taylor e Naughton, 2011). Em 2013, o consumo de suplementos alimentares foi estimado, a nível global, pelo *Nutrition Business Journal* no qual é referido que o valor em vendas excedeu os 100 biliões de dólares americanos. Cerca de um terço deste consumo global diz respeito à população adulta dos Estados Unidos da América (EUA), com

34,9 bilhões de dólares em vendas em 2013: um crescimento de 7,4% em relação a 2012 (Daily e Spellman, 2014).

De facto, os EUA lideram a lista dos dez principais mercados de suplementos alimentares, seguindo-se a China e o Japão. O mercado europeu também está posicionado nesta lista, com a Itália e a Alemanha representadas na quinta e oitava posição, respetivamente (Harrison-Dunn, 2014).

Em Portugal, o consumo de suplementos alimentares foi caracterizado em 2006, através da realização de um inquérito pela Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). Este estudo envolveu 1247 indivíduos, residentes em Portugal continental, com idades iguais ou superiores a dezoito anos (Falcato, 2014). Através dos resultados do inquérito verificou-se que 81% dos inquiridos consumia ou já alguma vez tinha consumido estes produtos em 2006, sem ser pela primeira vez, sendo por isso considerados consumidores habituais (Costa *et al.*, 2012 (a)).

Dentro deste consumo geral de suplementos alimentares, vários estudos apontam as categorias das vitaminas e minerais como as mais procuradas, tal como acontece nos EUA e em Portugal (Costa *et al.*, 2012 (a); Falcato, 2014; Harrison-Dunn, 2014). No entanto, apesar de menos adquiridos que os anteriores, os suplementos à base de plantas são também muito requisitados pelos consumidores, com o objetivo de manter ou melhorar a saúde (Costa *et al.*, 2012 (a)). Um estudo recente sobre o uso de suplementos alimentares à base de plantas em seis países da Europa (Espanha, Itália, Roménia, Finlândia, Alemanha e Reino Unido) estimou que a prevalência de uso, em todos os países, foi 18,8% (Garcia-Alvarez *et al.*, 2014).

## **1.1 Suplementos alimentares à base de plantas para a perda de peso**

Grande parte dos suplementos alimentares contendo plantas ou preparados à base de plantas existentes no mercado destinam-se de forma mais ou menos explícita à perda de peso (Fernandes, 2009). Devido à sua origem natural, estes géneros alimentícios são muitas vezes assumidos como uma alternativa segura e menos dispendiosa face à utilização de medicamentos convencionais para o controlo do peso (Vaclavik, Krynitsky and Rader, 2014).

Em Portugal, a procura desmedida por estes alimentos ficou demonstrada em 2014 quando a consultora *IMS Health* fez um levantamento, a nível nacional, do consumo de produtos para a perda de peso. Estes produtos incluíam medicamentos e suplementos alimentares adquiridos em farmácias e parafarmácias. Os resultados indicaram que nos primeiros três meses de 2014 as vendas de suplementos alcançaram as 84 478 unidades, o que corresponde a 2,1 milhões de euros num trimestre. Verificou-se, no entanto, uma

redução no número de embalagens comercializadas face ao mesmo período do ano anterior. Apesar disto, Helena Norte afirma que “o mercado dos suplementos, nos canais de farmácia e parafarmácia, representou mais de 11 milhões de euros no ano passado [2013]”. Já o único medicamento para emagrecer registou 10 598 unidades vendidas no primeiro trimestre de 2014, confirmando-se, assim, a clara preferência pelos suplementos dietéticos em detrimento do único medicamento atualmente comercializado para tratar a obesidade (Norte, 2014).

## **1.2 Plantas medicinais usadas em suplementos alimentares à base de plantas para a perda de peso**

O uso de plantas medicinais no tratamento e prevenção das enfermidades é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade. Ao longo dos séculos, e em todo o mundo, o Homem por meio de observação e experimentação foi adquirindo conhecimento sobre as atividades farmacológicas de cada planta medicinal (Teixeira *et al.*, 2014).

Hoje em dia, a procura por estas espécies vegetais para uso em suplementos alimentares é cada vez maior (Pereira, Barros e Ferreira, 2014). As espécies *Cynara scolymus* L. (Alcachofra) e *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Cardo mariano) são duas plantas com propriedades medicinais que atualmente fazem parte da composição de muitos suplementos alimentares à base de plantas. Garcia-Alvarez *et al.* (2014), além de estimar o consumo de suplementos alimentares à base de plantas em seis países europeus, ainda determinou quais as espécies mais frequentemente usadas nestes produtos. Numa lista de 40 plantas, a espécie mais consumida é *Ginkgo biloba*, seguida da *Oenothera biennis* e *Cynara scolymus*. O *Silybum marianum* também faz parte desta lista, encontrando-se na vigésima nona posição.

### **1.2.1 *Cynara scolymus* L.**

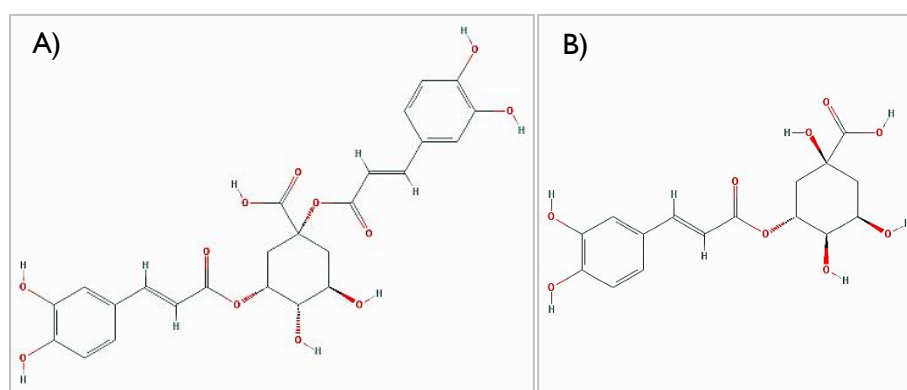
*Cynara scolymus* é uma planta perene vulgarmente conhecida como alcachofra (*globe artichoke* e *artichoke* em inglês). Esta espécie pertence à família Asteraceae e tem como sinónimos botânicos *Cynara cardunculus* var. *scolymus* e *Cynara cardunculus* subsp. *scolymus*. Morfologicamente, caracteriza-se por ser uma planta herbácea (podendo atingir 1,5 metros de altura), com folhas longas e dispostas em roseta. Do centro da planta surge uma haste floral alongada, cujo período de floração decorre entre agosto e setembro (ITIS, 2015; PFAF, [s.d.]) (Figura 1).



**Figura 1** Planta de alcachofra ainda em desenvolvimento (esquerda) e flor de alcachofra (direita; retirado de Starr e Starr, 2007).

A alcachofra é oriunda da região do Mediterrâneo mas o seu cultivo, através de sementes, está difundido mundialmente uma vez que é usada para fins alimentícios e medicinais. A parte comestível da planta é a inflorescência imatura, chamada de *capitulum* ou cabeça, que é protegida por folhas carnudas (brácteas) (Figura 1) (Ruiz-Cano *et al.*, 2014).

As propriedades nutricionais e medicinais da alcachofra estão ligadas à composição química da cabeça e folhas. Vários estudos indicam que *Cynara scolymus* é uma fonte natural de ácidos fenólicos, com a cinarina (ácido 1,3-*O*-dicafeoilquinico) e o ácido clorogénico (ácido 3-*O*-cafeoilquinico) a serem os compostos bioativos mais abundantes (Lattanzio *et al.*, 2009; Llorach *et al.*, 2002; Moglia *et al.*, 2008). Na Figura 2 está representada a estrutura química de cada um destes compostos.



**Figura 2** A) Estrutura química da cinarina ( $C_{25}H_{24}O_{12}$ ) (Retirado de PubChem,2015 (a)). B) Estrutura química do ácido clorogénico ( $C_{16}H_{18}O_9$ ) (Retirado de PubChem, 2015 (b)).

A cabeça e folhas de alcachofra são ainda caracterizadas por serem ricas em flavonoides, como a apigenina e luteolina, assim como glicósidos, tal como referiu Ruiz-Cano



et al. (2014) e Senousy, et al. (2014). A inulina, uma importante fibra, foi igualmente identificada na cabeça da planta, estando presente como hidrato de carbono de reserva (Hellwege et al., 1998).

Ao longo dos anos, foram vários os estudos publicados cujos objetivos passavam pela avaliação do potencial biológico de *Cynara scolymus* L.. Os resultados indicam que a alcachofra apresenta atividade colerética (estimula a produção de bile pelo fígado), hepatoprotetora e antimicrobiana, que estão frequentemente relacionadas com o conteúdo em cinarina e ácido clorogénico (Lattanzio et al., 2009; Senousy, El et al., 2014). Afirma-se também que esta planta, para além das atividades antioxidante, anticancerígena, possui propriedades diuréticas e hipocolesterolémicas (Borgognone et al., 2014; Lattanzio et al., 2009; Ruiz-Cano et al., 2014; Senousy, El et al., 2014). Esta última está ligada à ação antioxidante da luteolina que protege as lipoproteínas de baixa densidade (LDL-*low-density lipoprotein*) de processos de oxidação (Lattanzio et al., 2009). Devido à presença de inulina nos extratos de alcachofra, foi-lhe atribuída, também, uma função prebiótica (Ruiz-Cano et al., 2014).

Uma vez que a alcachofra apresenta uma elevada atividade biológica, é usada como planta medicinal no tratamento de várias doenças, como distúrbios hepáticos, diuréticos e controlo de diarreia (Souza et al., 2013). Em 2001, Walker, Middleton e Petrowicz indicaram esta planta como um possível agente terapêutico para o alívio de doenças gastrointestinais, como a síndrome do intestino irritável. Esta planta também é muito procurada pelos seus efeitos combinados de emagrecimento: sensação de saciedade, aumento da eliminação de fezes e metabolização da gordura. Todas estas características fazem da alcachofra uma espécie de eleição a incluir em suplementos alimentares para perda de peso.

### **1.2.2 *Silybum marianum* (L.) Gaertn**

*Silybum marianum* é um membro da família Asteraceae (Alemardan, Karkanis e Salehi, 2013), também conhecido como cardo mariano (ou *milk thistle* em inglês) e tem como sinónimo botânico *Carduus marianus* (Plantas medicinais & fitoterapia). Esta planta é nativa da região mediterrânica e caracteriza-se por ser uma erva anual ou bianual que cresce até dois metros de altura (Sherif, El et al., 2013). Tem folhas verdes escuras, grandes e com bordas espinhosas. As inflorescências são capítulos solitários, grandes e redondos, localizados no ápice do caule ou nos seus ramos cercados por brácteas espinhosas (Alemardan, Karkanis e Salehi, 2013). Apresenta flores hermafroditas, de forma tubular, com uma corola vermelho-púrpura. Os frutos são aquénios de pele dura com 6 a 8 mm de comprimento, geralmente

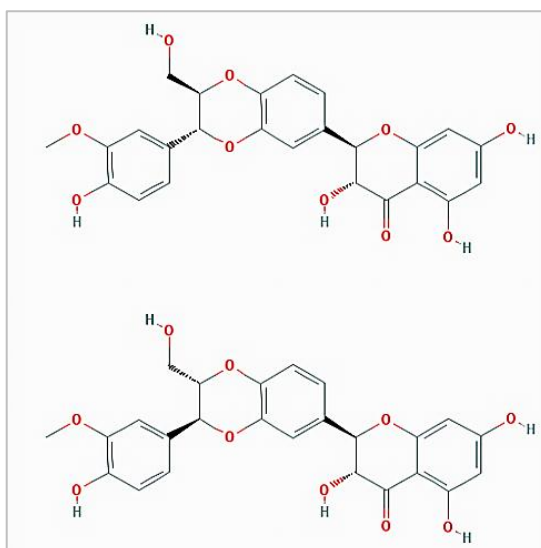
de cor acastanhada, com uma seda branca no ápice (Figura 3). Os frutos são colhidos de maio-junho, após a floração (Arabic, 1968).



**Figura 3** Planta de cardo mariano (esquerda) e o do seu respetivo fruto (direita; retirado de López, [s.d.]

Segundo Alemardan, Karkanis e Salehi (2013), os compostos farmacêuticos de cardo mariano são derivados das suas sementes, motivo pelo qual estas foram usadas como fármaco por mais de 2000 anos. O composto químico mais mencionado e estudado de *Silybum marianum* é a silimarina, considerada por muitos autores como o principal ingrediente ativo das sementes de cardo mariano (Alemardan, Karkanis e Salehi, 2013; Corchete e Fernandez-Tarrago, 2013; Guigas *et al.*, 2007). A silimarina é uma mistura isomérica de flavolignanais, incluindo silibina A, silibina B, isosilibina A, isosilibina B, silicristina, silidianina e o flavonoide taxifolina (Alemardan *et al.*, 2013; Sherif, *et al.*, 2013). Sendo que dentro deste leque de compostos, os mais abundantes são os diastereoisómeros, silibina A e silibina B (Brantley *et al.*, 2010) (Figura 4).

A silimarina é o composto de *Silybum marianum* que possui uma atividade biológica infinita. É caracterizada por apresentar baixa toxicidade, farmacocinética favorável e estimular as vias de desintoxicação (Theodosiou *et al.*, 2013). Vários estudos indicam que este composto químico inibe o vírus da hepatite C. Para além disso, a silimarina atribui a esta planta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, responsáveis pelo seu efeito hepatoprotetor (Alemardan, Karkanis e Salehi, 2013). Outra propriedade inerente à silimarina é a sua capacidade de impedir o crescimento e exercer uma atividade citotóxica direta em várias linhas celulares de cancro, assim como melhorar a eficácia de alguns agentes quimioterapêuticos (Theodosiou *et al.*, 2013).



**Figura 4** Estrutura química de silibina A (superior) e silibina B (inferior) (Retirado de PubChem, 2015 (c)).

Devido às suas principais atividades biológicas, o cardo mariano é usado como planta medicinal para a regulação da função hepática. O seu principal composto ativo, a silimarina, tem sido utilizado para tratar inflamações hepáticas crônicas e cirrose hepática (Sherif, *et al.*, 2013). Atualmente, esta planta integra a composição de muitos suplementos alimentares para a perda de peso, principalmente devido às suas propriedades desintoxicantes.

### 1.3 Enquadramento jurídico

O crescimento exponencial do número de suplementos alimentares comercializados na Europa e as divergentes regras nacionais de cada Estado-Membro alertaram a UE para a necessidade de harmonização das medidas legislativas que regem estes produtos, a fim de permitir a livre circulação no mercado interno e evitar desigualdades nas condições de concorrência (nº1 e nº2 do “considerando” da Diretiva 2002/46/CE). Assim, a 10 de junho de 2002 surge a Diretiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes aos suplementos alimentares. Esta diretiva prevê apenas uma harmonização parcial destes géneros alimentícios, que abrange, além da apresentação, rotulagem e publicidade de suplementos alimentares, as modalidades de utilização de vitaminas e minerais (Silano *et al.*, 2011). De facto, dentro do leque de nutrientes e outros ingredientes que podem estar presentes nos suplementos alimentares, esta diretiva apenas fixa normas específicas para as vitaminas e minerais. Sendo que apenas as que constam do anexo I, sob as formas enunciadas no anexo II, podem ser utilizadas no fabrico destes produtos (art. 4º, nº1 da Diretiva 2002/46/CE (os artigos referidos a seguir são todos desta diretiva)). Todos os outros nutrientes, além das

vitaminas e minerais, e outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico, como aminoácidos, enzimas, ácidos gordos essenciais, fibras, várias plantas e extratos de ervas, ficam a aguardar dados científicos adequados para que seja possível estabelecer uma regulamentação específica a nível Europeu. Enquanto isso não acontece, os suplementos alimentares que incluam estas substâncias ficam à mercê da legislação em vigor de cada Estado-Membro (nº8 do “Considerando”).

De um modo geral, todos os suplementos devem apresentar a denominação de venda “Suplemento alimentar” e, tal como disposto no nº 3 do artigo 6 da Diretiva 2002/46/CE, devem ser obrigatoriamente rotulados com as seguintes referências específicas: a designação das categorias de nutrientes ou substâncias que caracterizam o produto, ou uma referência específica à natureza desses nutrientes ou substâncias; a dose diária recomendada do produto; uma advertência de que não deve ser excedida a dose diária indicada; a indicação de que os suplementos alimentares não devem ser utilizados como substitutos de um regime alimentar variado; e uma advertência de que os produtos devem ser guardados fora do alcance das crianças. Para além disso, a rotulagem, apresentação e publicidade não podem incluir menções que atribuam propriedades profiláticas, de tratamento ou curativas de doenças humanas, nem fazer referência a essas propriedades (nº2 art. 6). É proibido também fazer qualquer tipo de referência que indique que um regime alimentar equilibrado e variado não constitui uma fonte suficiente de nutrientes em geral (art.7). Relativamente à quantidade de nutrientes e substâncias presentes no produto, cabe ao fabricante fazer a análise deste parâmetro e indicar a dose diária recomendada a ser declarada (nº2 do art. 8; nº1 do art.9). Para iniciar a comercialização destes géneros alimentícios esta Diretiva propõe apenas que o fabricante ou responsável pela colocação no mercado informe previamente a autoridade competente dessa comercialização, enviando-lhe um modelo do rótulo utilizado para esse produto (art.10).

Portugal, como país integrante da UE, transpôs para o direito nacional a Diretiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho através do Decreto-Lei nº136/2003 de 28 de junho, alterado pelo Decreto-Lei nº 296/2007 de 22 de agosto. Segundo o último Decreto-Lei, é da responsabilidade do Gabinete de Planeamento e Políticas (GPP) do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas a regulamentação e controlo dos suplementos alimentares em Portugal, bem como pela receção e aprovação dos rótulos enviados pelos fabricantes. As ações de fiscalização das normas constantes no Decreto-Lei 136/2003, sem prejuízo das competências atribuídas por lei a outras entidades, são da competência da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) (Costa et al., 2012 (a)).

Os suplementos alimentares, por serem considerados alimentos, estão sujeitos a todas as disposições da legislação alimentar. Ou seja, para além de obedecerem à Lei dos suplementos alimentares, anteriormente apresentada, ainda têm que respeitar a Lei Geral Alimentar: \_ Regulamento (CE) 178/2002; Regulamento (CE) 852/2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios; Regulamento (CE) n.º 258/97, relativo a novos alimentos e novos ingredientes alimentares; Regulamento (CE) 1924/2006, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos; Diretiva (CE) 2000/13, relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentício; Regulamento (CE) 1925/2006, relativo à adição de vitaminas, minerais e de outras substâncias aos alimentos; e à regulamentação comunitária de aditivos alimentares, contaminantes e pesticidas (Camilo, 2009; PlantLibra, 2010 (a); Silano *et al.*, 2011).

Relativamente aos suplementos alimentares à base de plantas, atendendo à diretiva 2002/46/CE, subentende-se que a regulamentação desta categoria varia entre os Estados-Membro. A maioria dos países tem a sua própria lista de plantas/partes de plantas permitidas para uso humano (PlantLibra (a), 2010). Não será de estranhar, portanto, que entre os vários países da UE seja proibido o uso de algumas espécies vegetais num Estado-Membro e autorizada noutro, ou que seja proibido/permitido o uso de determinadas plantas em alguns países e não regulamentadas noutros (Silano *et al.*, 2011). Um exemplo disto é o caso da planta *Ginkgo biloba*, onde o seu uso em suplementos alimentares é permitido, por exemplo, em países como Portugal, Polónia e Dinamarca, e proibido em Espanha, Eslovénia e Suécia. Existem ainda alguns Estados-Membro que autorizam a sua incorporação em suplementos alimentares dentro de um limite máximo estabelecido ou respeitando determinadas condições específicas, como o tipo de extrato ou a combinação de ingredientes no produto final (Silano *et al.*, 2011). Além disso, a mesma espécie vegetal pode ser usada como um suplemento alimentar e como um medicamento, dependendo da utilização pretendida para o produto. Isto faz com que o *status* legal dos produtos varie de um país para outro, resultando num ambiente de mercado complexo (Garcia-Alvarez *et al.*, 2014). Todas estas contradições legislativas entre os Estados-Membros tornam-se um grande obstáculo à livre circulação de suplementos alimentares à base de plantas no mercado europeu (Garcia-Alvarez *et al.*, 2014; Silano *et al.*, 2011).

Com o objetivo de ajudar na avaliação da segurança das plantas e preparações vegetais para uso em suplementos alimentares, a EFSA elaborou um compêndio de plantas referidas como tendo possíveis substâncias tóxicas, viciantes, psicotrópicas ou outras substâncias que possam causar preocupações para a saúde dos consumidores (Costa *et al.*, 2012 (a); Garcia-Alvarez *et al.*, 2014; Silano *et al.*, 2011). O principal objetivo do compêndio é chamar a

atenção para questões que precisam ser consideradas durante a avaliação da segurança dos produtos vegetais utilizados como ingredientes em suplementos alimentares, bem como facilitar o estabelecimento de prioridades na avaliação de segurança (PlantLibra, 2010 (b)). Hoje em dia, é difícil saber se e em que medida este documento de orientação da EFSA, que podia ser visto como uma abordagem harmonizada para a avaliação da segurança a nível da UE, está a ser utilizada pelos Estados-Membro, a nível nacional, para avaliar sistematicamente a segurança dos suplementos alimentares à base de plantas nos seus mercados (Silano *et al.*, 2011).

#### **1.4 Adultrações em suplementos alimentares à base de plantas**

Com a análise legislativa, verificou-se, que os suplementos alimentares são considerados de forma inequívoca como alimentos. E embora a legislação da rotulagem assegure a identidade e a pureza do produto, pelo menos na teoria, não há nenhuma garantia de qualidade, segurança e muito menos de eficácia, uma vez que estes produtos não estão sujeitos a tais avaliações antes de serem comercializados.

Tal facto faz com que exista uma porta aberta para possíveis contaminações e adultrações. Uma categoria de suplementos frequentemente reportados por estarem adultraados são os utilizados para auxiliarem a perda de peso (Martins, 2012). Geralmente, essa alteração passa pela adição de um composto farmacêutico que garanta ao produto final os efeitos comumente associados à preparação vegetal (Costa *et al.*, 2012 (a)). A adição de sibutramina em suplementos alimentares à base de plantas é um caso de adultração, recentemente reportado na literatura (Mathon *et al.*, 2014). Este composto químico é um inibidor de recaptção de neurotransmissores, estruturalmente relacionado com as anfetaminas, que por sua vez reduzem a recaptção de serotonina, norepinefrina e noradrenalina, resultando num aumento das concentrações destes compostos nas fendas sinápticas e na redução do apetite (Deconinck *et al.*, 2014). O uso de sibutramina como um medicamento supressor de apetite foi permitido até ao ano 2010. A partir dessa altura, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) ordenou a retirada dessa molécula do mercado, baseando-se em estudos que indicavam que o seu uso provocava riscos cardiovasculares graves e que a relação risco-benefício não era aceitável (Deconinck *et al.*, 2014; Mathon *et al.*, 2014).

Outro tipo de adultração consiste na troca do material vegetal, usado para produzir os extratos, a incluir nos suplementos alimentares. A adultração acontece quando a espécie correta é substituída, no todo ou em parte, por uma espécie indesejável, seja acidental ou

propositadamente. Uma alteração acidental pode acontecer quando as espécies são colhidas a partir de populações de plantas selvagens. Os coletores podem inadvertidamente confundir as espécies desejadas com parentes próximos, ou mesmo com espécies não relacionadas que são morfológicamente semelhantes. Também pode haver substituição deliberada de espécies que são difíceis de diferenciar, especialmente quando o incentivo financeiro é grande (Applequist e Miller, 2013).

Qualquer uma das alterações pode trazer consequências, uma vez que cada espécie vegetal apresenta características e compostos químicos específicos, atuando em diferentes órgãos e produzindo efeitos distintos no homem. Os vários relatos de intoxicações graves provocadas pelo consumo de alguns produtos para emagrecer que continham ácidos aristolóquicos nefrotóxicos são uma prova disso. O ingrediente pretendido no suplemento alimentar, *Stephania tetrandra*, foi acidentalmente substituído por plantas do género *Aristolochia*, que contém ácidos aristolóquicos, resultando em falha renal e desenvolvimento de cancro urotelial. A troca da planta anis estrelado chinês (*Illicium verum*) por uma espécie tóxica, morfológicamente semelhante a anis estrelado japonês (*Illicium anisatum*), é outro caso de adulteração reportado. A espécie tóxica produz a neurotoxina *anisatin* que foi detetada em suplementos de plantas de chá rotulados como contendo anis estrelado chinês (*Illicium verum*) (Vaclavik, Krynitsky e Rader, 2014).

A autenticação de plantas torna-se, deste modo, uma questão crítica, especialmente quando o material vegetal é utilizado diretamente como tratamento médico ou como suplemento alimentar (Tehen *et al.*, 2004). Neste sentido, o desenvolvimento de técnicas que permitam uma avaliação rápida e rigorosa destes géneros alimentícios é fundamental para detetar e evitar possíveis casos de adulterações.

## **2 Métodos utilizados para a identificação de plantas em suplementos alimentares**

Atualmente, os métodos utilizados para a identificação de plantas em suplementos alimentares baseiam-se na observação morfológica, na análise das características químicas e, mais recentemente, na pesquisa de marcadores moleculares.

### **2.1 Observação morfológica**

As plantas são quase sempre definidas pela posse de determinadas características morfológicas que, em vez de qualquer marcador químico ou genético, determinam a

identidade da cada espécie vegetal (Applequist e Miller, 2013). A análise morfológica, compreendendo a macroscopia e a microscopia, corresponde, sempre que possível, ao método mais rápido, mais fácil, e que melhor possibilita a identificação de espécies.

A identificação macroscópica é realizada por um especialista em taxonomia que examina as características morfológicas ou organolépticas (sensoriais) relevantes de partes específicas da planta, como por exemplo folhas, raízes inteiras, frutos ou secções da espécie (Tehen *et al.*, 2004). Para uma identificação correta da planta, esta deve ser analisada na altura da colheita, quando a aparência, o cheiro característico ou propriedades urticantes podem ser examinados e se consegue observar a presença de contaminantes, tais como areia, cascalho ou material vegetal morfológicamente distinto (Sanzini *et al.*, 2011). Caso seja necessário, a espécie examinada pode ainda ser comparada com uma amostra de referência, como exemplares de herbário (Applequist e Miller, 2013).

Apesar da observação macroscópica servir como um método de autenticação para muitas amostras à base plantas, esta perde efetividade quando o material é processado ou formulado, para além da capacidade de fornecer uma distinta caracterização morfológica (Khan e Smillie, 2012). Além disso, este método pode não ser suficiente para identificar as espécies ou distinguir subespécies com diferentes quimiótipos ou ecótipos (Sanzini *et al.*, 2011) e requer mão-de-obra qualificada que hoje em dia é cada vez mais escassa (Tehen *et al.*, 2004). No entanto, segundo um código de boas práticas agrícolas (GAP), a autenticidade e qualidade de um produto botânico está diretamente relacionada com a autenticidade e identificação adequada do material de origem. Neste sentido, a aplicação da macroscopia antes do processamento de qualquer espécie vegetal a incluir num produto botânico é fundamental para assegurar que o produto final tenha na sua constituição a planta pretendida (Tehen *et al.*, 2004).

A identificação microscópica, tal como o nome sugere, é um método que permite analisar componentes e características das plantas de reduzido tamanho, muitas vezes invisíveis a olho nu. Este método requer o uso de equipamento microscópico e, ao contrário da macroscopia, pode ser aplicado em plantas fragmentadas ou em pó. As células, fibras e objetos granulares (por exemplo, grãos de amido e cristais de oxalato de cálcio) são alguns dos componentes analisados, bem como as características das flores e frutos (Sanzini *et al.*, 2011). Ao longo dos anos, bibliotecas de referência fotográfica e materiais de referência padrão para comparação e autenticação têm sido descritos no sentido de facilitar a identificação microscópica (Tehen *et al.*, 2004). Em muitos casos, o exame microscópico fornece uma grande quantidade de informações que podem ser aplicadas na identificação de plantas, avaliação da pureza e determinação da qualidade de um produto botânico (Tehen *et*



*al.*, 2004). Outra vantagem baseia-se no facto de ser uma técnica relativamente rápida e reproduzível. No entanto, tal como o método anterior, necessita de profissionais com experiência na análise de materiais vegetais, e nos dias de hoje são cada vez mais raros. Adicionalmente, os padrões de referência descritos e aceites têm acesso limitado, representando outra dificuldade à aplicação deste método (Sanzini *et al.*, 2011; Techen *et al.*, 2004). Para além disso, a maioria dos produtos botânicos, como os suplementos alimentares à base de plantas, são altamente processados e o material vegetal está envolvido em muitos compostos sintéticos. Nestas condições, é possível que o material em pó fino oblitere características microscópicas, tornando inadequada a abordagem clássica da microscopia para a identificação de plantas nestes produtos (Khan e Smillie, 2012). Neste caso, outros ensaios, tais como a análise química ou pesquisa de marcadores moleculares, devem ser utilizados.

## 2.2 Análise química

Na análise química de produtos à base de plantas, as técnicas *fingerprinting* têm desempenhado um papel ativo no seio da comunidade científica. Deconinck *et al.* (2013) define *fingerprinting* como “um perfil característico que reflete a composição química complexa de uma amostra analisada”. Este perfil pode ser obtido utilizando técnicas espectroscópicas, cromatográficas (por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (GC)) ou eletroforéticas (Deconinck *et al.*, 2013; Kulkarni *et al.*, 2014). A cromatografia *fingerprinting* é amplamente usada em farmacognosia (estudo de fármacos de origem natural) para a identificação e controlo da qualidade de plantas (Deconinck *et al.*, 2013). A análise é baseada na comparação do cromatograma da amostra com um padrão de referência (Brigham, Schröder e Cocksedge, 2004). O seu uso em suplementos alimentares à base de plantas também tem ganho algum destaque, principalmente na identificação e classificação da planta ou material, verificação da qualidade do material ou produto, avaliação da sua pureza e identificação de adulterantes (por exemplo, a pesquisa de fármacos) (Sanzini *et al.*, 2011).

No entanto, e em analogia com o método de observação morfológica, esta técnica nem sempre consegue resolver todas as questões de identificação de espécies vegetais, especialmente quando os produtos estão em pó, misturados ou líquidos (Kazi *et al.*, 2013). Além disso, os perfis químicos das plantas diferem de órgão para órgão e podem ser afetados pela idade, por condições fisiológicas e de armazenamento (Techa *et al.*, 2014).

## 2.3 Marcadores moleculares

Os métodos baseados na análise de ADN têm sido fortemente defendidos como uma alternativa adequada à correta identificação de espécies vegetais em suplementos alimentares e/ou outros produtos à base de plantas. Contrariamente aos componentes fitoquímicos, o genoma é independente da parte da planta utilizada e a composição genética de cada espécie vegetal é única, permitindo a diferenciação entre espécies e subespécies. Além disso, o ADN é uma molécula bastante estável que não é afetada pela idade, condições fisiológicas ou fatores ambientais (Kazi *et al.*, 2013; Kulkarni *et al.*, 2014; Sanzini *et al.*, 2011b; Techen *et al.*, 2014). Consegue, ainda, manter a sua integridade mesmo em alimentos processados, bastando uma pequena quantidade de amostra para que seja possível a realização da análise.

Na literatura vários métodos baseados na pesquisa de marcadores moleculares têm sido mencionados como úteis na identificação de plantas em produtos botânicos. A maioria deles assenta na reação em cadeia da polimerase (PCR) e requerem apenas algumas cópias de ADN para análise. Outras técnicas utilizadas, baseadas na amplificação de ADN, assentam na pesquisa de sequências específicas da planta, destacando-se as técnicas de *Sequence Characterized Amplified Region* (SCAR), microssatélites ou sequências simples repetitivas (SSR, *Simple Sequence Repeats*), PCR em tempo real, PCR sequenciação e *DNA barcoding*. Existem, no entanto, outras abordagens que não necessitam do conhecimento de qualquer sequência para a realização da análise, tais como: *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP) e *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD).

### 2.3.1 PCR

Para perceber a aplicação e os limites das técnicas de biologia molecular para a autenticação de plantas em suplementos alimentares é importante entender primeiro os fundamentos da PCR e os fatores que a influenciam. A PCR é uma técnica que permite a amplificação de uma sequência específica de ADN e para que a reação aconteça, o ADN alvo é misturado numa solução complexa constituída por água ultra pura e outros componentes, nomeadamente, o tampão (1), o cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) (2), um par de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) (3), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP) (4), e uma polimerase de ADN termoestável (5):

- (1) **Solução tampão:** tem a função de proporcionar uma ótima atividade enzimática pela regulação do pH da reação. A composição do tampão vai depender do tipo e das características da enzima utilizada.

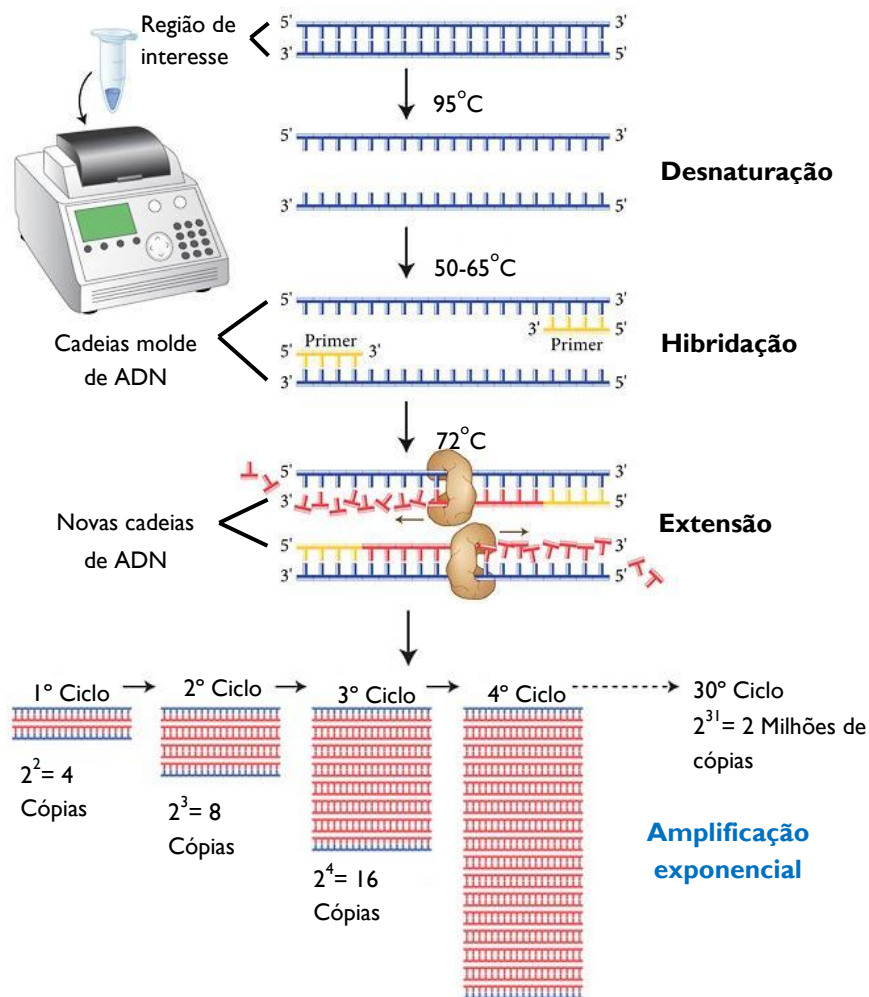
- (2) **Cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ):** é um doador muito estável de íons de magnésio ( $Mg^{2+}$ ). Este íon é um elemento crítico da PCR uma vez que a sua concentração afeta a especificidade e eficiência da reação. Se a concentração de magnésio for muito baixa a polimerase não é suficientemente ativada e, conseqüentemente, a eficiência da reação é reduzida. Por sua vez, para concentrações elevadas de magnésio a enzima pode perder a fidelidade e levar à amplificação de produtos não específicos (McPherson e Simon, 2006). Além disto, estes íons divalente formam, ainda, um complexo solúvel com os dNTP, fundamental para a sua incorporação na cadeia sintetizada.
- (3) **Oligonucleótidos iniciadores (*Primers*):** são pequenas sequências de ADN sinteticamente produzidas que permitem a ligação da polimerase de ADN à sequencia alvo e dar início à reação. Na maioria dos casos, numa PCR são necessários dois *primers* com cerca de 20 nucleótidos de comprimento que, por complementaridade de bases, emparelham com o terminal 3' de cada uma das cadeias a amplificar (Genetic Science Learning Center, 2015).
- A especificidade da reação está altamente relacionada com a qualidade dos *primers* desenhados. Neste sentido, alguns critérios devem ser respeitados aquando da escolha dos *primers* numa sequência conhecida, tais como: serem específicos para o fragmento a amplificar; o comprimento do fragmento ter entre 50 a 150 bases; a temperatura de emparelhamento ( $T_m$  – *melting temperature*) rondar os 59°C e 65 °C e ser semelhante para os dois *primers* do par; não haver mais do que 2 resíduos de guanina (G) e citosina (C) nos últimos 5 nucleótidos da extremidade 3' e os *primers* não serem complementares consigo próprios ou entre si de modo a evitar a formação de *hairpin* e dímeros, respetivamente (McPherson e Simon, 2006).
- (4) **Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP):** são nucleótidos do ADN que se dividem em desoxiadenina trifosfato (dATP), desoxicitosina trifosfato (dCTP), desoxiguanina tri-fosfato (dGTP) e desoxitimina trifosfato (dTTP). Estes são os “blocos” de construção, incorporados pela enzima, das novas cadeias de ADN a amplificar (Genetic Science Learning Center, 2015). Para o sucesso da reação é importante que os 4 dNTP estejam presentes em concentrações equivalentes, caso contrário a fidelidade da PCR pode ser afetada (McPherson e Simon, 2006).
- (5) **Polimerase de ADN:** a sensibilidade e robustez de várias técnicas de deteção e amplificação de ADN são em grande parte determinadas pelas propriedades da polimerase de ADN utilizadas. A técnica de PCR envolve etapas com elevadas temperaturas, por isso, é necessária uma enzima termoestável. A *Taq* polimerase ou

simplesmente *Taq* é a enzima termoestável mais conhecida. Esta foi isolada a partir de uma bactéria termofílica *Thermus aquaticus* e a primeira enzima a ser usada em PCR. A sua atividade de amplificação acontece no sentido 5'→3' a uma temperatura ideal de alongamento de 75-80°C, mas temperaturas mais baixas (principalmente 68-72 °C) também são usadas. Como já mencionado, a fidelidade da enzima também depende do pH e da concentração dos substratos Mg<sup>2+</sup> e dNTP que formam complexos com os *primers* e as cadeias moldes (Terpe, 2013).

A quantidade de ADN alvo utilizada pode ser muito pequena porque a PCR é extremamente sensível e poderá trabalhar apenas com uma única molécula de partida (Brown, 2010). A PCR é um processo de passos múltiplos com ciclos consecutivos de três temperaturas diferentes, onde o número de sequências alvo amplificadas cresce exponencialmente de acordo com o número de ciclos. Em cada ciclo, as três temperaturas correspondem a três etapas diferentes na reação (Brandenberg *et al.*, 2011):

- (1) Na primeira etapa, designada de **desnaturação**, a mistura é aquecida a 95°C. A esta temperatura as ligações de hidrogénio que estabelecem a ponte entre os dois nucleótidos da dupla hélice são quebradas, separando o ADN alvo em duas moléculas de cadeia simples (Brown, 2010).
- (2) Na segunda etapa, a temperatura é reduzida para 50-65°C (dependendo dos *primers* usados) para permitir o emparelhamento dos *primers* em ambas as extremidades da sequência alvo. Importa referir que nestas condições as cadeias simples do ADN alvo podem voltar a recombinar (Brandenberg *et al.*, 2011; Brown, 2010). No entanto, devido a um excesso de oligonucleótidos iniciadores em relação ao ADN molde na mistura de reação, a hibridação dos *primers* é favorecida sobre a hibridação de ADN-ADN (Brandenberg *et al.*, 2011). Esta fase é conhecida como **hibridação**.
- (3) Na terceira etapa, ou **extensão**, a mistura é aquecida a 72°C, criando-se as condições ideais para a atividade da *Taq* polimerase. Esta enzima é responsável pela síntese de ADN através da sua ação no alongamento dos *primers*, utilizando as cadeias de ADN alvo como molde. Com o alongamento, uma cópia da sequência alvo é gerada (Brandenberg *et al.*, 2011).

Este ciclo de temperaturas é repetido 30 a 40 vezes, dependendo da quantidade inicial de ADN e do comprimento do produto de amplificação (Brandenberg *et al.*, 2011). No final da reação, milhões de cópias da sequência alvo são obtidas num período de poucas horas. A Figura 5 esquematiza o processo da PCR.



**Figura 5** Representação esquemática das etapas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). (Adaptado de (Biolabs, [s.d.])).

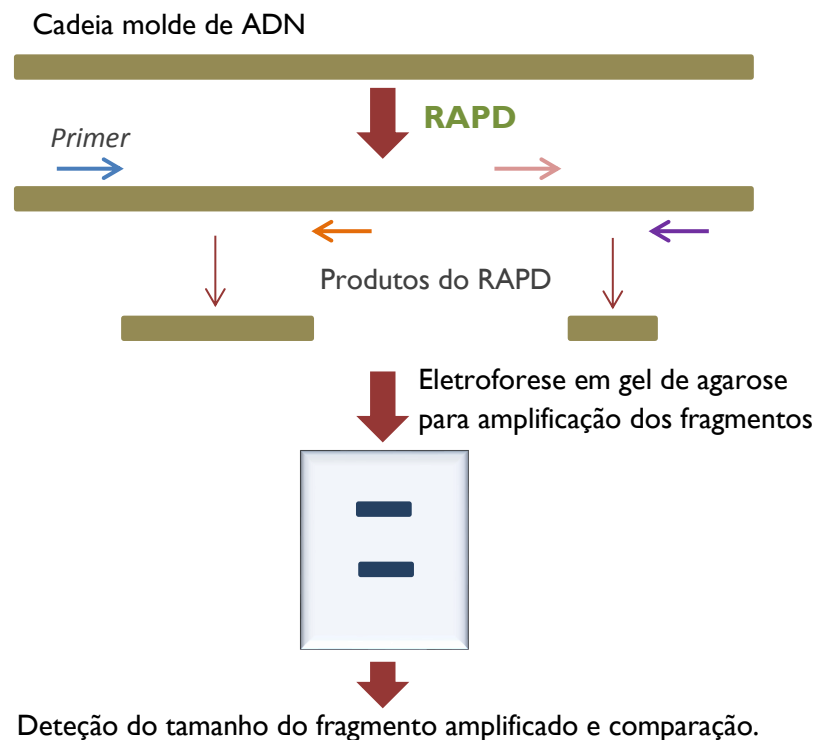
O produto da PCR é geralmente analisado por eletroforese em gel de agarose para visualização e verificação do tamanho do fragmento, sendo a estratégia mais simples da PCR para avaliar a presença de uma dada espécie (Mafra, Ferreira e Oliveira, 2008 (a)). Alternativamente, os fragmentos de ADN amplificados podem ser examinados por outros métodos, tais como a sequenciação do ADN.

Embora a simplicidade, sensibilidade e especificidade da PCR sejam claras vantagens (Mafra, Ferreira e Oliveira, 2008 (a)), a técnica apresenta algumas limitações significativas. O desenho dos *primers* só é possível se existirem, nas bases de dados bioinformáticas, informações sobre a sequência do fragmento de ADN que vai ser amplificado. Sem este conhecimento, a amplificação por PCR não pode ser aplicada (Griffiths *et al.*, 2008).

### 2.3.2 RAPD-SCAR

RAPD uma técnica baseada na amplificação aleatória de ADN, no qual *primers* individuais de sequência arbitrária com cerca de 10 nucleótidos são usados para amplificar fragmentos a partir de todo o genoma dos indivíduos analisados, fornecendo informações quanto ao polimorfismo genético (Bandyopadhyay e Raychaudhuri, 2013). Polimorfismo é a designação dada a variações naturais num gene, sequência de ADN, ou cromossomas, que não têm efeitos adversos sobre o indivíduo e ocorrem com bastante frequência nos seres vivos (Genetics Home Reference, 2015). A detecção destas pequenas diferenças permite a distinção entre espécies.

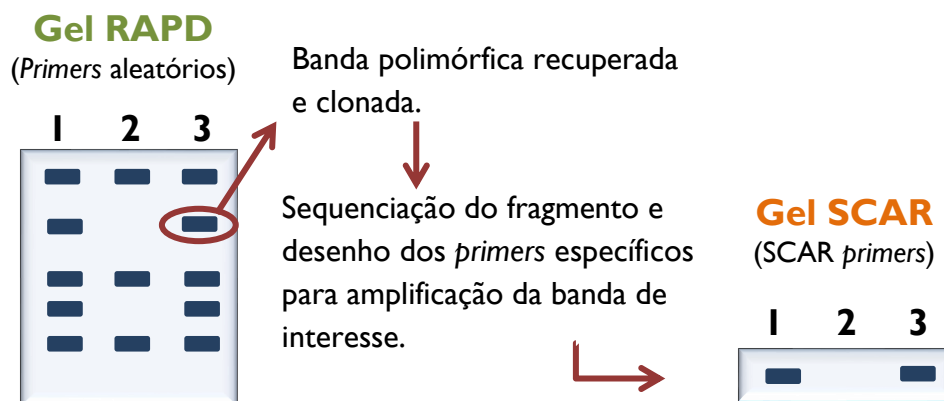
O princípio do método (Figura 6) é bastante simples: o *primer* liga-se às sequências complementares em cadeias opostas do ADN alvo, na orientação inversa e dentro de uma distância amplificável. A amplificação do segmento de ADN entre *primers* adjacentes ocorre *in vitro* com o auxílio da enzima *Taq* polimerase (Lacerda *et al.*, 2002). No final, mais do que um produto será gerado, porque existe uma grande possibilidade de que os *primers*, devido ao seu reduzido tamanho, encontrem múltiplas regiões do genoma para se ligarem. Assim, vários *loci* podem ser simultaneamente examinados (Kulkarni *et al.*, 2014; Lacerda *et al.*, 2002; Tehen *et al.*, 2004). A separação dos produtos amplificados pode ser feita em gel de agarose.



**Figura 6** Representação esquemática das etapas de RAPD (Adaptado de Arif *et al.*, 2010).

Além da simplicidade, as vantagens deste método prendem-se pela sua rapidez, sensibilidade e pelo fato de não exigir qualquer conhecimento prévio das sequências de ADN (Bhattacharyya e Kumaria, 2014; Zhao e Wu, 2012). A técnica de RAPD mostrou ser uma ferramenta importante na construção de mapas genéticos, desenvolvimento filogenético, análise da relação genética e da diversidade genética das populações (Zhao e Wu, 2012). Mas também, na identificação de espécies de plantas através da análise do polimorfismo e subsequente desenvolvimento de marcadores SCAR a partir das bandas polimórficas (bandas diferentes entre espécies produzidas pelos mesmos *primers*) (Bandyopadhyay e Raychaudhuri, 2013).

Com SCAR um fragmento específico do RAPD é recuperado, clonado e sequenciado. Em seguida, *primers* específicos de 20-28 nucleótidos são desenhados para amplificar a banda de interesse (Zhao e Wu, 2012). A Figura 7 esquematiza os passos envolvidos na técnica RAPD-SCAR. Marcadores SCAR têm sido usados na identificação de espécies de plantas medicinais importantes como Ginseng (Bandyopadhyay e Raychaudhuri, 2013).



**Figura 7** Representação esquemática das etapas envolvidas no método RAPD-SCAR (Adaptado de Kulkarni et al., 2014).

Tal como a maioria dos métodos, a técnica de RAPD também apresenta algumas desvantagens que assentam sobretudo na fraca reprodutibilidade interlaboratorial, promovida pela elevada sensibilidade deste método a diferentes parâmetros da PCR (Kulkarni et al., 2014). O tamanho reduzido dos *primers* exige que a temperatura de emparelhamento seja baixa, pois mínimas variações podem causar alterações significativas nas bandas padrão (Techen et al., 2004).

### 2.3.3 AFLP

A técnica de AFLP consiste na digestão completa do ADN genómico através da ação enzimática de duas endonucleases de restrição, na ligação de adaptadores oligonucleotídicos (sinteticamente produzidos) aos fragmentos resultantes digeridos e na amplificação por PCR desses fragmentos utilizando *primers* seletivos que são complementares às sequências do adaptador (Cara *et al.*, 2014). A complexidade do perfil AFLP depende dos *primers*, enzimas de restrição escolhidas e do nível de polimorfismo das sequências entre as amostras de ADN testadas (Kulkarni *et al.*, 2014).

Este método é referido como sendo altamente informativo, robusto e reprodutível (Cara *et al.*, 2014; Kulkarni *et al.*, 2014; Uni, 1999). Contudo, a digestão com enzimas de restrição, ligação e dois ciclos de PCR tornam este método dispendioso, moroso e tecnicamente desafiante (Techen *et al.*, 2004).

AFLP tem sido aplicado no estudo genómico e caracterização de muitas espécies vegetais, incluindo a *Cynara scolymus* L. (Bandyopadhyay e Raychaudhuri, 2013; Lanteri *et al.*, 2006).

### 2.3.4 Microssatélites

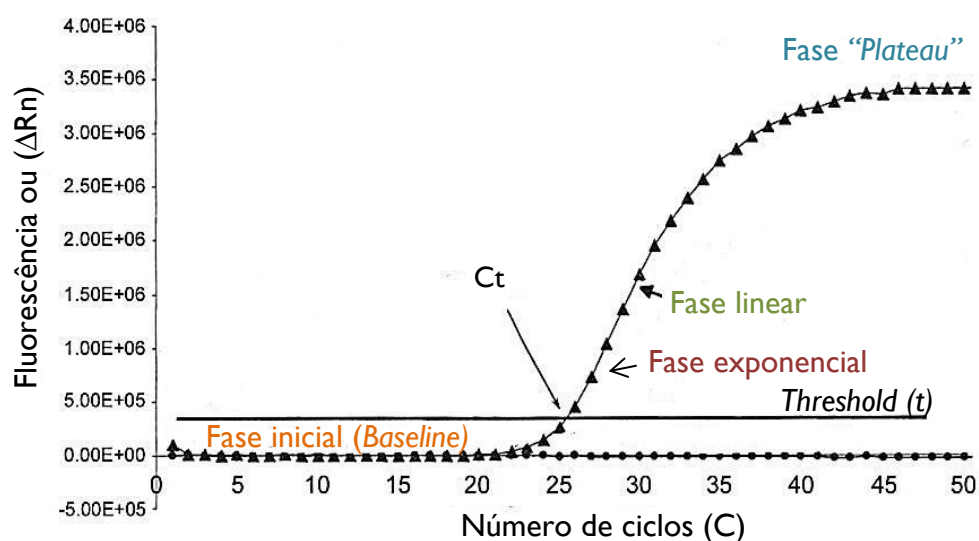
Os marcadores SSR, também conhecidos como microssatélites, são pequenas repetições em *tandem* de 1-6 nucleótidos (ex. CA) que se encontram dispersos em muitos genomas eucarióticos, como os das plantas (Yuan *et al.*, 2015). Nas extremidades de cada repetição existem regiões conservadas de ADN, onde *primers* de sequência complementar podem ser concebidos para amplificar o microssatélite por PCR. O número de unidades de repetição de um microssatélite pode variar, resultando em polimorfismos de comprimento detetados em gel de poliacrilamida ou eletroforese capilar (Kumar, Gupta e Misra, 2009) (Figura 8).

Por serem abundantes, altamente polimórficos, codominantes, analiticamente simples e facilmente transferíveis entre espécies tornaram-se um dos marcadores moleculares mais comumente utilizados em estudos genéticos de plantas (Miah *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2015). A alcachofra é um exemplo, são vários os artigos que relatam a deteção, desenvolvimento e caracterização de microssatélites nesta planta (Acquadro *et al.*, 2005, 2009; Lanteri *et al.*, 2006). No entanto, existem desvantagens significativas em relação à utilização de métodos baseados em microssatélites, abrangendo os custos relativamente





a curva de amplificação cruza a linha *threshold* ( $t$ ). Por ser inversamente proporcional à concentração inicial do ADN alvo, o valor de  $C_t$  é usado para quantificar a amostra no início da reação. Valores baixos de  $C_t$  indicam uma quantidade de ADN inicial elevada, enquanto os valores altos indicam o oposto (Bubner e Baldwin, 2004; Popping, Diaz-Amigo e Hoenicke, 2010). Nesta fase, observa-se ainda um aumento acentuado da fluorescência, resultante da amplificação exponencial do ADN. Num ensaio 100% eficiente, a quantidade de produto duplica em cada ciclo. No entanto, na prática, o que se verifica é que com o aumento dos ciclos, a eficiência de amplificação começa a desaparecer, atingindo-se a **fase linear**. Nesta fase, o aumento é não exponencial devido à diminuição da atividade da *Taq* polimerase à medida que os produtos de PCR se acumulam (Popping, Diaz-Amigo e Hoenicke, 2010). A curva de amplificação atinge a **fase de plateau** quando os reagentes estão esgotados e/ou a enzima perde atividade. Neste momento, o produto da PCR deixa de se acumular e os valores de fluorescência ( $\Delta R_n$ ) permanecem relativamente constantes (Bubner e Baldwin, 2004; Popping, Diaz-Amigo e Hoenicke, 2010).

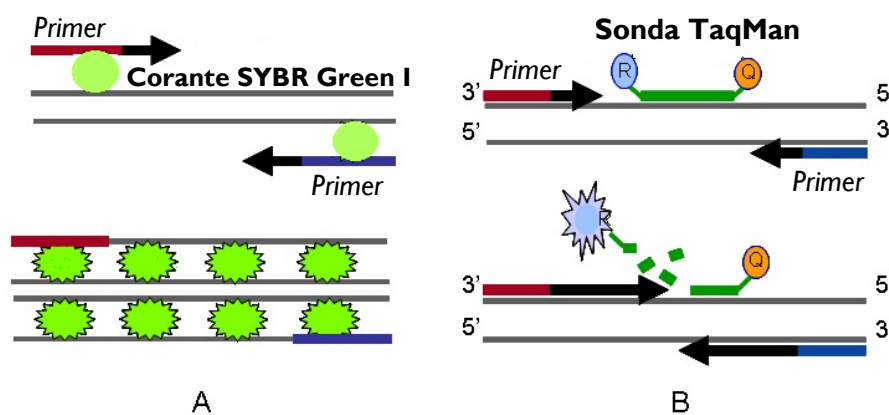


**Figura 9** Curva de amplificação obtida pela PCR em tempo real mostrando as diferentes fases da reação (Adaptado de Ahmed, Oncology e Jenkins, 2005).

Hoje em dia, estão disponíveis vários sistemas de detecção de fluorescência que se prendem pelo uso de corantes fluorescentes não específicos ou sondas de ADN de sequência específica. Os primeiros intercalam com qualquer ADN de cadeia dupla, enquanto os últimos consistem em oligonucleótidos marcados com fluoróforos que se ligam apenas ao ADN alvo que contém a sequência complementar da sonda (Klancnik *et al.*, 2012).

O SYBR Green I é um dos corantes fluorescentes não específicos mais usado atualmente. A popularidade deste corante deve-se ao seu baixo custo relativo, à facilidade

do desenvolvimento do ensaio, sendo necessário apenas um par de *primers*, e ao facto do mesmo mecanismo de deteção poder ser usado para todos os ensaios (Dorak, 2006). Como já referido, este corante liga-se ao ADN de cadeia dupla e com a excitação da luz a 494 nm, proveniente do sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde na ordem dos 521 nm (emissão máxima) (Bubner e Baldwin, 2004). A fluorescência do corante ligado é cerca de 1000 vezes mais elevada do que a do corante livre (Figura 10A). Assim, quanto maior a quantidade de ADN de cadeia dupla presente no tubo de reação, maior a quantidade de ADN de ligação e do sinal de fluorescência. Por conseguinte, qualquer amplificação de ADN durante a PCR é medida (Seifi *et al.*, 2012; Wilhelm e Pingoud, 2003).

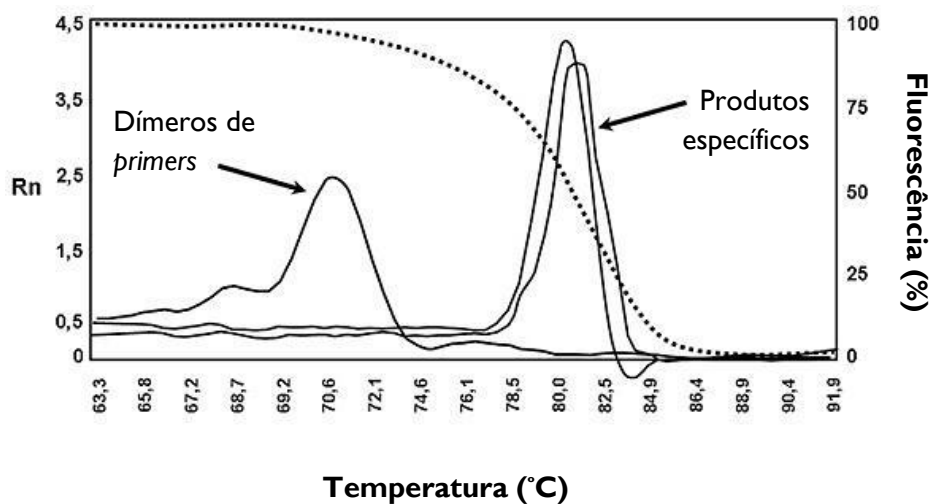


**Figura 10** Dois métodos utilizados para obter sinais fluorescentes dos produtos da PCR em tempo real. (A) SYBR Green I; (B) As sondas TaqMan ®. (Adaptado de Xu, Yang e Cheng, 2011)

Apesar da popularidade, o SYBR Green I tem algumas desvantagens. Um dos problemas reside no facto de apenas uma concentração relativamente baixa de corante (por exemplo,  $<0,5 \mu\text{M}$ ) poder ser utilizada na reação, devido à sua elevada tendência para inibir a PCR. Outra desvantagem está relacionada com a sua intercalação em qualquer molécula de cadeia dupla, como dímeros de *primers* ou sequências não específicas, comprometendo a quantificação exata do ADN alvo. Isto porque o sinal medido corresponde ao somatório dos produtos totais, específicos e, eventualmente, não específicos (Gachon, Mingam e Charrier, 2004). Embora muitas vezes não seja possível evitar o sinal não específico, a sua presença pode ser identificada através da análise de uma curva de desnaturação (*melting*) dos produtos da PCR.

A curva de desnaturação é obtida imediatamente a seguir à PCR em tempo real, onde os produtos amplificados são lentamente desnaturados, enquanto a fluorescência do corante é detetada. A dissociação das cadeias de ADN acontece devido a um aumento gradual da temperatura, que por sua vez diminui a intensidade de fluorescência. Uma vez que a

temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) de cada molécula de ADN depende do seu teor em GC (Guanina e Citosina, respetivamente), comprimento e sequência, os produtos da PCR podem ser distinguidos pelas suas curvas de desnaturação. Deste modo, permite a identificação de uma variedade de organismos e a diferenciação de produtos específicos de não específicos. A Figura 11 ilustra uma curva de desnaturação de um ensaio de PCR em tempo real (Popping, Diaz-Amigo e Hoenicke, 2010).



**Figura 11** Curva de desnaturação (*melting*) de um ensaio de PCR em tempo real. A linha tracejada mostra a tendência da fluorescência durante o processo de aquecimento; a baixas temperaturas o ADN está na forma de cadeia dupla e a fluorescência é 100%. À medida que a temperatura aumenta, a dupla cadeia de ADN desnatura e a fluorescência perde intensidade. Relativamente aos produtos amplificados são visíveis três picos: um à esquerda, com uma temperatura menor, que corresponde a uma curva de dissociação de dímeros de *primers*, e outros dois à direita, que correspondem a curvas de dissociação de dois produtos específicos amplificados. (Adaptado de Prada-Arismendy e Castellanos, 2011)

Recentemente, um novo corante, o EvaGreen, tem sido apontado como uma alternativa ao SYBR Green I para as análises de PCR em tempo real. Apesar de ser um pouco mais caro do que o anterior, o EvaGreen é caracterizado por mostrar baixa inibição da PCR, ser substancialmente mais fluorescente, apresentar maior estabilidade a elevadas temperaturas e baixa tendência para causar a amplificação não específica (Dorak, 2006; Mao, Leung e Xin, 2007).

Quando se pretende uma análise mais rigorosa e uma quantificação exata do ADN alvo, o uso de sondas é mais adequado. Como o sinal de fluorescência é produzido por hibridação de sondas específicas à sequência de interesse, a especificidade de deteção e a sensibilidade do método aumentam significativamente. Uma grande variedade de sondas estão atualmente disponíveis (ex: Beacon Molecular, sonda Scorpion, e outras), mas as mais

utilizadas são as sondas de hidrólise (sondas TaqMan) (Klancnik *et al.*, 2012). Estas são oligonucleótidos lineares marcados com um fluoróforo na extremidade 5' e com um composto denominado *quencher* na extremidade oposta (Dorak, 2006). O primeiro é responsável pela emissão da fluorescência e o segundo pela absorção de toda a luz emitida pelo fluoróforo. Quando a sonda está intacta não há detecção de fluorescência devido à proximidade destes dois compostos. Durante a PCR a sonda TaqMan hibridiza com a sequência da cadeia simples do ADN complementar alvo. Assim que a amplificação começa, a atividade exonuclease da *Taq* polimerase hidrolisa a sonda no sentido 5' para 3', libertando o fluoróforo em solução (Dorak, 2006; Klancnik *et al.*, 2012). Este acontecimento faz aumentar a intensidade da fluorescência, uma vez que a influência do *quencher* sobre o fluoróforo termina (Figura 10B). O sinal de fluorescência medido é diretamente proporcional à quantidade de ADN-alvo (Sigma-Aldrich, [s.d.]).

A PCR em tempo real tem uma série de características que a torna a escolha para vários estudos. Talvez a mais importante seja a sua capacidade de quantificar ácidos nucleicos através de uma gama dinâmica extraordinariamente grande (pelo menos 5 unidades logarítmicas). Esta, associada à elevada sensibilidade, permite a detecção de menos de cinco cópias (em alguns casos apenas uma cópia) de uma sequência alvo, possibilitando a análise de pequenas amostras ou matrizes muito processadas, como é o caso dos suplementos alimentares. Além disso, os ensaios são rápidos e fáceis de realizar e o risco de contaminação é mínimo, devido ao formato de tubo fechado, não requerendo manipulações pós-PCR (Seifi *et al.*, 2012). Nos últimos anos, esta técnica tem sido muito usada na análise de alimentos, incluindo a identificação de espécies vegetais como legumes, cereais e alergénios (ex. avelã) (Mafra, Ferreira e Oliveira, 2008 (a)).

### **2.3.6 Análise por HRM**

A técnica *high resolution melting* (HRM) baseia-se na análise clássica da curva de desnaturação dos fragmentos da PCR (Kalivas *et al.*, 2014), envolvendo a separação gradual da dupla cadeia de ADN dos produtos amplificados, após a PCR em tempo real, e subsequente detecção das subtis mudanças de fluorescência do corante (Costa, Mafra e Oliveira, 2012 (b)). Por sua vez, esta técnica utiliza os chamados corantes de nova geração, como o LC Green PLUS, EvaGreen ou SYT09, combinados com os instrumentos de maior resolução para medir o comportamento de desnaturação (Kalivas *et al.*, 2014). A análise por HRM revelou-se uma técnica extremamente sensível e específica, permitindo discriminar ADN com apenas uma única diferença nucleotídica. Além disso, ainda prima pela rapidez,

flexibilidade e baixo custo (Kalivas *et al.*, 2014; Vietina, Agrimonti e Marmiroli, 2013). Atualmente, alguns estudos revelam a aplicabilidade desta técnica na identificação e diferenciação de espécies vegetais. A detecção de alergénios, como a amêndoa em alimentos (Costa, Mafra e Oliveira, 2012 (b)), a identificação de óleos adulterantes em azeites (Vietina, Agrimonti e Marmiroli, 2013) e a autenticação e identificação taxonómica das espécies de plantas do género *Sideritis* (Kalivas *et al.*, 2014) são alguns exemplos descritos.

### **2.3.7 Sequenciação de ADN**

A sequenciação de ADN, tal como o nome sugere, é um método que permite determinar a ordem exata de nucleótidos numa amostra de ADN. O primeiro método desenvolvido para a sequenciação, e ainda muito popular, é o método de Sanger. Este consiste na criação de fragmentos de ADN cujos comprimentos vão depender da última base da sequência. Para isso, são necessárias quatro misturas de reação procedidas ao mesmo tempo. Em todas as misturas, um único *primer* complementar a uma parte da sequência alvo e uma ADN polimerase são usados para desenhar as novas cadeias complementares à sequência. Além dos quatro dNTP, cada mistura reacional contém, ainda, uma pequena quantidade de didesoxinucleotídeos trifosfatados (ddNTP) (marcados radioativamente) de cada um dos nucleótidos, um nucleótido diferente para cada mistura de reação. A incorporação deste último elemento à crescente cadeia de ADN faz terminar o seu alongamento por falta do terminal 3'-hidroxil, necessário para formar a ligação fosfodiéster seguinte. Ou seja, na presença de todos os quatro nucleótidos normais, o alongamento da cadeia prossegue normalmente até que a ADN polimerase incorpora um nucleótido de ddNTP em vez do dNTP normal. Após a reação de sequenciação, as cadeias de ADN são desnaturadas e os fragmentos de cada uma das misturas são separados com base no seu comprimento por eletroforese em gel de alta resolução. Dois fragmentos que apresentem comprimentos diferentes, mesmo por um único nucleótido, são separados uns dos outros com precisão. A sequência de bases do novo ADN é lida a partir do autorradiograma das quatro pistas, sendo a leitura feita do fragmento menor para o maior. A detecção da ordem dos nucleótidos pode ainda ser feita de uma forma mais automática e precisa marcando-se, desta vez, os ddNTP com um corante fluorescente específico (por exemplo, ddATP é marcado com o corante verde). Neste caso, todas as reações podem ser feitas no mesmo tubo de ensaio juntando todos os ddNTP. Após, a síntese, desnaturação das cadeias de ADN e eletroforese acoplada a um detetor de fluorescência, os resultados são apresentados num eletroferograma. Neste, cada pico corresponde a um nucleótido e a

leitura é feita da esquerda para a direita (Kole e Abbott G., 2010; Metzker, 2005; Stryer, Mark Berg e Tymoczko, 2002).

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos os chamados instrumentos de sequenciação de “última geração” que são, em geral, baseados num método de amplificação clonal para gerar diretamente conjuntos de moldes de ADN em densidades elevadas sobre uma lâmina de vidro. Os modelos são então sequenciados através da incorporação gradual de nucleótidos ou oligonucleótidos curtos (Linnarsson, 2010). Os avanços na sequenciação de ADN tornaram este método mais simples, automático, eficaz em termos de custos e, conseqüentemente, mais acessível (Kole e Abbott G., 2010; Linnarsson, 2010).

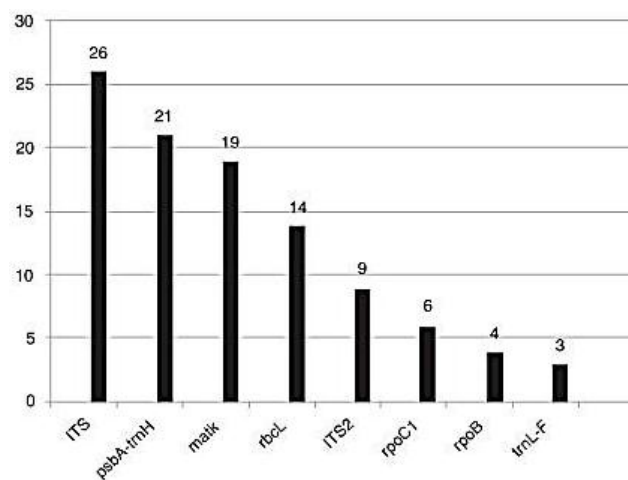
Hoje em dia, a sequenciação de ADN é uma importante ferramenta para a análise de polimorfismos, descoberta de marcadores moleculares e identificação/diferenciação de espécies vegetais (Henry *et al.*, 2012; Kole e Abbott G., 2010). Além disso, este método pode ser aplicado em alimentos processados, onde o ADN ou fragmentos de ADN ainda estão presentes, para distinguir com precisão as matérias-primas através do desenvolvimento de novos marcadores moleculares (Madesis *et al.*, 2014). A sequenciação associada à *DNA barcoding* são os métodos de biologia molecular mais referenciados na literatura para a identificação e autenticação de plantas em suplementos alimentares (LeRoy *et al.*, 2002; Little e Jeanson, 2013; Novak, Grausgruber-Gröger e Lukas, 2007; Xin *et al.*, 2015).

### **2.3.8 DNA barcoding**

Em 2003, surge uma nova técnica de identificação de amostras biológicas utilizando sequências curtas de ADN, conhecidas como *DNA barcode*, a partir de qualquer genoma nuclear ou organelar (Tehen *et al.*, 2014). A técnica denominada *DNA barcoding* baseia-se então na análise da variabilidade das pequenas sequências de ADN dentro do genoma, possibilitando a identificação e diferenciação de organismos geneticamente próximos. Um *DNA barcode* é considerado ideal quando detentor de duas características essenciais: larga cobertura taxonómica (universalidade) e elevada resolução. A primeira característica refere-se à correta amplificação por PCR da sequência alvo no mais amplo painel de taxa. Por outro lado, a segunda característica assegura a identificação de diferentes taxa com base em diferenças interespecíficas (entre diferentes espécies) da sequência selecionada (Galimberti *et al.*, 2013).

Atualmente, vários estudos têm procurado um *DNA barcode* universal para plantas, comparável ao COI (citocromo c oxidase I) em animais (Chen *et al.*, 2010). Tehen *et al.* (2014), num recente trabalho de revisão, avaliou o progresso alcançado até agora no campo

da *DNA barcoding* em relação à identificação de plantas medicinais. Após a análise de 60 publicações obtidas a partir da base de dados SciFinder entre os anos de 2010 e 2013, foram identificadas 17 regiões *barcode* de plantas medicinais. Nomeadamente, *matK*, *rbcL*, ITS, ITS2, *psbA-trnH*, *atpF-atpH*, *ycf5*, *psbKI*, *psbM trnD*, *rps16*, *cox1*, *nad1*, *trnL-F*, *rpoB*, *rpoC1*, *atpF-atpH* e *rps16*. Destas, a região ITS foi a mais mencionada (26 referências) seguida da *psbA-trnH* (21 referências), *matK* (19 referências) e *rbcL* (14 referências). Outras regiões genómicas utilizadas para *barcoding* foram ITS2 (9 referências), *rpoC1* (6 referências), *rpoB* (4 menções) e *trnL-F* (3 referências). A Figura 12 mostra estes resultados. Os candidatos a *DNA barcode* descritos são oriundos das regiões nucleares e cloroplastidiais do genoma.



**Figura 12** Principais regiões genómicas usadas como potenciais *DNA barcode* na identificação de plantas medicinais. Os resultados foram obtidos com base em pesquisas bibliográficas efetuadas na base de dados SciFinder entre os anos 2010-2013 usando as palavras-chave “DNA Barcode \* medicinal plant”. (Adaptado de Techen *et al.*, 2014)

Apesar dos esforços para identificar um *barcode* universal para plantas, a tarefa revelou-se difícil porque nenhum dos *loci* disponíveis é adequado para todas as espécies. Neste sentido, rapidamente se percebeu que um método multi-*locus* poderia ser necessário para discriminar espécies vegetais (Li *et al.*, 2014). Em 2009, o *Consortium for the Barcode of Life-Plant Working Group* (CBOL) recomenda a junção da *matK* com o *rbcL* como o melhor *DNA barcode* para a discriminação de plantas (CBOL Plant Working Group, 2009). O *rbcL*, com cerca de 654 pb (Little, 2013), caracteriza-se por fornecer elevada universalidade, mas menor resolução de espécies. Por sua vez, o *matK*, com aproximadamente 889 pb (Little, 2013), proporciona o oposto. Embora o CBOL recomende o uso conjunto de *rbcL* e *matK* para *barcoding*, outras regiões podem ser mais úteis para a identificação do material medicinal. Dependendo do material a ser analisado, uma ou a combinação de até três



regiões genómicas podem ser precisas para fornecer a informação adequada para a identificação (Techen *et al.*, 2014). Quando se consegue encontrar o melhor candidato ou a melhor combinação de marcadores, a *DNA barcoding* proporciona a rápida identificação e autenticação de plantas medicinais, permitindo também a discriminação dos seus adulterantes ao nível de género e espécie (Selvaraj e Kumar, 2015; Techen *et al.*, 2014).

No entanto, esta técnica nem sempre é adequada quando aplicada em materiais processados, como os suplementos alimentares, devido ao tamanho das sequencias usadas como *DNA barcode*, tal como constatou Kazi *et al.* (2013). No seu estudo de identificação de *Hypericum perforatum* em suplementos alimentares, ao aplicar uma região *barcode* ITS (Internal Transcribed Spacer) com 850 pb em treze amostras de suplementos alimentares, apenas 4 amplificaram positivamente. Alguns estudos têm mencionado que em amostras degradadas ou muito processados, o sucesso da amplificação por PCR aumenta com a diminuição do tamanho das sequências a amplificar (Techen *et al.*, 2014). Neste sentido, pequenas porções das regiões *barcode* – *mini-barcodes*- têm sido sugeridas como alternativa às regiões genómicas de comprimento completo para a análise deste tipo de amostras (Little, 2013). Little e Jeanson (2013) comprovaram o sucesso desta nova abordagem, quando amplificaram, com sucesso, *mini-barcodes* de *matk* e *rbcL* em suplementos alimentares para a deteção da planta *Serenoa repens*, após uma tentativa falhada da amplificação usando as regiões completas.

### **3 Objetivos e âmbito de trabalho**

A *Cynara scolymus* e *Silybum marianum* são duas plantas, que devido às suas propriedades medicinais, fazem parte da composição de muitos suplementos alimentares à base de plantas para a perda de peso. Estes produtos, por serem muitas vezes anunciados como sendo eficazes no tratamento do excesso de peso, são assumidos pela população como uma alternativa segura e natural para o controlo de peso. No entanto, a nível legislativo os suplementos alimentares são considerados como alimentos, não estando sujeitos a qualquer avaliação de estudos de eficácia, segurança e qualidade antes da sua comercialização. Isto pode levar a problemas de adulteração, como a troca acidental de plantas ou substituição deliberada de espécies vegetais de maiores custo por outra semelhante, mas mais barata. Deste modo, para garantir a segurança do consumidor, o desenvolvimento de métodos analíticos para a correta identificação das diferentes espécies vegetais em suplementos alimentares à base de plantas torna-se essencial.

Assim, o presente trabalho teve como principal objetivo detetar as espécies vegetais acima referidas em amostras de suplementos alimentares à base de plantas para a perda de peso, usando as técnicas PCR convencional e PCR em tempo real com análise por HRM. Inicialmente foi necessário identificar um marcador molecular capaz de amplificar o ADN das amostras de suplementos alimentares e encontrar regiões moleculares específicas para cada uma das espécies. Para a identificação da *C. scolyms* utilizaram-se as técnicas PCR qualitativa e PCR em tempo real com análise por HRM e no caso da planta *S. marianum* utilizou-se a técnica PCR qualitativa. Deste modo, pretendeu-se determinar se as técnicas referidas poderiam permitir a identificação rápida e fiável de *C. scolyms* e *S. marianum* em 17 amostras comerciais de suplementos alimentares à base de plantas contendo estas duas espécies.

---

## **COMPONENTE EXPERIMENTAL**

---



## 4 Material e métodos

### 4.1 Descrição e preparação das amostras

Para a realização deste estudo 17 amostras de suplementos alimentares à base de plantas para a perda de peso, contendo alcachofra e cardo mariano, foram adquiridas em ervanárias e supermercados. No conjunto, 9 estavam sob a forma de cápsula, comprimidos ou pós, sendo consideradas no decorrer do trabalho como “amostras sólidas”. As restantes foram apresentadas como “amostras líquidas” (Tabelas 1 e 2). As sementes de *Cynara scolymus* L. concedidas pelo Jardim Botânico de Coimbra e Universidade de Lisboa, e as sementes de *Silybum marianum* L. fornecidas, também, pelo Jardim Botânico de Coimbra, foram utilizadas como plantas de referência. Diversas espécies filogeneticamente próximas das referidas plantas foram, de igual forma, procuradas em vários Bancos de Germoplasma, conseguindo-se 9 espécies: 3 do género *Cynara*, 5 do género *Cirsium* e 1 do género *Jurinea* (Tabela 3). Procedeu-se ainda à aquisição de 43 plantas medicinais, incluindo as espécies em estudo. Algumas foram colhidas na região de Viseu (Portugal) e outras compradas em diversas lojas. A par disso, 6 infusões com mistura de plantas, contendo alcachofra, também foram adquiridas em diversos estabelecimentos comerciais.

As plantas medicinais foram trituradas com recurso a um moinho de lâmina dupla (Grindomix GM200, Retsch, Alemanha). No caso das plantas colhidas em Viseu, antes de serem trituradas foram secas à temperatura ambiente. As amostras sólidas de suplementos alimentares, as sementes e as infusões foram moídas num almofariz. Os suplementos líquidos foram pré-tratados segundo o protocolo estabelecido por Kazi *et al.* (2013), ao qual foram efetuadas algumas alterações. Inicialmente transferiram-se 10 mL de amostra para um tubo de centrifugação e juntou-se 10 mL de etanol absoluto. A mistura foi agitada num vórtex e incubada à temperatura ambiente com agitação (Compact Shaker KS 15 A, Edmund Bühler GmbH, Alemanha), durante 15 min. Após esse período, a solução foi centrifugada duas vezes seguidas a 18.000xg (10°C) durante 15 min cada uma. De seguida, descartou-se o sobrenadante com a ajuda de uma pipeta e colocou-se na estufa a 50°C durante aproximadamente 60 min para evaporar os vestígios de etanol. O resíduo seco foi depois transferido para um tubo estéril de 2 mL com a ajuda de uma pipeta e/ou microespátula com colher. Para facilitar a recolha do resíduo adicionaram-se 300 µL de água ultrapura. Para evitar a ocorrência de contaminações, todo o material foi lavado e esterilizado antes e após a sua utilização para preparação das amostras. Todas as amostras foram colocadas em

recipientes esterilizados, rotuladas e armazenadas à temperatura ambiente, exceto os suplementos líquidos que foram armazenados no frio.

**Tabela I** Descrição das amostras sólidas de suplementos alimentares utilizadas no estudo.

Amostras sólidas	Embalagem	Origem	Ingredientes no rótulo
SA24	Paletas de cápsulas (Caixa com 90 cápsulas)	Portugal	Alcachofra ( <i>Cynara scolymus</i> , 109 mg), dente de leão ( <i>Taraxacum officinale</i> , 104 mg); probióticos gastro-resistentes ( <i>bifidobacterium infantis</i> , <i>bifidobacterium lactis</i> , <i>bifidobacterium longum</i> , <i>eneterococcus faecium</i> , <i>lactobacillus acidophilus</i> , <i>lactobacillus paracasei</i> , <i>lactobacillus plantarum</i> , <i>lactobacillus salivarius</i> , <i>lactococcus lactis</i> , 99 mg), maltodextrina (74 mg), nopal (Figueira-da-india, <i>Opuntia ficus indica</i> , 60 mg), FOS (25 mg), aloé vera ( <i>Aloe ferox</i> , 24 mg, antiaglomerantes: estearato de magnésio (10,68 mg), dióxido de silício (2 mg), linhaça do Canadá ( <i>Linum usitatissimum</i> , 0,5 mg) <i>Psyllium Husk</i> ( <i>Plantago ovata</i> , 0,5 mg), farelo de aveia ( <i>Avena sativa</i> , 0,26 mg), limão (0,2 mg), laranja (0,2 mg), maçã (0,2 mg), toranga (0,2 mg), ananás (0,2 mg).
SA27	14 cápsulas castanhas, 14 cápsulas azuis, 42 cápsulas laranjas e 4 ampolas	Portugal	Semana I (cápsulas castanhas): <i>Cynara scolymus</i> (alcachofra; extrato seco da planta contendo pelo menos 2.5% de cinarina), <i>Silybum marianum</i> L. (cardo mariano, extrato do fruto contendo pelo menos 80% de silimarina), Brassicare™ ( <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Italica</i> ; extrato seco 40:1 dos brócolos, contendo pelo menos 1,6% de glucorafanina), gelatina, citrato de colina, ácido L-ascórbico, diluente: celulose microcristalina; resveratrol ( <i>Polygonum cuspidatum</i> ; extrato seco da raiz contendo pelo menos 98% de trans-resveratrol), lubrificante: estearato de magnésio, antiaglomerante: dióxido de silício.
SA30	Frasco com 160 cápsulas	Portugal	Alcachofra, 100 mg; glucomanano, 500 mg; clordiazepóxido, 5 mg; furosemida, 15 mg; fenoltaleína, 30 mg; benfluorex, 150 mg.
SA37	Paletas de cápsulas (Caixa com 30 cápsulas)	Portugal	FOS, frutooligossacarídeos; alcachofra; fermento de arroz vermelho; bitartarato de colina; inositol; cardo mariano; Vitamina B6 (cloridrato de piridoxina). Excipientes: celulose microcristalina, estearato de magnésio, gelatina.
SA40	Paletas de cápsulas (caixa com 30 cápsulas)	Portugal	Alcachofra (folha da planta em pó); <i>Cynara scolymus</i> (Alcachofra) (ext. seco das folhas 2,5% cinarina). Excipientes: maltodextrina, celulose microcristalina, esterearato de magnésio.
SA41	Pó solúvel (12 saquetas)	UE	Maltodextrina, frutose, fibra solúvel de chicória (inulina) (7,4%), aroma, extrato de cavalinha (1,4%), acidificante (ácido cítrico), antiaglomerante (dióxido de silício), extrato de fucus (0,5%), extrato de urtiga (0,4%), extrato de alcachofra (0,3%), extrato de bolbo (0,2%), edulcorante (sucralose), corante (betacaroteno). Contém edulcorante.
SA42	Pó solúvel (10 saquetas)	UE	Maltodextrina, frutose, fibra de chicória (inulina) (12,5%), extrato de cavalinha ( <i>Equisetum arvense</i> L.) (1,875%), acidificante: ácido cítrico, extrato de espargo ( <i>Asparagus officinalis</i> L.) (1,25%), extrato de laranja amarga ( <i>Citrus aurantium ssp. amara</i> ) (1,25%), beterraba em pó ( <i>Beta vulgaris</i> L.) (0,625%), aromas, extrato de alcachofra ( <i>Cynara scolymus</i> ) (0,625%), extrato de urtiga verde ( <i>Urtica dioica</i> L.) (0,375%), extrato de chá preto ( <i>Camellia sinensis</i> ), antiaglomerante: dióxido de silício, edulcorante: sucralose. Com açúcar (frutose) e edulcorante.
SA43	Paletas de Cápsulas (caixa com 40 cápsulas)	UE	Alcachofra, extrato de alcachofra (5% cinarina), inulina, celulose, microcristalina, estearato de magnésio.
SA44	Comprimidos (30 unidades)	UE	Gelificante: celulose microcristalina; extrato seco de <i>Silybum marianum</i> , cardo mariano (teor mínimo de 80% de silimarina) 29,17%; aglutinante: amido de milho; crosprovidona; anti-aglomerante: estearato de magnésio, silicato de magnésio.

**Tabela 2** Descrição das amostras líquidas de suplementos alimentares utilizadas neste estudo.

Amostras líquidas	Embalagem	Origem	Ingredientes no rótulo
SA8	Xarope, 500 mL	Portugal	Água; edulcorante: sorbitol; extratos concentrados: <i>Cynara scolymus</i> , alcachofra (planta) (teor mínimo 4% cinarina) 22%; <i>Silybum marianum</i> , cardo mariano (planta) (teor mínimo 35% silimarina) 17%; <i>Taraxacum officinale</i> , taraxaco (folhas) (teor mínimo 20% inulina) 15%; <i>Peumus boldus</i> , boldo (folhas) (teor mínimo 0.4% boldina) 15%; <i>Chelidonium majus</i> , celidónia (raiz) (teor mínimo 2.5% celidonina) 8%; <i>Cochlospermum angolense</i> , borututu (raiz) 8%; conservante: sorbato de potássio, benzoato de sódio.
SA12	Xarope, 500 mL	Portugal	Água; edulcorante: sorbitol; gelificante: glicerina; extrato seco de <i>Camellia sinensis</i> , Chá verde (teor mínimo de 50% polifenóis) 0,67%; aroma; vitamina C (ácido L-ascórbico) 0,53%; <i>Silybum marianum</i> , cardo mariano (planta) 0,5%; <i>Allium cepa</i> , cebola amarela (bolbo) 0,5%; <i>Zea mays</i> , milho (barbas) 0,5%; <i>Fragaria vesca</i> , morangueiro (folhas) 0,5%; <i>Nasturtium officinale</i> , agrião (planta) 0,5%; <i>Cynara scolymus</i> , alcachofra (folhas) 0,5%; <i>Alnus glutinosa</i> , amieiro vulgar (casca) 0,5%; <i>Camellia sinensis</i> , chá verde (folhas) 0,5%; <i>Asparagus officinalis</i> , espargo 0,5%; <i>Foeniculum vulgare</i> , funcho (sementes) 0,5%; <i>Orthosiphon stamineus</i> , ortósifo (folha) 0,5%; <i>Hieracium pilosella</i> , pilosela 0,5%; <i>Smilax ornata</i> , salsaparrilha (raiz) 0,5%; conservante: sorbato de potássio, benzoato de sódio, edulcorante: aspartame; conservante: galhato de propilo; edulcorante: sacarina sódica.
SA14	30 Ampolas bebíveis de 10 mL	Portugal	Água purificada; gelificante: glicerina; edulcorante: sorbitol; fluídos de: <i>Orthosiphon stamineus</i> , chá de java (Folhas) 2,0%; <i>Garcinia cambogia</i> (Fruto) 1,17%; <i>Cynara scolymus</i> , alcachofra (Folhas) 1,17%; <i>Ilex paraguarensis</i> , erva mate (folhas) 0,87%; <i>Taraxacum officinale</i> , taraxaco (planta) 0,67%; <i>Equisetum arvense</i> , cavalinha (planta) 0,67%; aroma; <i>Ananas sativus</i> , ananás (fruto) 0,33%; regulador de acidez: ácido cítrico; conservante: sorbato de potássio, benzoato de sódio, galhato de propilo; edulcorante: sacarina sódica
SA15	30 Ampolas bebíveis de 10 mL	Portugal	Água purificada; <i>Cynara scolymus</i> , alcachofra (folha) 10%; regulador de acidez: ácido cítrico; conservante: sorbato de potássio, benzoato de sódio; edulcorante: aspartame; conservante: galhato de propilo; edulcorante: sacarina sódica.
SA29	20 Ampolas	Portugal	Água, edulcorante: sorbitol, <i>Cynara scolymus</i> L. (alcachofra, extrato seco das folhas contendo pelo menos 2,5% de cinarina), conservante: sorbato de potássio, acidificante: ácido cítrico anidro, aroma de pêssego, edulcorante: aspartame.
SA32	Xarope, 600 mL	Portugal	Água, <i>Camellia sinensis</i> (chá verde, folhas), aroma de limão, <i>Cola nitida</i> (cola; casca), <i>Paulinia cupana</i> (guaraná, sementes), <i>Hieracium pilosella</i> (pilosela; planta), <i>Spiraea ulmária</i> (Rainha dos Prados; sumidades floridas), <i>Rhamnus frangula</i> (amieiro negro; casca), <i>Melissa officinalis</i> (erva cidreira, folhas e caules), <i>Foeniculum vulgare</i> Miller (funcho; planta), <i>Citrus limon</i> (limão; casca), <i>Taraxacum officinale</i> (taraxaco; raízes), <i>Cynara scolymus</i> (alcachofra; planta), <i>Aloe barbadensis</i> (aloé vera; sumo), fibras, conservantes: sorbato de potássio, benzoato de sódio, acidificante: ácido cítrico.
SA34	Xarope, 500 mL	Portugal	Extrato concentrado 12:1 de <i>Solanum melongena</i> , beringela 9,26%; aroma: <i>Silybum marianum</i> , cardo mariano (planta) 0.4%; corante alimentar, vitamina C (ácido L-ascórbico) 0,2%; <i>Cynara scolymus</i> , alcachofra (planta) 0,1%; conservante: sorbato de potássio, benzoato de sódio; regulador de acidez: ácido cítrico; conservante: galhato de propilo; edulcorante: sacarina sódica.
SA39	Xarope, 50 mL	Portugal	Glicerina; água purificada; frutose; alcachofra ( <i>Cynara scolymus</i> ); extrato fluído; hipericão ( <i>Hypericum perforatum</i> ), extrato fluído; rábano ( <i>Raphanus sativus</i> ), extrato fluído; amieiro negro ( <i>Rhamnus frangula</i> ), extrato fluído; boldo ( <i>Peumus boldus</i> ), extrato fluído; equinácea ( <i>Echinacea purpurea</i> ), extrato fluído; gengibre ( <i>Zinziber officinale</i> ), extrato fluído; metilparabeno; propilparabeno.

**Tabela 3** Lista das espécies de referência em estudo (Cys1, Cys2 e SiM) e das plantas filogeneticamente próximas (S1-S9) com as respectivas origens.

<b>Código</b>	<b>Amostras</b>	<b>Origem</b>	<b>Número de acesso</b>
<b>CyS 1</b>	<i>Cynara scolymus</i> L.	Jardim Botânico de Coimbra (Portugal)	1782
<b>CyS 2</b>	<i>Cynara scolymus</i> L.	Universidade de Lisboa (Portugal)	-
<b>SiM</b>	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Jardim Botânico de Coimbra (Portugal)	477
<b>S1</b>	<i>Cynara humilis</i> L.	Real Jardim Botánico Juan Carlos I (Espanha)	ALCA-BG-1341/03
<b>S2</b>	<i>Cynara cardunculus</i> L.	Real Jardim Botánico Juan Carlos I (Espanha)	ALCA-BG_0708/04
<b>S3</b>	<i>Cirsium acaule</i> Scop.	Jardin des Plantes et Botanique (França)	0153MC2014
<b>S4</b>	<i>Cirsium neomexicanum</i> A. Gray	Estados Unidos da América	AZ930-0017
<b>S5</b>	<i>Cirsium quercetorum</i> (A. Gray) Jeps.	Estados Unidos da América	CA190-19
<b>S6</b>	<i>Cirsium scariosum</i> Nutt.	Estados Unidos da América	RBG-28
<b>S7</b>	<i>Cirsium undulatum</i> (Nutt.) Spreng.	Estados Unidos da América	CIUNU-SOSUT-930-BE
<b>S8</b>	<i>Jurinea consanguinea</i> DC.	Turquia	-
<b>S9</b>	<i>Cynara syriaca</i> Boiss.	França	0186379

**Tabela 4** Lista das amostras de plantas medicinais e infusões usadas com as respectivas marcas e origens.

<b>Código</b>	<b>Amostra</b>	<b>Marca</b>	<b>Origem</b>
<b>EM 21</b>	Erva príncipe ( <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf)	Happy Flora	Portugal
<b>EM 22</b>	Funcho ( <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.)	Happy Flora	Portugal
<b>EM 23</b>	Dente-de-leão ( <i>Taraxacum officinales</i> F.H. Wigg.)	Happy Flora	Portugal
<b>EM 24</b>	Cavalinha ( <i>Equisetum arvense</i> L.)	Happy Flora	Portugal
<b>EM 25</b>	Cidreira ( <i>Melissa officinalis</i> L.)	Happy Flora	Portugal
<b>EM 26</b>	Camomila ( <i>Matricaria chamomilla</i> L.)	Tetley	Portugal
<b>EM 27</b>	Chá verde ( <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze)	Gorreana	
<b>EM 28</b>	Sálvia ( <i>Salvia officinalis</i> L.)		
<b>EM 29</b>	Hortelã-pimenta ( <i>Mentha piperita</i> )		
<b>EM 30</b>	Borututu ( <i>Cochlospermum angolense</i> Welw. ex Oliv.)	Salutem	
<b>EM 31</b>	Carqueja ( <i>Pterospartum tridentatum</i> L.)	Salutem	
<b>EM 32</b>	Malvas ( <i>Malva sylvestris</i> L.)	Salutem	
<b>EM 33</b>	Sene ( <i>Senna alexandrina</i> Mill.)	Salutem	
<b>EM 35</b>	Tília ( <i>Tilia spp</i> )	Salutem	
<b>EM 36</b>	Uva-ursina ( <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.)	Ervanário portuense	Portugal
<b>EM 37</b>	S. Roberto ( <i>Geranium robertianum</i> L.)	Ervanário portuense	Portugal
<b>EM 38</b>	Alcachofra ( <i>Cynara scolymus</i> L.)	Ervanário portuense	Portugal
<b>EM 39</b>	Passiflora ( <i>Passiflora incarnata</i> L.)	Ervanário portuense	Portugal
<b>EM 40</b>	Boldo ( <i>Peumus boldus</i> Molina)	Ervanário portuense	Portugal



**Tabela 4** Lista das amostras de plantas medicinais e infusões usadas com as respectivas marcas e origens. (Continuação)

<b>Código</b>	<b>Amostra</b>	<b>Marca</b>	<b>Origem</b>
EM 41	Verbena/Gervão ( <i>Verbena officinalis</i> L.)	Ervanário portuense	Portugal
EM 42	Espinheiro alvar ( <i>Crataegus monogyna</i> Jacq)	Ervanário	
EM 43	Valeriana ( <i>Valeriana officinalis</i> L.)	Ervanário portuense	Portugal
EM 44	Cardo mariano ( <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.)	Ervanário portuense	Portugal
EM 45	Orégãos ( <i>Origanum vulgare</i> L.)	Continente	
EM 46	Manjerição ( <i>Ocimum basilicum</i> L.)	Margão	
EM 47	Coentros ( <i>Coriandrum sativum</i> L.)	Margão	
EM 48	Açafrão das Índias ( <i>Curcuma longa</i> L.)	Margão	
EM 49	Pés de cereja ( <i>Prunus avium</i> L.)	Cem Porcento	
EM 50	Lúcia lima ( <i>Aloysia citrodora</i> Paláu)	Jumbo (ao peso)	
EM 51	Eucalipto ( <i>Eucalyptus obliqua</i> L'Hér.)	Jumbo (ao peso)	
EM 52	Gingko biloba ( <i>Ginkgo biloba</i> L.)	-	Portugal (Viseu)
EM 53	Alcachofra 2 ( <i>Cynara scolymus</i> L.)	Cem Porcento	
EM 54	Castanheiro-da-índia ( <i>Aesculus hippocastanum</i> L.)	-	Portugal (Viseu)
EM 55	Videira ( <i>Vitis vinifera</i> L.)	-	Portugal (Viseu)
EM 56	Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	-	Portugal (Viseu)
EM 57	Oliveira ( <i>Olea europaea</i> L.)	-	Portugal (Viseu)
EM 58	Figueira ( <i>Ficus carica</i> L.)	-	Portugal (Viseu)
EM 59	Camomila ( <i>Matricaria chamomilla</i> L.)	-	Portugal (Viseu)
EM 60	Nogueira ( <i>Juglans regia</i> L.)	-	Portugal (Viseu)
EM 61	Chá Procolesterol	Salutem	Portugal
EM 62	Chá cardio	Planta Natur	União Europeia
EM 63	Chá alcachofra e dente de leão	Cem Porcento	União Europeia
EM 64	Chá Gorduras localizadas	Planta Natur	União Europeia
EM 65	Malva	-	Portugal (Viseu)
EM 66	Alcachofra 3 ( <i>Cynara scolymus</i> L.)	-	Portugal (Lisboa)
EM 67	Chá Plantas mistura	Cem Porcento	União Europeia
EM 68	Chá Detox	Naturefoods	União Europeia
EM 69	Lúcia-lima ( <i>Aloysia citrodora</i> Paláu)	Chá flora mundial	Portugal

## 4.2 Reagentes e soluções

- **CTABI-1%PVP-40**

Pesaram-se 2 g do reagente CTAB e 1 g de PVP-40 e adicionaram-se 28 mL de NaCl (5M), 10 mL de Tris HCl (1M) e 4 mL de EDTA (500 mM). A mistura foi dissolvida em água desionizada e o pH corrigido para 7,5 com solução de HCl. No fim, completou-se o volume

para 100 mL com água desionizada. Depois de preparada a solução foi autoclavada e armazenada à temperatura ambiente.

- **CTAB2**

Para 100 mL de solução, pesaram-se 0,5 g do reagente CTAB, adicionaram-se 800 µL de NaCl (5 M) e completou-se o volume com água desionizada. Após autoclavagem, a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

- **Tampão TE 0,1x**

A solução TE 0,1x foi obtida por diluição de 10x da solução TE 1x. Para a preparação da solução concentrada (TE 1x) adicionaram-se 0,5 mL de solução Tris (1 M) a 0,1 mL de EDTA (0,5 M) e completou-se o volume até 50 mL com água desionizada. A solução foi autoclavada a 121°C durante 15 minutos.

- **Tampão Fosfato 1M (pH8)**

O tampão fosfato foi preparado a partir das soluções *stock* de hidrogenofosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e di-hidrogenofosfato de sódio monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) ambas a 1M. A primeira solução *stock* foi obtida dissolvendo-se 28,4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em água desionizada até perfazer 200 mL. Na segunda, pesaram-se 27,6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e dissolveram-se em água desionizada até perfazer 200 mL. Para um volume final de 100 mL de tampão fosfato 1 M, juntaram-se 92 mL da solução *stock* de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 8 mL da solução *stock* de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e corrigiu-se o pH para 8.

- **Tampão Fosfato 1 M (pH 8; 15% de etanol)**

Para um volume final de 100 mL adicionaram-se 15 mL de etanol absoluto a 85 mL de tampão fosfato 1 M (pH 8).

- **Tampão SGTB 1x**

Adicionaram-se 100 mL de SGTB 20x (GRiSP Research Solutions, Porto, Portugal) a água desionizada até perfazer 2 L.

- **Solução de dNTP**

Adicionaram-se 50 µL de cada dNTP a 1800 µL de água ultra-pura e armazenaram-se a -20°C na forma de alíquotas de 500 µL.

- **Tampão de carregamento 6x**

Em 5 mL de água desionizada dissolveram-se 4 g de sacarose e 5 mg de azul de bromofenol. Adicionaram-se 2,4 mL de EDTA (0,5 M) e completou-se o volume até 10 mL com água desionizada. Depois de preparada, a solução foi autoclavada e armazenada a -20 °C.

### **4.3 Métodos de extração de ADN**

Dependendo do tipo de amostra, foram usados diferentes métodos de extração de ADN. O ADN das plantas medicinais foi extraído usando o método CTAB, segundo o protocolo descrito por Mafra *et al.* (2008), ao qual foram efetuadas algumas alterações como a adição de 1% de PVP. Para a extração do ADN das sementes de *Cynara scolymus* e *Silybum marianum* utilizou-se o kit comercial Nucleospin Plant II (protocolo 2) de acordo com as instruções do fabricante, assim como para as restantes plantas filogeneticamente próximas. No caso das amostras sólidas de suplementos alimentares testou-se duas vezes o mesmo método de extração de ADN, Nucleospin Plant II, mas usaram-se 2 protocolos diferentes, 1 e 2. Ao protocolo 1, foi ainda adicionado um passo inicial que envolveu a utilização do tampão fosfato 1 M (pH 8; 15% de etanol). Para as amostras líquidas de suplementos alimentares também se usou o método Nucleospin Plant II (protocolo 2) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.3.1 CTAB 1% PVP**

Pesaram-se 100 mg de cada amostra para um tubo estéril de 2 mL e adicionaram-se 1000 µL de CTAB 1-1%PVP (2% CTAB (m/v); 0,1 mol/L Tris; 1,4 mol/L NaCl; 1% PVP-40 (polivilpirroliona (m/v); 0,02 mol/L EDTA; pH 8,0) pré-aquecido a 65°C e 20 µL de β-mercaptoetanol. Os tubos foram vigorosamente agitados (vórtex) e incubados a 65°C durante 1 h num termobloco, a uma agitação a 900 r.p.m. Durante a incubação, as amostras foram agitadas no vórtex a cada 15 min. No final da incubação, a mistura foi centrifugada a 18 000 xg a 4°C, durante 15 minutos e transferiram-se entre 600-700 µL de sobrenadante para um novo tubo estéril de 1,5 mL. Voltou-se a fazer uma nova centrifugação (18 000 x g, 4°C, 5 minutos) e transferiram-se 600 µL do sobrenadante para outro tubo estéril de 1,5 mL. Adicionaram-se 500 µL de cloróformio, misturou-se a solução durante 20 segundos no vórtex e centrifugou-se a mistura (18 000 x g, 4 °C, 10 min). A fase superior foi transferida para um tubo estéril de 2 mL e adicionou-se duas partes em volume de CTAB2 (0,5% CTAB

(m/v); 0,04 M NaCl) para favorecer a precipitação. A mistura foi agitada por inversão e incubada durante 1h à temperatura ambiente. Após uma nova centrifugação (12 000 x g, 10°C, 10 min), descartou-se o sobrenadante e dissolveu-se o precipitado em 350 µL NaCl 1,2 M e em 350 µL clorofórmio. A mistura foi vigorosamente agitada (vórtex) durante 30 s e novamente centrifugada (12 000 x g, 4°C, 10 min). A fase superior foi transferida para um novo tubo estéril de 1,5 mL e misturada por inversão com 0,6 partes de volume de isopropanol (100%) a -20°C. Centrifugou-se novamente a mistura (12 000 x g, 4°C, 10 min), descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi cuidadosamente lavado com 500 µL de uma solução de etanol (70% v/v) a -20°C. Procedeu-se a uma nova centrifugação (12 000 x g, 4°C, 10 min) e o solvente (etanol) foi removido cuidadosamente com a ajuda de uma micropipeta. Os tubos foram colocados a secar em estufa, a 50°C, durante 1 h para eliminar totalmente o solvente, por evaporação. Por último, o *pellet* seco foi dissolvido em 100 µL de TE 0,1x durante toda a noite com agitação suave (300 r.p.m.) a 10°C, de modo a promover uma melhor hidratação dos extratos.

#### **4.3.2 NucleoSpin Plant II**

O Kit NucleoSpin Plant II foi utilizado para dois protocolos de extração (1 e 2), que foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, não sendo efetuado o passo da adição da RNase.

As extrações que envolveram a utilização do protocolo 1 (amostras sólidas de suplementos alimentares) foram sujeitas a um pré-tratamento com tampão fosfato 1 M (pH 8; 15% de etanol). Este consistiu na adição de 400 µL do respetivo tampão em 100 mg de amostra. A mistura foi agitada vigorosamente (vórtex) e incubada a 65°C, durante 20 min num termobloco, a uma agitação de 700 r.p.m. De seguida, adicionou-se o tampão PL1 do kit NucleoSpin Plant II e prosseguiu-se com o protocolo sem a adição da RNase.

#### **4.4 Avaliação e quantificação do ADN extraído**

A avaliação da concentração e pureza do ADN extraído foi efetuada por espectrofotometria UV com o Leitor de Microplacas Multidetecção Synergy™ HT e o dispositivo Take3 (Biotek Instruments, Winooski, Estados Unidos da América), que é específico para leitura UV de extratos de ácidos nucleicos. A determinação da concentração e pureza dos extratos foi efetuada usando o *software* de análise de dados Gen5 v2.01 por medição das absorvências (A) a 260 nm, 280 nm e 320 nm. Estes comprimentos de onda

correspondem aos picos de absorção UV de ADN, proteínas e material estranho, respetivamente. A pureza dos extratos foi determinada pela razão das absorvências a 260 nm e 280 nm, onde valores perto de 1,8 representam extratos com elevada pureza. A absorvência a 320 nm funciona como controlo da presença de contaminantes, sendo que o valor ideal seria nulo. A determinação dos valores da concentração de ADN dos extratos (em ng/μL) foi obtida pelo *software*, procedendo-se de seguida à sua diluição para uma concentração de 10 ng/μL para posterior amplificação por PCR.

O ADN extraído foi ainda avaliado no que diz respeito à sua integridade. Para tal, as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Gel Red 1x (Biotium, Hayward, CA, Estados Unidos da América). O gel foi preparado e mergulhado em tampão SGTB 1x (GRiSP Research Solutions, Porto, Portugal). No primeiro poço colocaram-se 5 μL de marcador de massa molecular HyperLadder 1 (Bioline, Londres, Reino Unido). Nos restantes poços foram colocados 5 μL do extrato de ADN, previamente misturados com 4 μL de corante de carregamento. A eletroforese decorreu durante 25 min a uma tensão elétrica de 200 V. No fim, a imagem digital do gel foi automaticamente adquirida através do sistema de imagem Gel Doc EZ (Bio-Rad Laboratories, EUA).

## 4.5 Amplificação por PCR

### 4.5.1 Primers (Oligonucleótidos)

Para a realização deste trabalho foram utilizados vários *primers* universais (18SRG-F/18SRG-R, EG-F/EG-R, rbcL-F1/rbcL-R1, rbcL-F12/rbcL-R2 e matK-F2/matK-R2) e *primers* específicos para as espécies em estudo (CyC-F1/CyC-R1, CyS-F1/CyS-R1, SyM-F/SyM-R e Sil-F1/Sil-R1) (Tabela 5). Os primeiros foram usados com o objetivo de confirmar a presença de ADN amplificável em todas as amostras em estudo. Os segundos foram obtidos com o intuito de identificar apenas as espécies de interesse, neste caso a *C. scolymus* (alcachofra) e *S. marianum* (cardo mariano). Todos os *primers* foram desenhados com base nas sequências disponíveis na base de dado Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os *primers* 18SRG-F/18SRG-R e EG-F/EG-R foram obtidos a partir do gene nuclear *18S ribosomal RNA* (18S rRNA) e os *primers* rbcL-F1/rbcL-R1, rbcL-F2/rbcL-R2 e matK-F2/matK-R2 surgem de regiões cloroplastidiais a partir do gene ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase e maturase K, respetivamente. Os *primers* CyC-F1/CyC-R1 e CyS-F1/CyS-R1 usados na identificação de alcachofra foram desenhados sobre as sequências nucleotídicas dos microssatélites *clone CELMS-57* de *Cynara cardunculus* e *clone CLIB3* de *Cynara scolymus*, respetivamente. No caso

dos oligonucleótidos utilizados na detecção do cardo mariano, SyM-F/SyM-R e Sil-FI/Sil-RI, foram obtidos sobre uma sequência de ARN mensageiro da proteína *preprosilpepsin 2* de *S. marianum*. Para o desenho utilizou-se o programa *Primer3 Input designing tool* (<http://primer3.ut.ee/>) e ajustou-se manualmente quando necessário. As propriedades dos *primers*, bem como a não existência de formação de *hairpins* ou auto-hibridação foram confirmados através do software *Oligo Calc* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html>). A especificidade de todos os oligonucleótidos foi estudada através da ferramenta *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) que permite revelar as homologias de um par de *primers* relativamente a todas as sequências presentes na base de dados do GenBank. A síntese dos *primers* foi efetuada pela empresa Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemanha).

**Tabela 5** Primers usados em PCR qualitativa.

Sequencia alvo	Primers	Sequencia dos primers (5'-3')	Amplificação (pb)	GenBank:
18S rRNA	18SRG-F 18SRG-R	CTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTA TTGGATGTGGTAGCCGTTTCTCA	113	HQ873432.1
18S rRNA	EG-F EG-R	TCGATGGTAGGATAGTGGCCTACT TGCTGCCTTCCTTGGATGTGGTA	109	AF412275
rbcl	rbcl-F1 rbcl-R1	ACTTGAACGCTACTGCAGGTACATG TGAGCCAAGCTAGTATTTGCAGTGA	130	AF206813.1
rbcl	rbcl-F2 rbcl-R2	AAGGGAGATCACTTTAGGCTTTGTTG ACCTGGCATAGAGACCCAATCTTGA	106	AF206813.1
matK	matK-F2 matK-R2	CTTCCTTAGAGGCAACAGAAATCGT TGGGGTAGGGTATTAGTACATCTGA	126	AF288128.1
<i>Cynara scolymus</i>	CyC-F1 CyC-R1	TCCTCTGTGTGGGAAAGTGGCAT TCGCATCTGCCTCTAGTTATAACAGC	130	EU744973.1
<i>Cynara scolymus</i>	CyS-F1 CyS-R1	TGCCAGTGCAGGTGGAATCAGT CAAGTGTTGCCTGCTGTTGAAAC	120	AF527029.1
<i>Silybum marianum</i>	SyM-F SyM-R	TCGGTGAGATTGGTATCGGGACT ACCCAACACGATACTGAACTGTAGC	115	JX535388.1
<i>Silybum marianum</i>	Sil-F1 Sil-R1	TCGGTGAGATTGGTATCGGGAC ACCTTGAATGAACCCAACACGA	260	JX535388.1

#### 4.5.2 PCR qualitativa

Para a amplificação por PCR qualitativa utilizou-se água ultrapura (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), solução tampão (670 mM Tris-HCl, pH 8.8, 160 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1% Tween 20), solução de  $\text{MgCl}_2$ , dNTP (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha), enzima SuperHot Taq Polymerase™ (Genaxxon Bioscience GmbH, Alemanha), *primers* e extrato de ADN para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , consoante as quantidades apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6** Componentes e respetivas quantidades utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com diferentes *primers*.

Componentes ( $\mu\text{L}$ )	Primers									
	I8SRG-F I8SRG-R	EG-F EG-R	<i>rbcL</i> -F1 <i>rbcL</i> -R1	<i>rbcL</i> -F2 <i>rbcL</i> -R2	matK - F2 matK - R2	CyC-F1 CyC-R1	CyS-F1 CyS-R1	SyM-F SyM-R	SiI-F1 SiI-R1	
Água ultrapura	15,6	13,9	15,3	14,7	15,3	13,9	13,9	13,7	14,9	
Tampão (10x)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	1,5	3,0	2,0	2,0	2,0	3,0	2,0	3,0	2,0	
dNTP (2,5 mM cada)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	
Primer Forward (10 $\mu\text{M}$ )	0,6	0,7	0,5	0,8	0,5	0,7	0,7	0,8	0,7	
Primer Reverse (10 $\mu\text{M}$ )	0,6	0,7	0,5	0,8	0,5	0,7	0,7	0,8	0,7	
Taq Polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
Extrato de ADN (10ng/ $\mu\text{L}$ )	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	
Volume Total	25 $\mu\text{L}$									

As reações de amplificação foram efetuadas num termociclador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, EUA) com condições de tempo e temperatura diferentes para cada par de *primers* e indicadas na Tabela 7. Em todas as reações incluiu-se um controlo negativo, em que se substituiu o volume de extrato de ADN por água ultrapura. No final da reação de PCR todos os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão SGTB 1x e corado com Gel Red 1x durante

30 min a 200 V. Um dos poços do gel foi usado para colocar 2 µL de marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha) previamente misturado com 4 µL de tampão de carregamento 6x. A cada um dos restantes poço, adicionaram-se 20 µL de produto PCR também misturado com 4 µL de tampão de carregamento 6x.

**Tabela 7** Condições utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com diferentes *primers*.

Etapas da PCR	Primers									
	18SRG-F 18SRG-R	EG-F EG-R	<i>rbcL</i> -F1 <i>rbcL</i> -R1	<i>rbcL</i> -F2 <i>rbcL</i> -R2	matK- F2 matK- R2	CyC-F1 CyC-R1	CyS-F1 CyS-R1	SyM-F SyM-R	Sil-F1 Sil-R1	
Desnaturação	95°C (5 min)	95°C (5 min)	95°C (5 min)	95°C (5 min)	95°C (5 min)	95°C (5 min)	95°C (5 min)	95°C (5 min)	95°C (5 min)	95°C (5 min)
Amplificação	95°C (30 s)	95°C (30 s)	95°C (30 s)	95°C (30 s)	95°C (30 s)	95°C (30 s)	95°C (30 s)	95°C (30 s)	95°C (30 s)	95°C (30 s)
	65°C (30 s)	63°C (30 s)	60°C (30 s)	64°C (30 s)	60°C (30 s)	57°C (30 s)	59°C (30 s)	53°C (30 s)	57°C (30 s)	
	72°C (30 s)	72°C (30 s)	72°C (30 s)	72°C (30 s)	72°C (30 s)	72°C (30 s)	72°C (30 s)	72°C (30 s)	72°C (30 s)	72°C (30 s)
Nº Ciclos	38	38	40	40	40	40	40	40	40	40
Extensão	72°C (5 min)	72°C (5 min)	72°C (5 min)	72°C (5 min)	72°C (5 min)	72°C (5 min)	72°C (5min)	72°C (5min)	72°C (5min)	72°C (5min)

#### 4.5.3 PCR em tempo real e análise *High Resolution Melting* (HRM)

A técnica de PCR em tempo real acoplada à análise por HRM foi desenvolvida de forma a obter uma metodologia que permitisse a discriminação rápida e fiável da espécie *Cynara scolymus* das restantes espécies do mesmo género. E ainda, para permitir a sua identificação em suplementos alimentares à base de plantas. Para isso, foram realizadas dois ensaios de PCR em tempo real acoplados a análise por HRM: um utilizando apenas as espécies do género *Cynara* (*C. scolymus*, *C. humilis*, *C. cardunculus* e *C. Syriaca*) e outro utilizando o mesmo grupo de plantas mais os suplementos alimentares. O *primers* CyC-F1/CyC-R1 foram os escolhidos para a análise porque durante a PCR convencional revelaram ter a capacidade de amplificar ADN de todas as amostras testadas do género *Cynara*.

As amplificações por PCR em tempo real foram realizadas num volume total de 20 µL contendo água ultrapura, 1x SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories, EUA), *primers* e extrato de ADN de acordo com as quantidades apresentadas na Tabela 8. Cada



amostra foi amplificada em quadruplicado e em cada ensaio foi incluído um controle negativo, em que se substituiu o extrato de ADN por água ultrapura.

**Tabela 8** Componentes e respectivas quantidades utilizados nas amplificações por PCR em tempo real com os primers CyC-FI/RI.

<b>Componentes (µL)</b>	<b>Primers: CyC-FI/CyC-RI</b>
Água ultrapura	6,4
SsoFast™ Evagreen® Supermix	10,0
Primers (10 µM)	0,8 cada
Extrato de ADN (25 ng/µL)	2,0
Volume final	20,0

Após as amplificações, prosseguiu-se para a análise por HRM, na qual se favoreceu a hibridação da cadeia dupla de ADN seguida da criação de condições específicas para a formação de uma curva de desnaturação. Estas consistiram num aumento gradual da temperatura, com incrementos de 0,2°C a cada 10 s, até se atingirem os 95°C. As condições de tempo e temperatura utilizadas na PCR em tempo real e na análise por HRM, para cada primer, estão descritas na Tabela 9. As reações foram efetuadas num termociclador CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, EUA) sendo os dados adquiridos e processados pelo software Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, Laboratories, EUA). A análise por HRM foi efetuada com recurso ao software Precision Melt Analysis 1.2 (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA).

**Tabela 9** Condições utilizadas nas amplificações por PCR em tempo real e na análise por HRM com os primers CyC-FI/ CyC-RI.

<b>Primers: CyC-FI/CyC-RI</b>				
<b>PCR em tempo real</b>			<b>Análise HRM</b>	
Temperatura	Duração	Nº de ciclos	Temperatura	Duração
95°C	5min	1	95°C	1min
95°C	10s	45	65°C	5
57°C	20s		65°C a 95°C	0,2°C /10 min

#### 4.5.4 Sequenciação

No sentido de confirmar a identidade dos produtos obtidos a partir da PCR em tempo real e da análise por HRM com os *primers* CyC-FI/CyC-RI os fragmentos foram sequenciados. A técnica de sequenciação também foi usada para obter o tamanho correto do fragmento de ADN amplificado com *primers* Sil-FI/Sil-RI. Para a realização da sequenciação, novos conjuntos de *primers* (CyC-FS/CyC-RS e Sil-FS/Sil-RS) foram especificamente desenhados para produzir fragmentos maiores (373 pb e 321 pb, respetivamente), abrangendo as regiões de 130 pb e 126 pb definidas pelos *primers* CyC-FI/CyC-RI e Sil-FI/Sil-RI, respetivamente. Estes novos fragmentos foram amplificados em duplicado por PCR qualitativa, segundo o programa definido na Tabela 10.

**Tabela 10** Condições utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com os *primers* CyC-FS/CyC-RS e Sil-FS/Sil-RS.

<b>Primers CyC-FS/CyC-RS e Sil-FS/Sil-RS</b>			
<b>Etapas da PCR</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Duração</b>	<b>Nº de ciclos</b>
Desnaturação	95 °C	5 min	1
	95 °C	30 s	
Amplificação	56 °C	45 s	40
	72 °C	60 s	
Extensão	72 °C	5 min	1

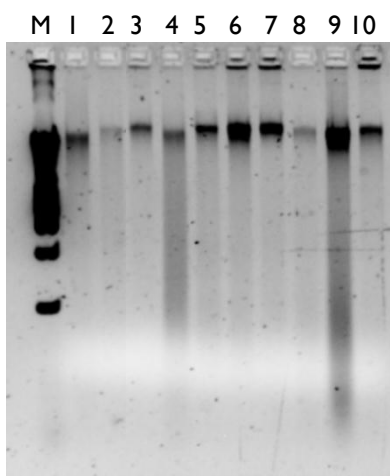
As componentes e respetivas quantidades utilizadas na amplificação com os novos *primers* (CyC-FS/CyC-RS e Sil-FS/Sil-RS) são iguais às estabelecidas para os *primers* CyC-FI/CyC-RI e *primers* Sil-FI/Sil-RI, encontrando-se descritas nas Tabelas 6, com a duplicação de volumes de forma ao volume total ser 50 µL. Após a PCR e de forma a confirmar o sucesso da amplificação, uma pequena porção do produto (2 µL) foi visualizada por eletroforese em gel de agarose. Os restantes produtos amplificados foram purificados e enviados para sequenciação. A purificação foi realizada usando o kit JETquick PCR Purification Spin (Genomed, Löhne, Alemanha), segundo as instruções do fornecedor e a sequenciação foi efetuada pela empresa StabVida (Caparica, Portugal). Os resultados da sequenciação foram analisados e editados manualmente com recurso aos *softwares* BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) e FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) disponíveis online.

## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Avaliação dos extratos de ADN de plantas medicinais e infusões

Após a aplicação do método CTAB 1%PVP descrito na secção 4.3.1, os extratos de ADN foram avaliados quanto à sua concentração, pureza e integridade. Extratos com níveis de pureza entre 1,7 e 2,1 podem-se considerar de boa qualidade, sendo que o valor ótimo dever-se-á centrar à volta de 1,8. Valores de pureza menores que 1,7 indicam uma possível contaminação com proteínas ou outras substâncias (como polissacarídeos e outros metabolitos secundários) e valores maiores que 2,1 sugerem a contaminação com ARN. A Tabela II apresenta os valores de pureza de cada extrato, bem como o valor médio da concentração do ADN. Em geral, os extratos encontraram-se dentro dos limites de pureza requeridos e os valores de concentração de ADN foram muito variáveis, sendo que o rendimento mais baixo foi de 5,9 ng/μL (EM66 – alcachofra 3) e o mais alto de 1011,2 ng/μL (EM59 – camomila).

Para avaliar a integridade do ADN genómico das plantas medicinais e chás, os extratos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose. Os resultados indicaram a presença de ADN integro de elevado peso molecular (~10.000 pb) em todas as amostras. A Figura 13 mostra alguns desses resultados. De modo geral, todos os extratos das plantas medicinais e infusões foram considerados com concentração, qualidade e integridade adequados para posterior amplificação.



**Figura 13** Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico extraído pelo método CTAB-PVP de algumas plantas medicinais. Linha 1 – alcachofra (EM38); linha 2 – alcachofra (EM53); linha 3 – alcachofra (EM66); linha 4 – valeriana (EM43); linha 5 – dente de leão, linha 6 – cavalinha (EM24); linha 7 – cidreira (EM25); linha 8 – sálvia (EM28); linha 9 – cardo mariano (EM44) linha 10 – malva (EM65). M – marcador HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

**Tabela II** Valores das purezas e concentrações médias do ADN extraído das plantas medicinais e infusões.

<b>Código</b>	<b>Amostra</b>	<b>Pureza (<math>A_{260}/A_{280}</math>)</b>	<b>Concentração (ng/<math>\mu</math>L)</b>
EM21	Erva príncipe	1,9	80,6
EM22	Funcho	2,0	169,7
EM23	Dente-de-leão	2,0	120,6
EM24	Cavalinha	2,0	161,9
EM25	Cidreira	2,1	109,0
EM26	Camomila	2,0	220,1
EM27	Chá verde	2,1	212,5
EM28	Sálvia	2,0	36,2
EM29	Hortelã-pimenta	2,0	135,5
EM30	Borututu	1,6	25,0
EM31	Carqueja	1,6	15,9
EM32	Malvas	1,9	19,5
EM33	Sene	2,1	34,3
EM34	Mate Verde	2,0	19,0
EM35	Tília	2,3	26,5
EM36	Uva-ursina	1,8	17,1
EM37	S. Roberto	1,6	47,0
EM38	Alcachofra	1,6	45,3
EM39	Passiflora	1,9	44,9
EM40	Boldo	1,9	15,5
EM41	Verbena/Gervão	1,9	36,3
EM42	Espinheiro alvar	2,0	48,4
EM43	Valeriana	1,7	130,0
EM44	Cardo mariano	2,1	62,7
EM45	Orégãos	2,1	106,8
EM46	Manjerição	2,1	412,7
EM47	Coentros	1,9	23,5
EM48	Açafrão das Índias	1,9	17,5
EM49	Pês de cereja	1,9	40,0
EM50	Lúcia lima	1,9	24,3
EM51	Eucalipto	2,1	19,8
EM52	Gingko biloba	1,9	60,5
EM53	Alcachofra 2	1,5	10,4
EM54	Castanheiro-da-índia	1,6	14,8
EM55	Videira	1,8	31,6
EM56	Alecrim	1,5	10,2
EM57	Oliveira	1,8	11,7
EM58	Figueira	1,9	81,3
EM59	Camomila	1,9	1011,2
EM60	Nogueira	1,8	32,6
EM61	Chá Procolesterol	1,7	55,1
EM62	Chá cardio	1,7	46,9
EM63	Chá alcachofra/dente de leão	1,7	81,8
EM64	Chá Gorduras localizadas	1,9	51,5
EM65	Malva	1,9	43,2
EM66	Alcachofra 3	1,8	5,9
EM67	Chá Plantas mistura	1,9	243,0
EM68	Chá Detox	2,0	402,9
EM69	Lúcia-lima	2,2	800,7

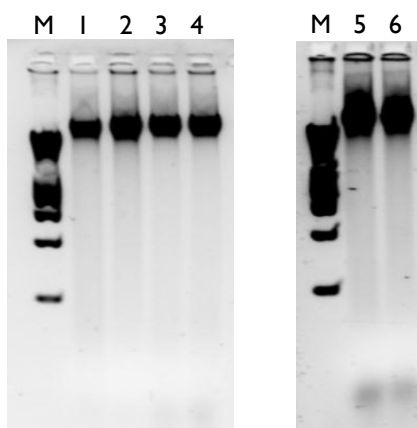
## 5.2 Avaliação dos extratos de ADN de sementes

Para a extração do ADN das sementes utilizou-se o método NucleoSpin Plant II, protocolo 2. Tal como no ponto anterior, avaliou-se a concentração, a pureza e a integridade dos extratos. Os resultados da estimativa da concentração de ADN encontram-se reunidos na Tabela 12. Os extratos de ADN apresentaram concentrações variáveis, com valores entre 15,93 ng/ $\mu$ L (amostra S7) e 675,72 ng/ $\mu$ L (amostra S6), evidenciando elevada pureza ( $2,0 \pm 0,2$ ). Apenas a amostra S4 apresentou uma pureza baixa, rondando 1,1; sugerindo uma potencial contaminação por proteínas ou outros compostos que absorvam a 280 nm. De acordo com esta informação, os extratos foram considerados com concentração e pureza adequados para posterior amplificação.

**Tabela 12** Valores das purezas e concentrações médias do ADN extraído das sementes.

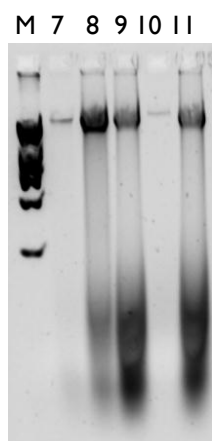
<b>Código</b>	<b>Amostras</b>	<b>Pureza (<math>A_{260}/A_{280}</math>)</b>	<b>Concentração (ng/<math>\mu</math>L)</b>
<b>CyS 1</b>	<i>Cynara scolymus</i>	1,8	59,3
<b>CyS 2</b>	<i>Cynara scolymus</i>	1,8	82,1
<b>SiM</b>	<i>Silybum marianum</i>	1,9	69,1
<b>S1</b>	<i>Cynara humilis</i>	2,1	152,1
<b>S2</b>	<i>Cynara cardunculus</i>	2,2	241,5
<b>S3</b>	<i>Cirsium acaule</i>	1,9	126,5
<b>S4</b>	<i>Cirsium neomexicanum</i>	1,1	40,7
<b>S5</b>	<i>Cirsium quercetorum</i>	2,0	252,9
<b>S6</b>	<i>Cirsium scariosum</i>	2,1	675,7
<b>S7</b>	<i>Cirsium undulatum</i>	2,0	15,9
<b>S8</b>	<i>Jurinea consanguínea</i>	2,1	590,7
<b>S9</b>	<i>Cynara syriaca</i>	2,2	321,5

A integridade do ADN genómico das sementes foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. A Figura 14 mostra a integridade do ADN extraído das sementes de alcachofra (*C. scolymus*) e cardo mariano (*S. marianum*) (plantas de referência do estudo). Os géis apresentam bandas intensas de elevada massa molecular ( $\sim 10.000$  pb). Devido à ausência de arrastamento resultante da presença de ADN degradado ou da contaminação com ARN, considera-se que a integridade dos extratos é elevada.



**Figura 14** Eletroforese em gel de agarose do ADN genômico extraído pelo método NucleoSpin Plant II das sementes de alcachofra e cardo mariano (material de referência). Linhas 1 – *C. scolymus* (CyS1); linha 2 – *C. scolymus* (CyS1) (duplicado); linha 3 – *C. scolymus* (CyS2); linha 4 – *C. scolymus* (CyS2) (duplicado); linha 5 – *S. marianum* (SyM 1); linha 6 – *S. marianum* (SyM 1) (duplicado). M – Marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

Nas restantes amostras de sementes, que correspondem às plantas filogeneticamente próximas às espécies em estudo, também, foi detetável ADN integro de elevada massa molecular (Figura 15). No entanto, a intensidade das bandas foi menor para as amostras S4 (Linha 7) e S7 (Linha 10), que também evidenciaram valores de concentração de ADN mais baixos (Tabela 12).



**Figura 15** Eletroforese em gel de agarose do ADN genômico extraído pelo método NucleoSpin Plant II de algumas sementes filogeneticamente próximas às plantas de referência. Linha 7 – *Cirsium neomexicanum* (S4); linha 8 – *Cirsium quercetorum* (S5); linha 9 – *Cirsium scariosum* (S6); linha 10 – *Cirsium undulatum* (S7); linha 11 – *Jurinea consanguínea* (S8). M - marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

### 5.3 Avaliação dos extratos de ADN de suplementos alimentares à base de plantas

#### 5.3.1 Amostras sólidas

A Tabela 13 reúne os valores das concentrações e purezas obtidas para cada uma das nove amostras sólidas de suplementos alimentares que foram previamente extraídas com o método NucleoSpin Plant II protocolo 2. Em geral, os extratos apresentaram baixo rendimento, à exceção das amostras, SA37, SA40 e SA43, das quais resultaram extratos com

concentrações superiores a 100 ng/μL. As restantes amostras mantiveram-se abaixo dos 20 ng/μL, não sendo possível quantificar o ADN da SA30, SA41, SA42 e SA44. Em relação à pureza dos extratos, as amostras apresentaram pureza na ordem dos 1,8-2,1.

**Tabela 13** Valores das purezas e concentrações do ADN extraído pelo método NucleoSpin Plant II (protocolo 2) das amostras sólidas de suplementos alimentares.

Amostras	Pureza ( $A_{260}/A_{280}$ )	Concentração (ng/μL)
SA24	1,8	18,9
SA27	2,1	14,8
SA30	-	NQ
SA37	1,8	101,6
SA40	2,0	167,0
SA41	-	NQ
SA42	-	NQ
SA43	2,1	115,9
SA44	-	NQ

NQ- Não quantificável.

As amostras sólidas de suplementos alimentares caracterizam-se por serem produtos muito processados e de formulação bastante complexa. Além dos extratos das plantas, estes produtos são constituídos por uma variedade de compostos químicos, como agentes ligantes, diluentes, lubrificantes, corantes e estabilizadores. De acordo com Costa *et al.* (2015), concluiu-se que determinados excipientes presentes em alguns suplementos alimentares, nomeadamente sílica, talco, dióxido de titânio e óxido de ferro têm a capacidade de adsorver o ADN, impedindo a sua extração. Este estudo adianta ainda, que o talco aparenta ter um efeito de adsorção ao ADN maior do que a sílica. Estes dados, coincidem com os resultados obtidos. Ao analisar a lista de ingredientes das amostras em estudo, verificou-se que aquelas que apresentam baixo rendimento de extração, à exceção da SA30, têm em comum a presença de sílica na sua composição. A amostra SA44 é formulada com talco e apesar de conter uma elevada quantidade de material vegetal (29,2% de extrato seco de cardo mariano) não foi possível quantificar o ADN resultante da extração. A amostra SA30 não tem qualquer um destes compostos químicos, no entanto, aparenta ter uma grande quantidade de polissacarídeos. Após a adição do reagente de lise à amostra SA30, formou-se uma solução muito viscosa (Figura 16) que é associada à presença de polissacarídeos em amostras de ADN (Sahu, Thangaraj e Kathiresan, 2012). A formação

deste “gel” dificultou a respetiva extração do ADN da amostra, justificando-se deste modo a sua não quantificação.



**Figura 16** Amostra SA30 gelificada.

Na tentativa de ultrapassar o problema da adsorção do ADN aos excipientes presentes nos suplementos alimentares, as amostras foram sujeitas a um pré-tratamento com tampão fosfato 1 M (pH 8; 15% de etanol). De acordo com um estudo realizado por Direito et al (2012), esta solução foi utilizada na extração de ácidos nucleicos de bactérias e fungos adsorvidos em minerais terrestres e análogos aos de marte. A maior parte dos minerais utilizados no referido estudo eram silicatados, reconhecendo-se mais uma vez o poder de adsorção da sílica ao ADN. Esta equipa explorou vários métodos na tentativa de obter maiores rendimentos de extração, incluindo o uso de elevadas temperaturas, condições ácidas e a introdução de um tampão fosfato às amostras antes da extração. O último método foi o que mostrou maior eficiência. O fosfato é apontado como um competidor químico para locais de adsorção à sílica, ou seja, em teoria, o tampão compete com o ADN para a ligação à sílica. De acordo com o mesmo estudo, várias formulações de tampão fosfato foram testadas, sendo o tampão fosfato 1 M (pH 8; 15% de etanol) considerado o mais eficaz na extração do ADN. Desta forma, este tampão foi escolhido para extrair ADN de suplementos alimentares.

A Tabela 14 mostra os resultados obtidos em termos de pureza e concentração média de ADN das amostras de suplementos pré-tratadas com tampão fosfato e extraídas pelo método NucleoSpin Plant II, protocolo 1. Apesar de se utilizar o mesmo *kit* de extração, o protocolo 2 foi substituído pelo protocolo 1, uma vez que no protocolo 2 há um passo de precipitação do SDS em gelo durante 5 min (manual de Nucleospin Plant II). Sabendo-se que o ADN tem tendência a complexar com a sílica a baixas temperaturas, optou-se pela utilização do protocolo 1.



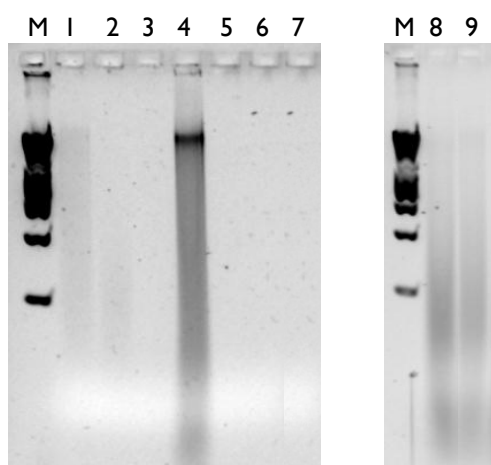
**Tabela 14** Valores das purezas e concentrações do ADN extraído pelo método NucleoSpin Plant II (protocolo I) das amostras sólidas de suplementos alimentares pré-tratadas com tampão fosfato 1M (pH8; 15% de etanol).

Amostras	Pureza ( $A_{260}/A_{280}$ )	Concentração (ng/ $\mu$ L)
SA24	2,0	10,5
SA27	-	NQ
SA30	-	NQ
SA37	2,0	106,4
SA40	2,2	86,6
SA41	-	NQ
SA42	-	NQ
SA43	2,1	59,4
SA44	-	NQ

NQ- Não quantificável

Deste modo, esperava-se um aumento do rendimento de extração com a aplicação do tampão fosfato, mas isso não se verificou. O comportamento da extração foi muito semelhante às amostras que não sofreram pré-tratamento. Os extratos que anteriormente não apresentavam ADN quantificável continuam a estar fora do limite de quantificação e, desta vez, a amostra SA27 também foi incluída neste grupo.

A Figura 17 apresenta a avaliação da integridade do ADN obtido a partir das amostras sem tratamento com tampão fosfato. Os extratos não revelam bandas de elevada massa molecular, à exceção da amostra SA37 (Linha 4). O ADN das amostras em que a extração envolveu o uso de tampão fosfato, em termos de integridade, exibiu as mesmas características do ensaio anterior.



**Figura 17** Eletroforese em gel de agarose do ADN genómico extraído pelo método NucleoSpin Plant II das amostras sólidas de suplementos alimentares. Linha 1 – SA24; linha 2 – SA27; linha 3 – SA30; linha 4 – SA37, Linha 5 – SA41; linha 6 – SA42; linha 7 – SA44; linha 8 – SA40; linha 9 – SA43. M – Marcador HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

### 5.3.2 Amostras líquidas

Após o pré-tratamento descrito na secção 4.1, o ADN das amostras líquidas de suplementos alimentares foi extraído usando o *kit* comercial NucleoSpin Plant II protocolo 2. Os resultados da extração mostraram que não foi possível obter ADN quantificável para todas as amostras, exceto no caso da SA8 cujo rendimento foi de 7 ng/μL e pureza de 1,6. A avaliação da integridade do ADN extraído confirmou os resultados obtidos por espectrofotometria dado não se observar qualquer banda ou arrastamento. Estes resultados estarão potencialmente correlacionados com a matriz líquida, dado que as técnicas de fabrico destes produtos podem levar à fragmentação e degradação parcial/total do ADN.

## 5.4 Capacidade de amplificação dos extratos de plantas e sementes

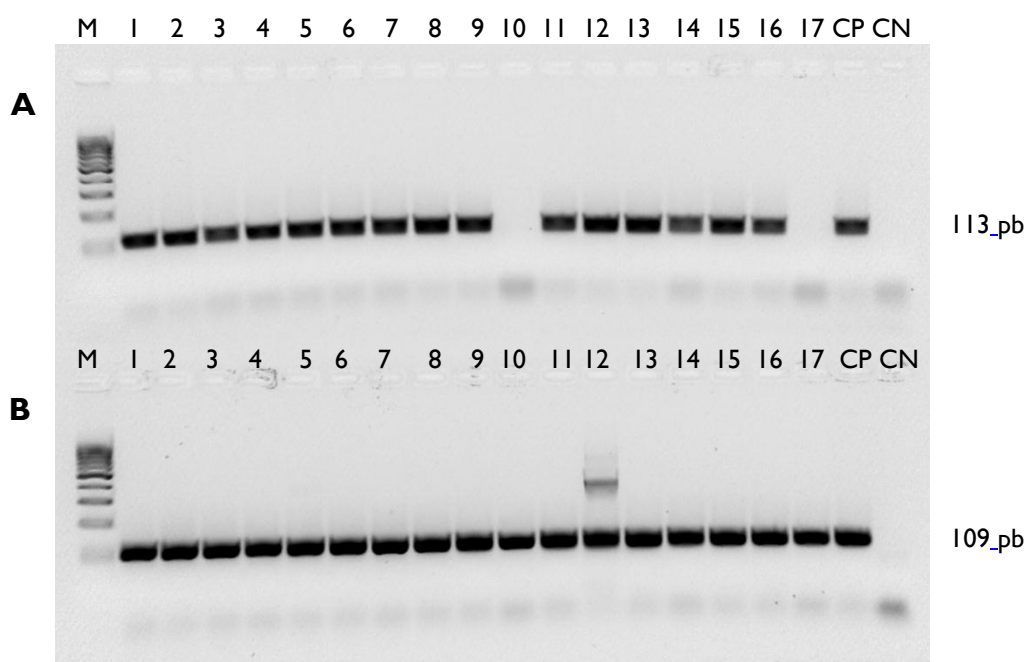
A capacidade de amplificação dos extratos das plantas medicinais e sementes foi testada com diferentes *primers*. Inicialmente utilizaram-se dois conjuntos de *primers* universais, I8SRG-F/I8SRG-R e EG-F/EG-R, específicos para regiões de ADN universais (18S rRNA) de forma a amplificar todas as espécies eucariotas. No sentido de particularizar a análise só para a deteção de espécies vegetais, dois genes plastidiais (*rbcL* e *matK*) foram usados para desenhar novos conjuntos de *primers*, o *rbcL-F1/rbcL-R1*, o *rbcL-F2/rbcL-R2* e o *matK-F2/matK-R2*. O desenvolvimento e uso de diferentes conjuntos de *primers* teve como objetivo obter uma gama alargada de marcadores que permitissem avaliar os extratos de ADN de suplementos alimentares.

### 5.4.1 *Primers* I8SRG-F/I8SRG-R e EG-F/EG-R

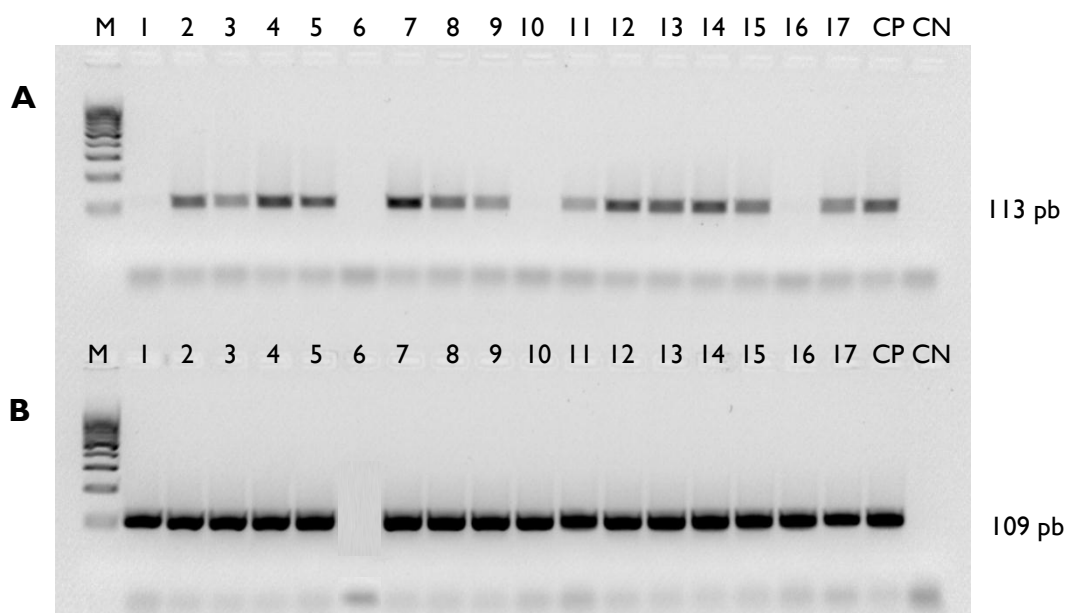
Todas as plantas e sementes extraídas pelos métodos CTAB 1% PVP e NucleoSpin Plant II, respetivamente, foram submetidas a uma PCR qualitativa com os oligonucleótidos I8SRG-F/I8SRG-R e EG-F/EG-R de modo a confirmar a sua capacidade de amplificação. As Figuras 18, 19 e 20 mostram as eletroforeses em gel de agarose dos produtos da PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das plantas e sementes, usando os *primers* I8SRG-F/I8SRG-R (A) e EG-F/EG-R (B).

Os resultados mostram que no conjunto das cinquenta e oito amostras analisadas apenas sete foram negativas para os *primers* I8SRG-F/I8SRG-R, nomeadamente o borututu (EM30), o S. Roberto (EM37), a alcachofra (EM38), a valeriana (EM43), o coentro (EM47), a alcachofra 2 (EM53) e o chá alcachofra/dente-de-leão (EM63). De modo a confirmar estes resultados, todas estas amostras foram sujeitas a nova extração e amplificação por PCR

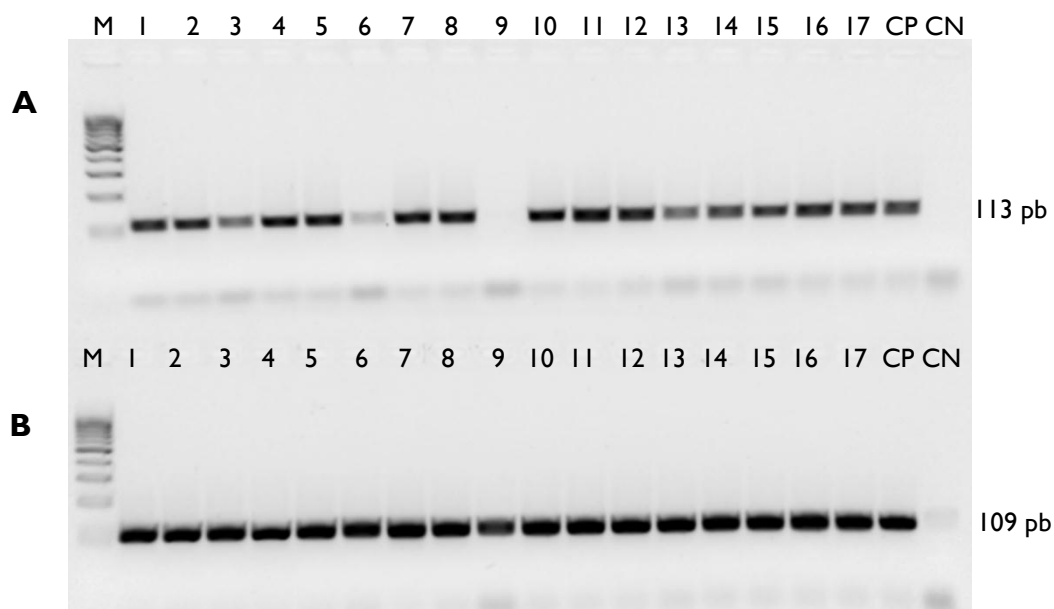
usando os mesmos *primers*. Os novos resultados confirmam os anteriores, os extratos voltaram a não amplificar, pelo que estes foram avaliados com um segundo conjunto de *primers* universais (EG-F/EG-R). Nesta análise verifica-se que todas as amostras, incluindo as que foram negativas para os *primers* 18SRG-F/18SRG-R, à exceção da valeriana (EM43), amplificaram positivamente com os *primers* EG-F/EG-R. De acordo com a bibliografia, é difícil obter ADN amplificável da valeriana devido à possível degradação de ADN resultante do excesso de calor usado durante o processo de secagem desta planta (Llongueras *et al.*, 2013). À exceção da valeriana, todos os extratos apresentaram ADN amplificável. Para este conjunto de cinquenta e oito plantas a amplificação com os *primers* EG-F/EG-R foi mais eficiente por razões que podem estar associadas às diferentes condições de tempo e temperatura, bem como as quantidades dos componentes (exemplo o  $Mg^{2+}$ ) usados na PCR ou à própria região universal onde os *primers* foram desenhados.



**Figura 18** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas medicinais e chás com os primers 18SRG-F/18SRG-R (**A**) e EG-F/EG-R (**B**). Linha 1 – Erva príncipe (EM21); linha 2 – funcho (EM2); linha 3 – dente-de-leão (EM23); linha 4 – cavalinha (EM24); linha 5 – cidreira (EM25); linha 6 – camomila (EM26); linha 7 – chá verde (EM 27); linha 8 – sálvia (EM28); linha 9 – hortelã-pimenta (EM 29); linha 10 – borututu (EM30); linha 11 – carqueja (EM31) linha 12 – malva (EM32); linha 13 - sene (EM33); linha 14 – mate verde (EM34); linha 15 – tília (EM35); linha 16 – uva-ursina (EM36); linha 17 – S. Roberto (EM37). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.



**Figura 19** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas medicinais e chás com os primers 18SRG-F/18SRG-R (**A**) e EG-F/EG-R (**B**). Linha 1 – alcachofra (EM38); linha 2 – passiflora (EM39); linha 3 – boldo (EM40); linha 4 – verbena (EM41); linha 5 – espinheiro alvar (EM42); linha 6 – valeriana (EM43); linha 7 – cardo mariano (EM44); linha 8 – orégãos (EM45); linha 9 – manjeriço (EM46); linha 10 – coentros (EM47); linha 11 – açafrão das índias (EM48); linha 12 – pés de cereja (EM49); linha 13 – lúcia-lima (EM50); linha 14 – eucalipto (EM51); linha 15 – gingko biloba (EM52); linha 16 – alcachofra 2 (EM53); linha 17 – castanheiro-da-índia (EM54). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

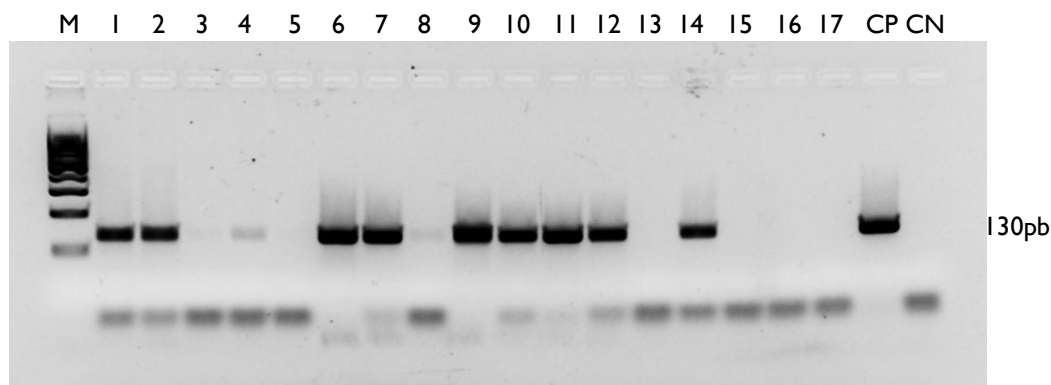


**Figura 20** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas medicinais e chás com os primers 18SRG-F/18SRG-R (**A**) e EG-F/EG-R (**B**). Linha 1 – Videira (EM55); linha 2 – alecrim (EM56); linha 3 – oliveira (EM57); linha 4 – figueira (EM58); linha 5 – camomila (EM59); linha 6 – noqueira (EM60); linha 7 – procolesterol (EM61); linha 8 – chá cardio (EM62); linha 9 – chá alcachofra e dente-de-leão (EM63); linha 10 – chá gorduras localizadas (EM64); linha 11 – malva (EM65); linha 12 – alcachofra 3 (EM66); linha 13 – chá plantas mistura (EM67); linha 14 – chá detox (EM68); linha 15 – lúcia-lima (EM52); linha 16 – *Cynara humilis* (S1); linha 17 – *Cynara cardunculus* (S2). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

#### 5.4.2 Primers rbcL-F1/rbcL-R1 e rbcL-F2/rbcL-R2

O gene que codifica a grande subunidade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo) é caracterizado por apresentar uma larga cobertura taxonômica e, por isso, tem sido muito utilizado como *DNA barcode* para a identificação e diferenciação de espécies vegetais. Desta forma, utilizou-se esta região para obter novos *primers* capazes de amplificar por PCR o maior número de espécies vegetais. Assim, os *primers* rbcL-F1/rbcL-R1 e rbcL-F2/rbcL-R2 foram desenhados sobre uma sequência do gene *rbcL* da planta *Prunus persica* (pêssego).

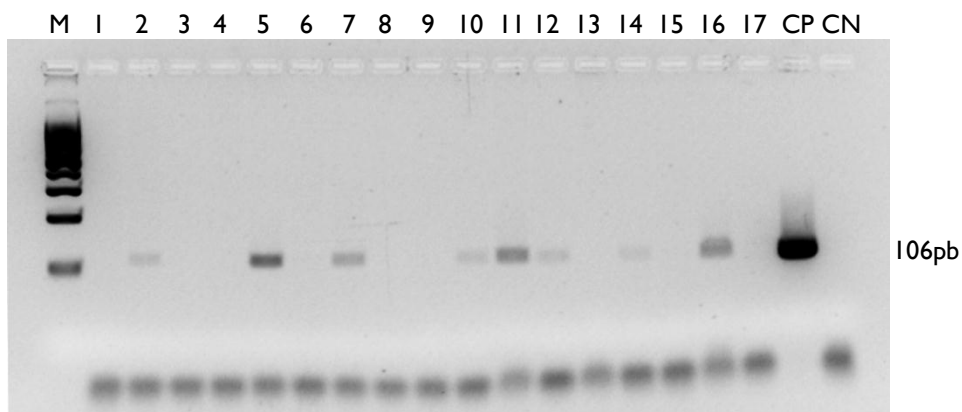
Após a otimização dos *primers* para as melhores condições de tempo e temperatura, e para as corretas quantidades das componentes de PCR, a sua universalidade foi avaliada nas amostras de plantas medicinais extraídas com o método CTAB 1%PVP. Os resultados mostram que a maioria dos extratos apresenta ADN amplificável para os *primers* rbcL-F1/rbcL-R1, excluindo o dente-de-leão (EM23), a cavalinha (EM24), a cidreira (EM25), a sálvia (EM28), a alcachofra (EM38), a valeriana (EM43), a alcachofra 2 (EM53) e o alecrim (EM556). A Figura 21 mostra alguns desses resultados onde estão incluídas a maioria das amostras negativas.



**Figura 21** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas medicinais com os primers rbcL-F1/rbcL-R1. Linha 1 – erva príncipe (EM21); linha 2 – funcho (EM22); linha 3 – dente-de-leão (EM23); linha 4 – cavalinha (EM 4); linha 5 – cidreira (EM 5); linha 6 – camomila (EM26); linha 7 – chá verde (EM27); linha 8 – sálvia (EM28); linha 9 – hortelã-pimenta (EM29); linha 10 – carqueja (EM31) linha 11 – malva (EM32); linha 12 – sene (EM33); Linha 13 – alcachofra (EM38); Linha 14 – alcachofra 3 (EM66); linha 15 – valeriana (EM43); linha 16 – alcachofra 2 (EM53); linha 17 – alecrim (EM56). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

Como se pode verificar, algumas das plantas que não amplificaram coincidem com as amostras negativas por amplificação com os *primers* 18SRG-F/18SRG-R, nomeadamente a alcachofra (EM38), a valeriana (EM43) e a alcachofra 2 (EM53).

No caso dos *primers* *rbcl-F2/ rbcl-R2*, a capacidade de amplificação foi muito menor, sendo negativa na maioria dos casos (Figura 22). Este facto pode ser devido à sequência de ADN usada não ser conservada, ou seja, não estar presente na maioria das espécies. Como a eficiência destes oligonucleótidos demonstrou ser muito reduzida estes foram excluídos do presente estudo.



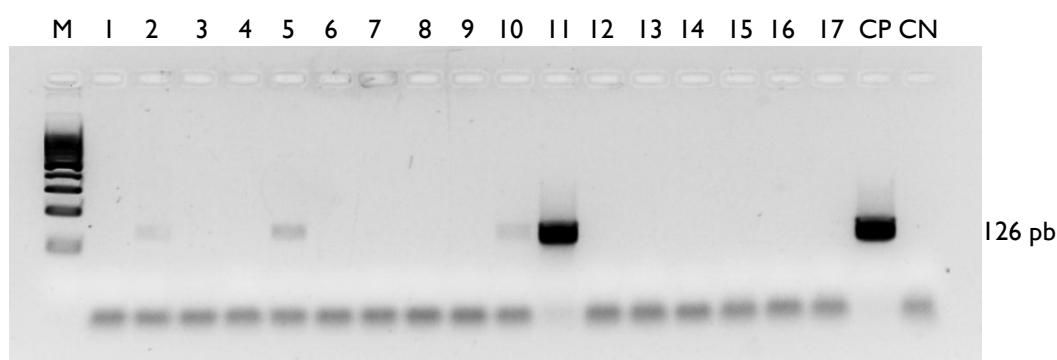
**Figura 22** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas medicinais com os *primers* *rbcl-F2/rbcl-R2*. Linha 1 – erva príncipe (EM21); linha 2 – funcho (EM22); linha 3 – dente-de-leão (EM23); linha 4 – cavalinha (EM24); linha 5 – cidreira (EM25); linha 6 – camomila (EM26); linha 7 – chá verde (EM27); linha 8 – sálvia (EM28); linha 9 – hortelã-pimenta (EM29); linha 10 – carqueja (EM31); linha 11 – malva (EM32); linha 12 – sene (EM33); linha 13 – hipericão; linha 14 – alcachofra 3 (EM66); linha 15 – valeriana (EM43); linha 16 – alcachofra 2 (EM53); linha 17 – mate verde (EM34). M – Marcador molecular 100bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

#### 5.4.3 *Primers* *matk-F2/matk-R2*

O gene cloroplastidial *matK* localiza-se no intrão *trnK* e codifica a enzima maturase K. O gene *matK* é mencionado por apresentar boa capacidade de diferenciação entre espécies, sendo muito usado na identificação de plantas medicinais (Tehen *et al.*, 2014). No presente estudo, uma pequena porção desta região foi utilizada com o objetivo de tentar identificar o maior número de plantas por PCR. Vários estudos indicam que a capacidade de deteção de uma sequência entre várias espécies aumenta com a diminuição do seu tamanho (Little, 2013). Assim, os *primers* *matk-F2/matk-R2* foram desenhados a partir do gene cloroplastidial *matK* da planta *Stephanandra chinensis*, amplificando uma sequência com 126 pb. Após otimização, avaliou-se a sua capacidade de amplificação nos extratos das plantas medicinais. À semelhança dos resultados obtidos com os *primers* *rbcl-F2/rbcl-R2*, estes oligonucleótidos também não apresentaram universalidade. Num conjunto de 17 amostras apenas uma amplificou, tal como mostra a Figura 23. Tais resultados sugerem que o conjunto

matk-F2/matk-R2 também foi desenhado sobre uma região não conservada. Assim sendo, a sua aplicação em análises futuras torna-se inadequada.

De modo a sistematizar todos os dados obtidos sobre a capacidade de amplificação dos extratos de plantas usando os *primers* 18SRG-F/18SRG-R, EG-F/EG-R e rbcL-F1/rbcL-R1 elaboraram-se as Tabela 15 e 16. A primeira refere-se apenas às sementes, e a segunda às plantas medicinais e infusões. Com estes resultados pode-se afirmar que a maioria das plantas analisadas apresentou ADN amplificável e que no conjunto de todos os *primers* utilizados, os EG-F/EG-R foram os que exibiram maior universalidade, uma vez que permitiram a amplificação do ADN de 98% das amostras.



**Figura 23** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas medicinais com os *primers* rbcL-F1/rbcL-R1. Linha 1 – erva príncipe (EM21); linha 2 – funcho (EM22); linha 3 – dente-de-leão (EM23); linha 4 – cavalinha (EM24); linha 5 – cidreira (EM25); linha 6 – camomila (EM26); linha 7 – chá verde (EM27); linha 8 – sálvia (EM28); linha 9 – hortelã-pimenta (EM29); linha 10 – carqueja (EM31) linha 11 – malva (EM32); linha 12 – sene (EM33); linha 13 – alcachofra (EM38); linha 14 – alcachofra 3 (EM66); linha 15 – valeriana (EM43); linha 16 – alcachofra 2 (EM53); linha 17 – alecrim (EM56). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

**Tabela 15** Resultados das amplificações por PCR dos extratos de ADN das amostras de sementes usando os *primers* 18SRG-F/18SRG-R, EG-F/ EG-R e rbcL-F1/rbcL-R1.

Código	Amostra	Primers		
		18SRG-F/18SRG-R	EG-F/EG-R	rbcL-F1/rbcL-R1
S1	<i>Cynara humilis</i>	+	+	+
S2	<i>Cynara cardunculus</i>	+	+	+
S3	<i>Cirsium acaule</i>	+	NT	+
S4	<i>Cirsium neomexicanum</i>	+	NT	NT
S5	<i>Cirsium quercetorum</i>	+	NT	NT
S6	<i>Cirsium scariosum</i>	+	NT	NT
S7	<i>Cirsium undulatum</i>	+	NT	NT
S8	<i>Jurinea consanguinea</i>	+	NT	NT
S9	<i>Cynara syriaca</i>	+	NT	+
CyS1	<i>Cynara scolymus</i>	+	NT	+
CyS2	<i>Cynara scolymus</i>	+	NT	+
SyM	<i>Silybum marianum</i>	+	NT	+

**Tabela 16** Resultados das ampliações por PCR dos extratos de ADN das amostras de plantas medicinais e chás usando os *primers* 18SRG-F/18SRG-R, EG-F/EG-R e rbcL-F1/rbcL-R1.

Código	Amostra	Primers		
		18SRG-F/18SRG-R	EG-F/EG-R	rbcL-F1/rbcL-R1
EM 21	Erva príncipe	+	+	+
EM 22	Funcho	+	+	+
EM 23	Dente-de-leão	+	+	-
EM 24	Cavalinha	+	+	-
EM 25	Cidreira	+	+	-
EM 26	Camomila	+	+	+
EM 27	Chá verde	+	+	+
EM 28	Sálvia	+	+	-
EM 29	Hortelã-pimenta	+	+	+
EM 30	Borututu	-	+	
EM 31	Carqueja	+	+	+
EM 32	Malvas	+	+	+
EM 33	Sene	+	+	+
EM 34	Malte verde	+	+	+
EM 35	Tília	+	+	+
EM 36	Uva-ursina	+	+	+
EM 37	S. Roberto	-	+	+ (fraco)
EM 38	Alcachofra	-	+	-
EM 39	Passiflora	+	+	+
EM 40	Boldo	+	+	+
EM 41	Verbena/Gervão	+	+	+
EM 42	Espinheiro alvar	+	+	+
EM 43	Valeriana	-	-	-
EM 44	Cardo mariano	+	+	+
EM 45	Orégãos	+	+	+
EM 46	Manjeriço	+	+	+
EM 47	Coentros	-	+	+
EM 48	Açafrão das Índias	+	+	+
EM 49	Pés de cereja	+	+	+
EM 50	Lúcia lima	+	+	+
EM 51	Eucalipto	+	+	+
EM 52	Gingko biloba	+	+	+
EM 53	Alcachofra 2	-	+	-
EM 54	Castanheiro-da-índia	+	+	+
EM 55	Videira	+	+	+
EM 56	Alecrim	+	+	-
EM 57	Oliveira	+	+	+
EM 58	Figueira	+	+	+
EM 59	Camomila	+	+	+
EM 60	Nogueira	+	+	+
EM 61	Chá Procolesterol	+	+	NT
EM 62	Chá cardio	+	+	NT
EM 63	Chá alcachofra e dente de leão	-	+	NT
EM 64	Chá Gorduras localizadas	+	+	NT
EM 65	Malva	+	+	+
EM 66	Alcachofra 3	+	+	+
EM 67	Chá Plantas mistura	+	+	+
EM 68	Chá Detox	+	+	+
EM 69	Lúcia-lima	+	+	+

+ Amostras positivas; - Amostras negativas; **NT** Não testado

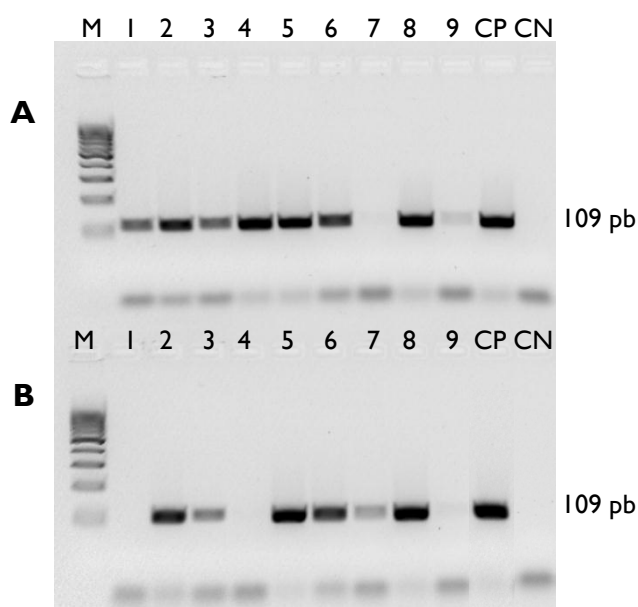


## 5.5 Capacidade de amplificação dos extratos de suplementos alimentares à base de plantas

### 5.5.1 Primers EG-F/EG-R

O conjunto EG-F1/EG-R1 revelou-se o melhor marcador molecular para a identificação de diversas espécies vegetais. Como a maioria das amostras de suplementos alimentares em estudo apresentava na sua constituição várias combinações de plantas, estes primers foram os escolhidos para analisar a capacidade de amplificação destas amostras.

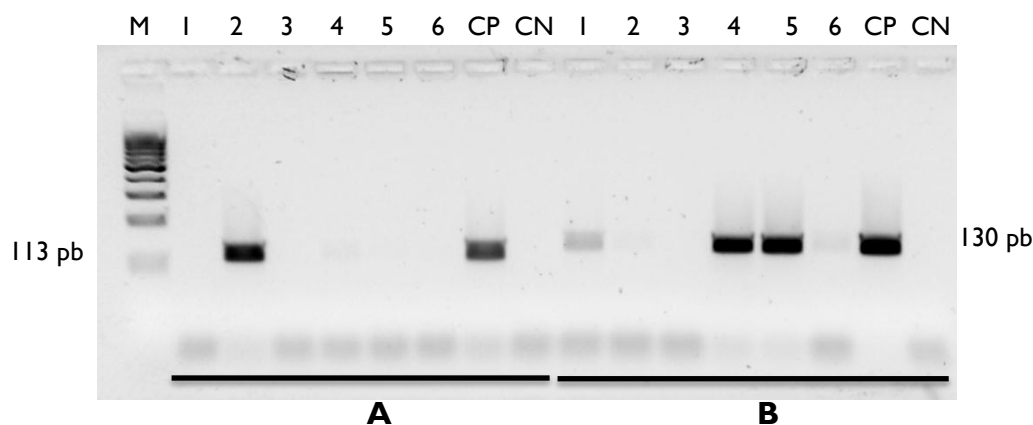
Inicialmente testou-se a capacidade de amplificação do ADN das amostras sólidas de suplementos alimentares com e sem pré-tratamento com tampão fosfato 1 M (pH 8; 15% de etanol). A Figura 24 mostra a eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos, relativos às amostras com pré-tratamento (Figura 24A) e sem pré-tratamento (Figura 24B). Nestes resultados, verifica-se que apesar dos extratos terem apresentado baixa integridade, à exceção de SA37, e algumas amostras não apresentarem ADN quantificável, conseguiu-se obter ADN amplificável da maioria dos extratos. Comparando os resultados das amostras com e sem pré-tratamento, observa-se uma ligeira melhoria na capacidade de amplificação das primeiras. As amostras SA24 (linha 1), SA37 (linha 4) e SA44 (linha 9)



**Figura 24** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras sólidas de suplementos alimentares com os primers EG-F/EG-R. **A** – Amostras sólidas que foram sujeitas ao pré-tratamento com tampão fosfato 1 M (pH 8; 15% de etanol); **B** – Amostras sólidas sem pré-tratamento. Linha 1 – SA24; linha 2 – SA27; linha 3 – SA30; linha 4 – SA37; linha 5 – SA40; linha 6 – SA41; linha 7 – SA42; linha 8 – SA43; linha 9 – SA44. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP- Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

apenas amplificaram quando pré-tratadas, apesar da última não apresentar uma banda muito expressiva. Embora o tampão fosfato tenha sido usado com o objetivo de melhorar o rendimento de extração, constatou-se que este influencia positivamente a capacidade de amplificação do ADN. De alguma forma permite que o ADN extraído seja mais limpo e livre de inibidores da PCR. No entanto, o oposto também se verificou, a amostra SA42 (linha 7) apenas amplificou positivamente quando extraída sem o tampão fosfato. As restantes amostras foram positivas para ambas as condições. De uma forma geral, foi possível obter ADN amplificável da maioria das amostras sólidas de suplementos alimentares usando os *primers* EG-F/EG-R.

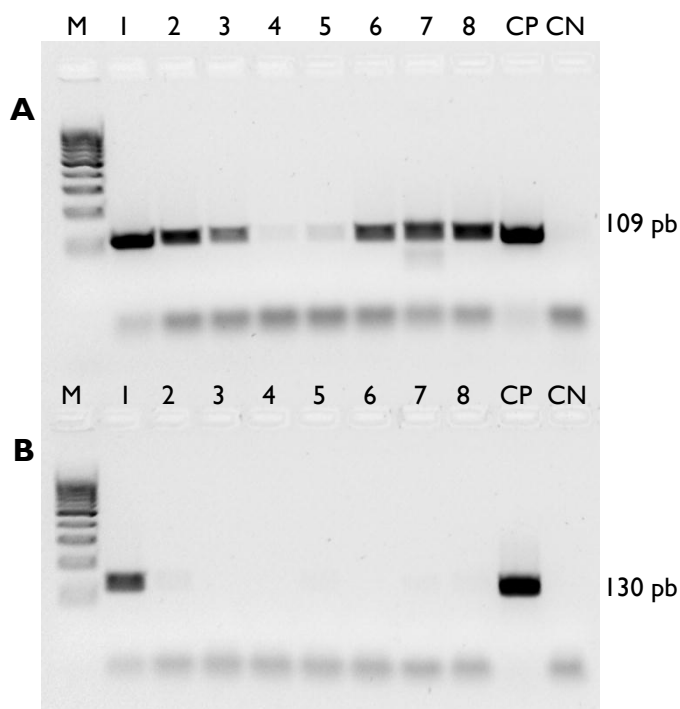
A amplificabilidade dos extratos das amostras sólidas sem pré-tratamento também foi avaliada usando os *primers* 18SRG-F/18SRG-R e *rbcl*-FI/*rbcl*-RI. Relativamente aos primeiros, a capacidade de amplificação foi muito baixa, apenas o ADN das amostras SA27, SA40 e SA43 amplificou positivamente. No caso dos segundos *primers*, obteve-se um maior número de amostras positivas, nomeadamente SA24, SA37, SA40, SA41 e SA43. A Figura 25 mostra alguns desses resultados, onde (A) corresponde aos resultados com os *primers* 18SRG-F/18SRG-R e (B) com os *primers* *rbcl*-RI/*rbcl*-RI.



**Figura 25** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras sólidas, sem pré-tratamento, de suplementos alimentares com os *primers* 18SRG-F/18SRG-R (A) e *rbcl*-RI/*rbcl*-FI (B). Linha 1 – SA24; linha 2 – SA27; linha 3 – SA30; linha 4 – SA37; linha 5 – SA41; linha 6 – SA42. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

Após a análise das amostras sólidas prosseguiu-se para as amostras líquidas. Aqui a capacidade de amplificação do ADN também foi avaliada utilizando os *primers* EG-F/EG-R e ainda os *primers* *rbcl*-FI/*rbcl*-RI. Os resultados, apresentados na Figura 26, mostraram uma clara diferença entre as duas avaliações. Apesar de não ter sido possível quantificar o ADN

dos extratos das amostras líquidas, conseguiu-se obter ADN amplificável de quase todas as amostras, usando os *primers* EG-F/EG-R. À exceção das amostras SA15 (linha 4) e SA29 (linha 5), que por apresentarem bandas com intensidade muito baixa não foram consideradas como amostras positivas. Em relação ao *primers* rbcL-F1/rbcL-R1, apenas o ADN da amostra SA8 amplificou. Provavelmente por ser a amostra onde o ADN está menos fragmentado e a região onde emparelha os *primers* ainda estar intacta.



**Figura 26** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras líquidas de suplementos alimentares com os *primers* EG-F/EG-R (**A**) e rbcL-F1/rbcL-R1 (**B**). Linha 1 – SA8; linha 2 – SA12; linha 3 – SA14; linha 4 – SA15; linha 5 – SA29; linha 6 – SA32; linha 7 – SA34; linha 8 – SA39. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

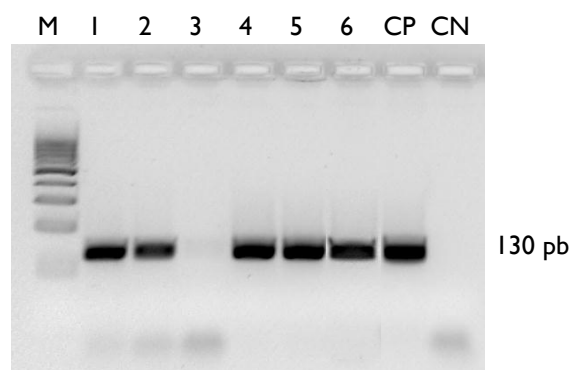
Com a avaliação da capacidade de amplificação do ADN das amostras de suplementos alimentares (sólidas e líquidas) percebeu-se que a escolha dos *primers* é um passo crítico, uma vez que é muito fácil obter-se um resultado falso-negativo. Assim, este tipo de análise deve envolver a utilização de um conjunto alargado de marcadores moleculares, de modo a assegurar um resultado de elevada fiabilidade. Dos três conjuntos de *primers* usados neste estudo, os EG-F/EG-R foram os que apresentaram melhor desempenho, sendo considerados os mais adequados para avaliar a presença de ADN amplificável em suplementos alimentares.

## 5.6 *Cynara scolymus*

### 5.6.1 PCR qualitativa

Uma vez confirmada a capacidade de amplificação de todas as amostras de suplementos alimentares, procedeu-se à deteção específica da alcachofra nestas amostras. Assim, com base nas sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank desenharam-se os *primers* CyC-F1/CyC-R1 num microsatélite do clone CELMS-57 com o número de acesso EU744973.1.

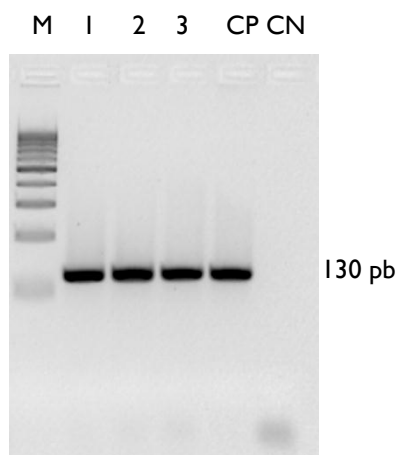
Após a otimização da PCR com os referidos *primers*, utilizando para tal a *C. scolymus* fornecida pelo Jardim Botânico de Coimbra como referência, testou-se a reatividade cruzada com espécies de plantas na forma de folhas ou sementes. Apesar dos *primers* terem sido desenhados com alvo na espécie *C. scolymus*, diferentes espécies do género *Cynara*, nomeadamente a *C. humilis*, a *C. cardunculus* e *C. syriaca*, também amplificaram positivamente (Figura 27). Nas restantes espécies de plantas medicinais não se observou qualquer amplificação, à exceção dos chás que indicavam a presença de alcachofra na sua constituição. Estes resultados sugerem que os *primers* CyC-F1/CyC-R1 são específicos para o género *Cynara*, não permitindo tirar conclusões sobre a presença da alcachofra nas amostras de suplementos a analisar.



**Figura 27** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de algumas amostras de plantas e sementes. Linha 1 – chá planta mistura (EM67); linha 2 – chá detox (EM69); linha 3 – lúcia-lima; linha 4 – S1 (*Cynara humilis*); linha 5 – S2 (*Cynara cardunculus*); linha 6 – S9 (*Cynara syriaca*). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

Para solucionar este problema foram desenhados novos *primers*, os CyS-F1/CyS-R1, também sobre uma sequência de microsatélite (*clone CLIB3*) com o número de acesso AF527029.1. Após a sua otimização, a especificidade dos *primers* foi testada com as

diferentes espécies de *Cynara*. A Figura 28 mostra que todas as espécies do género *Cynara* também amplificaram positivamente com os novos *primers*, pelo que não foram mais usados neste estudo. Até à data a maioria dos estudos genéticos com a *C. scolymus* envolveu a pesquisa de microssatélites, não havendo reportado na literatura qualquer outro tipo de marcador usado na identificação desta espécie em alimentos ou outros produtos.



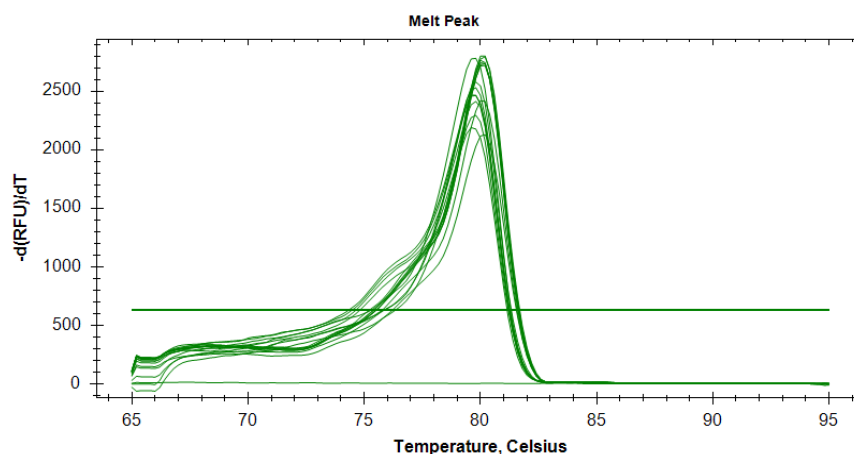
**Figura 28** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de algumas amostras de sementes usando os *primers* CyS-FI/CyS-RI. Linha 1 – S1 (*C. humilis*); linha 2 – S2 (*C. cardunculus*); linha 3 – S9 (*C. syriaca*). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

### 5.6.2 Identificação de *Cynara* spp. nos suplementos alimentares

Embora não seja possível diferenciar por PCR qualitativa a *C. scolymus* das outras espécies de *Cynara* spp. usando os *primers* CyC-FI/CyC-RI, estes foram utilizados na mesma para avaliar a presença do género nas amostras de suplementos alimentares. A Figura 29A mostra os resultados obtidos das oito amostras sólidas de suplementos alimentares rotuladas com a presença de *C. scolymus* (linhas 1-8), sendo que apenas três (SA37, SA40 e SA43) amplificaram positivamente. A amostra da linha 9 (SA44) não indicava a presença de alcachofra no rótulo. Os resultados negativos nas amostras SA24 (linha 1), SA27 (linha 2), SA30 (linha 3), SA41 (linha 6) e SA42 (linha 7) podem justificar-se pela ausência de *C. scolymus* (ou espécies próximas), resultando num possível caso de adulteração, ou pela reduzida quantidade de ADN desta planta, não sendo possível a sua amplificação por PCR. As amostras positivas indicavam a presença de maiores quantidades de *C. scolymus* na lista de ingredientes, à exceção da amostra SA24 que também referia uma adição elevada desta planta, mas na qual não se verificou amplificação.

No caso das amostras líquidas (Figura 29B), apenas a SA8 amplificou para *Cynara* spp. As baixas concentrações de ADN nos extratos líquidos serão a causa mais provável para a ausência de amplificação.





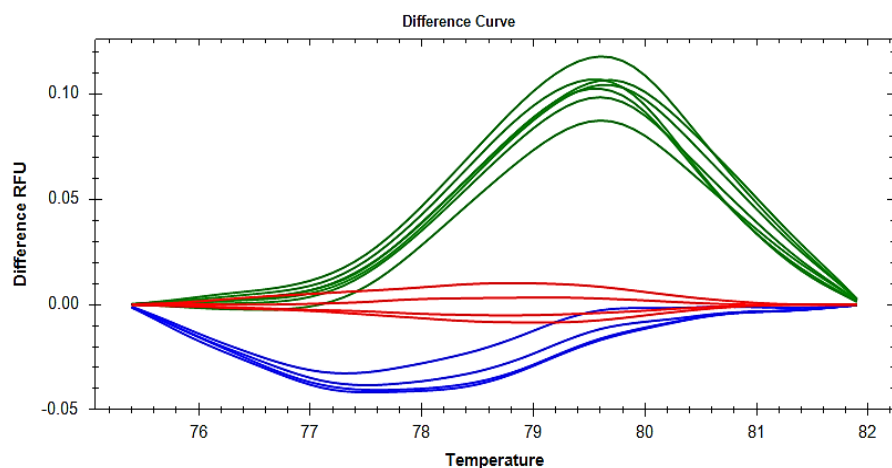
**Figura 30** Curva de desnaturação obtida pela amplificação das amostras do género *Cynara* por PCR em tempo real com o corante EvaGreen e com os primers CyC-FI/CyC-RI.

#### 5.6.4 Análise por HRM

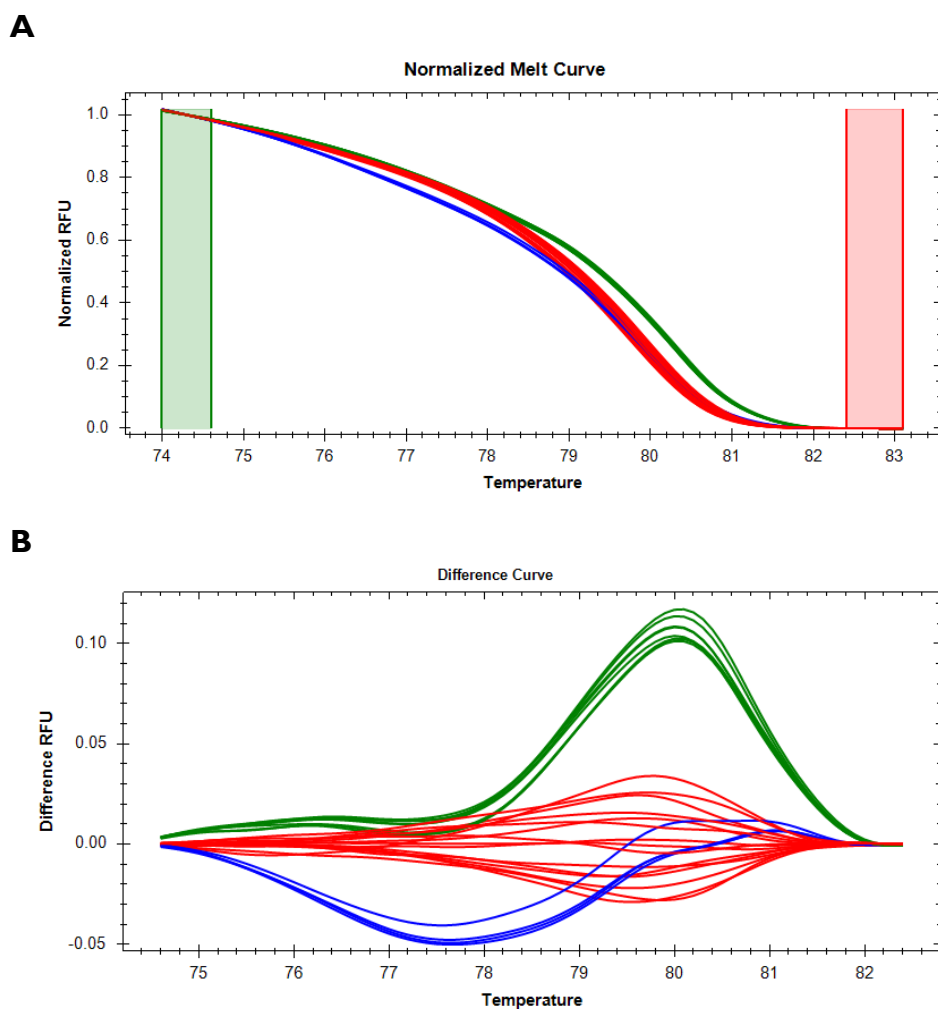
Com os recentes avanços dos equipamentos de PCR em tempo real e com o aparecimento de novos corantes de fluorescência mais eficientes, como o EvaGreen, a nova abordagem por HRM tem sido recentemente aplicada à diferenciação de espécies. Esta análise mede a taxa de dissociação da cadeia dupla de ADN em cadeia simples através de pequenos incrementos de temperatura, gerando perfis de curvas de desnaturação capazes de diferenciar produtos de PCR com base em diferenças mínimas na composição e/ou tamanho dos ácidos nucleicos. Em teoria, uma simples substituição nucleotídica (ex. adenina por guanina) pode ser suficiente para discriminar dois fragmentos com tamanho e composição semelhantes (Druml e Cichna-Markl, 2014; Reed, Kent e Wittwer, 2007).

Neste sentido utilizou-se esta técnica, com o objetivo de permitir a potencial diferenciação das espécies do género *Cynara*. Os resultados da Figura 31 mostram que com esta análise foi possível diferenciar as espécies de *Cynara* em estudo e inclui-las em 3 grupos distintos, com um elevado grau de confiança (>99.4%). A *C. scolymus* (espécie alvo) foi incluída no *cluster* 1 (vermelho), a *C. humilis* e a *C. cardunculus* no grupo 2 (verde) e a *C. syriaca* no grupo 3 (azul).

Dado que a análise por HRM permitiu a diferenciação das espécies de *Cynara* spp., procedeu-se à aplicação da metodologia desenvolvida na análise das três amostras sólidas de suplementos alimentares positivas para *Cynara* spp. Neste ensaio, as espécies foram diferenciadas e incluídas nos mesmos *clusters*, à semelhança do anterior. Os suplementos alimentares foram incluídos no *cluster* de referência (Figura 32), ou seja, no mesmo grupo da *C. scolymus* com elevado grau de confiança (>98,8%), confirmando assim a presença desta espécie nas referidas amostras.



**Figura 31** Gráfico da curva de diferença por análise HRM, obtido após amplificação das amostras do género *Cynara* por PCR em tempo real com o corante EvaGreen e com os primers CyC-F1/CyC-R1. Cluster vermelho – *Cynara scolymus*; Cluster verde – *Cynara humilis* e *Cynara cardunculus*; Cluster azul – *Cynara syriaca*.

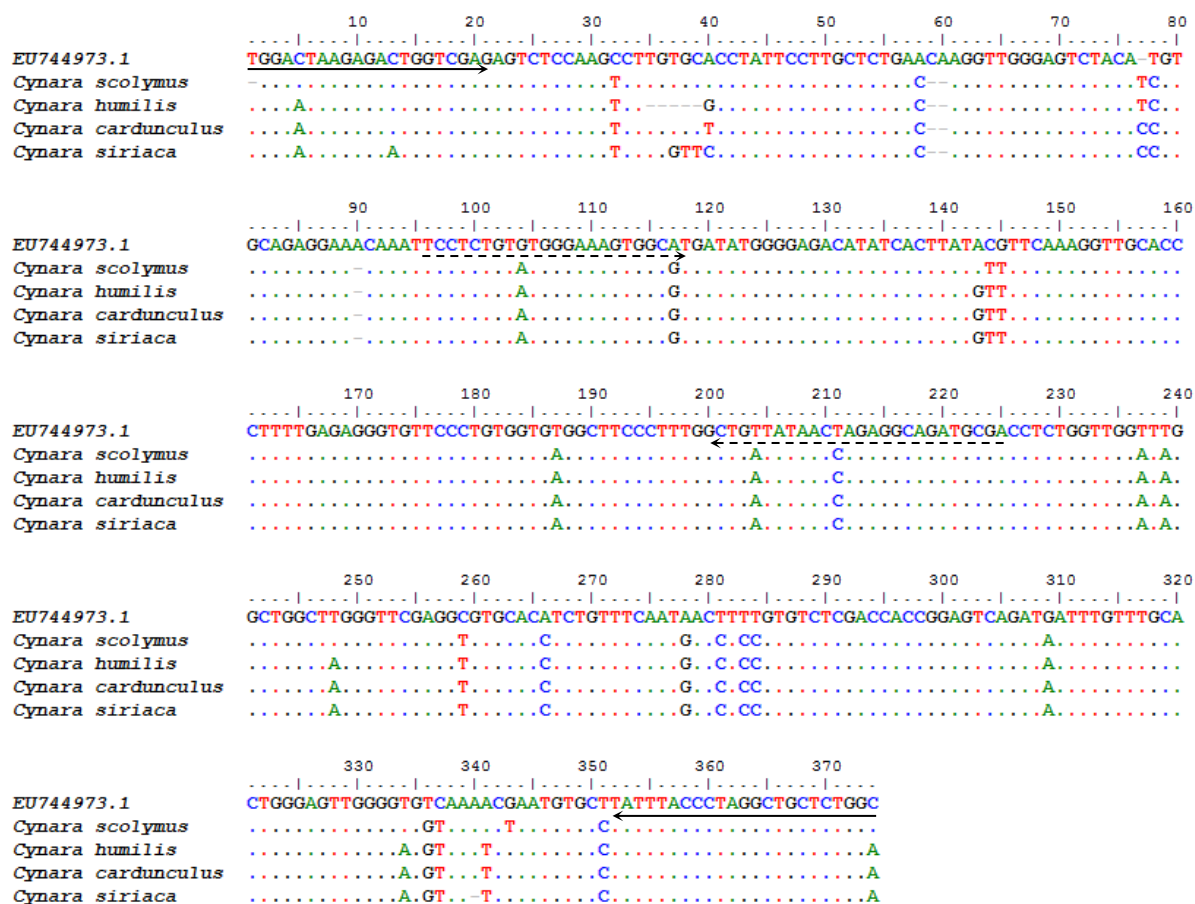


**Figura 32** Curvas de desnaturação normalizadas (A) e curvas de diferença por análise HRM (B), obtidas após amplificação das amostras do género *Cynara* e das três amostras sólidas de suplementos alimentares por PCR em tempo real com o corante EvaGreen e com os primers CyC-F1/CyC-R1. Cluster vermelho – *Cynara scolymus* mais as três amostras sólidas de suplementos alimentares; Cluster verde – *Cynara humilis* e *Cynara cardunculus*; Cluster azul – *Cynara syriaca*.



## 5.6.5 Sequenciação

Para confirmar os resultados obtidos na PCR em tempo real com a análise por HRM com base em pequenas diferenças nas sequências das diferentes espécies *Cynara*, procedeu-se à sequenciação de produtos com 373 pb. As amostras foram amplificadas em duplicado, sendo a sequenciação feita de forma complementar no sentido 5'-3' de cada cadeia, representando um total de n=4 sequências. Os resultados apresentaram eletroferogramas com elevada resolução, permitindo a sequenciação da região alvo. O alinhamento dos produtos com a sequência alvo (GenBank: EU744973.1) encontra-se na Figura 33. Contrariamente ao esperado, a sequenciação revelou duas bases diferentes na região de emparelhamento em ambos os *primers* CyC-FI/CyC-R1, o que deveria ter impossibilitado o emparelhamento dos mesmos à sequencia alvo. Para além destas, a *C. scolymus* apresenta ainda três bases nucleotídicas diferentes em relação à sequência do GenBank (Figura 33), enquanto as restantes apresentam quatro diferenças, o que explica a discriminação da *C. scolymus* das outras espécies do mesmo género e confirma os dados obtidos por HRM.

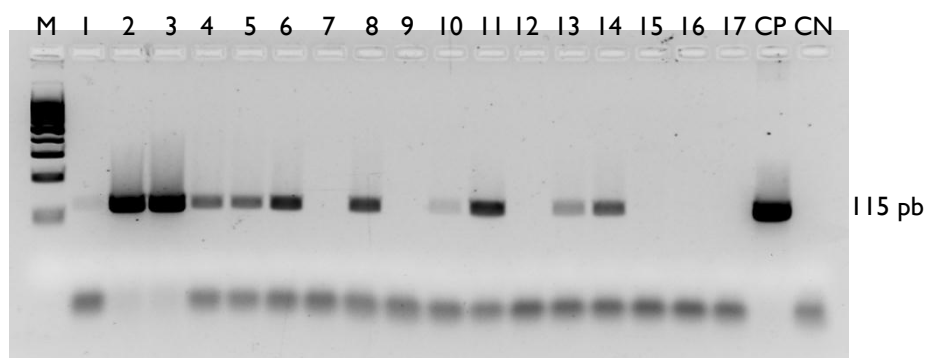


**Figura 33** Alinhamento dos produtos das espécies de *Cynara* spp. com a sequência da espécie *C. scolymus* retirada do GenBank com o número de acesso JX535388.1 obtidos por amplificação com os *primers* CyC-FS/CyC-RS.

## 5.7 *Silybum marianum*

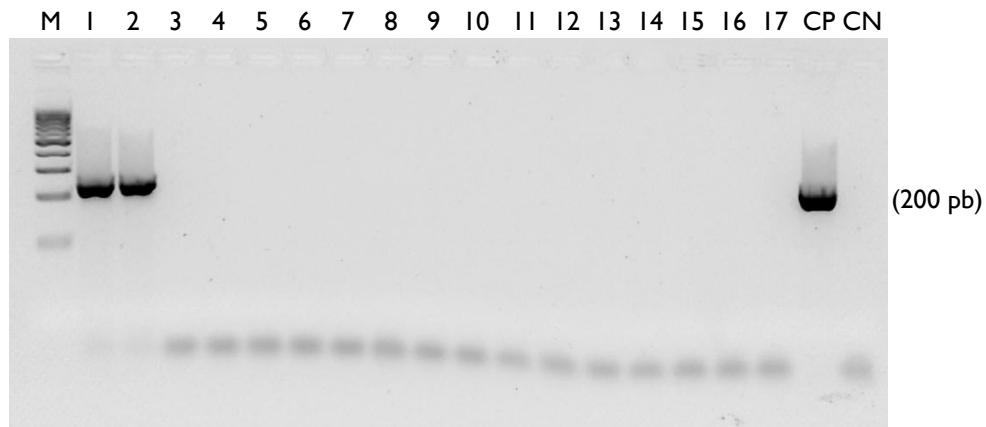
### 5.7.1 PCR qualitativa

Para a detecção de *S. marianum* nos suplementos alimentares foram desenhados os *primers* SyM-F1/SyM-R1 a partir de uma sequência de ARN mensageiro da proteína preprosilpepsin 2 (GenBank: JX535388.1) presente na planta. À semelhança da análise anterior, o ensaio de PCR foi otimizado usando uma planta de referência (SyM1) fornecida pelo Jardim Botânico de Coimbra e a sua especificidade testada por avaliação da reatividade cruzada com outras plantas medicinais. Os resultados indicam que os *primers* não foram específicos, uma vez, que amplificaram positivamente outras espécies vegetais (Figura 34). Deste modo, o uso de SyM-F1/SyM-R1 mostrou-se inadequado para avaliar a presença de *S. marianum* nos suplementos alimentares.



**Figura 34** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas com os *primers* SyM-F1/ SyM-R1. Linhas 1-3 – Cardo mariano (EM44); linha 4 – boldo (EM40); linha 5 – verbera (EM41); linha 6 – espinheiro alvar (EM42); linha 7 – valeriana (EM43); Linha 8 – oregão (EM45); linha 9 – manjerição (EM46); linha 10 – coentro (EM47); linha 11 – açafraão das Índias (EM48); linha 12 – pés de cereja (EM49); linha 13 – lúcia-lima (EM50); linha 14 – eucalipto (EM51); linha 15 – ginkgo biloba (EM52); linha 16 – alcachofra 2 (EM53); linha 17 – videira (EM55). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

Um novo conjunto de *primers* (Sil-F1/Sil-R1) foi então desenhado sobre a mesma sequência de ARN mensageiro, para solucionar o problema de falta de especificidade. Após a sua otimização e aplicação a diferentes amostras de plantas, verificou-se que estes novos oligonucleótidos eram específicos para a espécie alvo (*S. marianum*). Com a observação da Figura 35 é visível a formação de bandas apenas nas amostras de cardo mariano (linhas 1 e 2). No entanto, constatou-se que a massa molecular das bandas formadas não correspondia ao tamanho estabelecido de 126 pb, aquando do desenho dos *primers*. Mesmo assim, estes foram usados na identificação da planta nos suplementos alimentares.



**Figura 35** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de plantas com os *primers* Sil-F1/Sil-R1. Linha 1-2 – Cardo mariano (EM44); linha 3 – boldo (EM40); linha 4 – verbera (EM41); linha 5 – espinheiro alvar (EM42); linha 6 – valeriana (EM43); linha 7 – oregão (EM45); linha 8 – manjerição (EM46); linha 9 – coentro (EM47); linha 10 – açafrão das Índias (EM48); linha 11 – pés de cereja (EM49); linha 12 – lúcia-lima (EM50); linha 13 – eucalipto (EM51); linha 14 – ginkgo biloba (EM52); linha 15 – alcachofra 2 (EM53); linha 16 – castanheiro da Índia (EM54); linha 17 – videira (EM55). M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

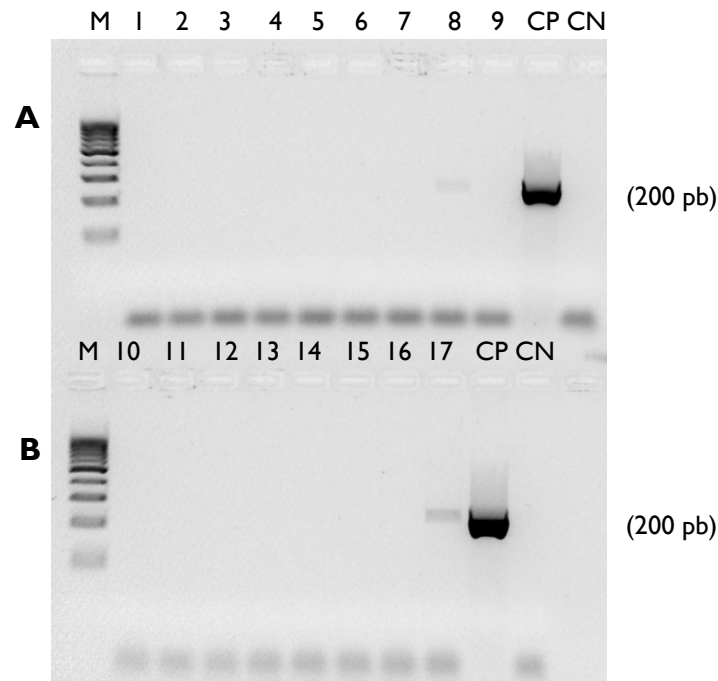
### 5.7.2 Identificação de *Silybum marianum* nos suplementos alimentares

Apesar de todas as amostras terem sido sujeitas a uma avaliação por PCR para a deteção de *S. marianum*, apenas as SA27 (linha 2), SA37 (linha 4), SA44 (linha 9), SA8 (linha 10), SA12 (linha 11) e SA34 (linha 16) indicavam a presença desta planta na sua constituição. As três primeiras faziam parte das amostras sólidas e as outras três das amostras líquidas.

A Figura 36 mostra os resultados obtidos após amplificação do ADN das amostras sólidas (Figura 36A) e líquidas (Figura 36B) de suplementos alimentares usando os *primers* Sil-F1/Sil-R1. Verifica-se que nenhuma das amostras amplificou. As duas bandas ténues que aparecem em cada um dos formatos (sólidos e líquidos) foram novamente avaliadas por PCR para confirmação dos resultados, não se verificando amplificação.

Como já referido, em amostras degradadas ou muito processadas, o sucesso da amplificação por PCR aumenta com a diminuição do tamanho das sequências a amplificar. O facto do fragmento alvo ser consideravelmente maior do que o pretendido, situando-se na zona dos 200 pb, poderá estar na origem dos resultados negativos de todas as amostras rotuladas com cardo mariano. Little (2013), ao comparar vários estudos da literatura, verificou que a mediana do tamanho do fragmento de ADN a amplificar proveniente de matrizes de plantas processadas ronda os 190 pb. Com base nesta informação, o referido autor tentou superar a fragmentação do ADN em suplementos alimentares com o desenho de *primers* com  $\leq 200$  pb para a identificação da planta *Serenoa repens* nestes produtos (Little

e Jeanson, 2013). Alternativamente, a não amplificação dos extratos nas amostras sólidas poderá estar relacionada com uma possível ausência da planta ou pela reduzida quantidade de ADN desta espécie, não sendo possível a sua amplificação por PCR. No caso das amostras líquidas, as baixas concentrações de ADN nos extratos podem justificar, mais uma vez, a ausência de amplificação do alvo *S. marianum*.

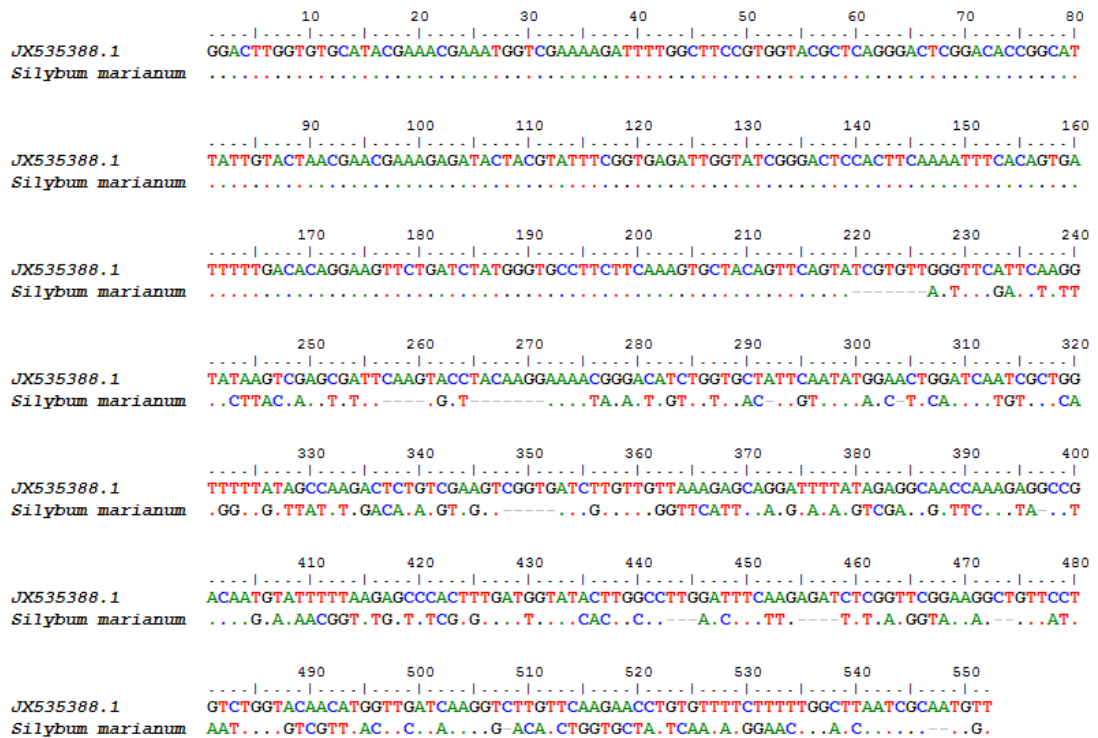


**Figura 36** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras sólidas (**A**) e líquidas (**B**) de suplementos alimentares com os *primers* Sil-F1/Sil-R1. Legenda de **A**: Linha 1 – SA24; linha 2 – SA27; linha 3 – SA30; linha 4 – SA37; linha 5 – SA40; linha 6 – SA41; linha 7 – SA42; linha 8 – SA43; linha 9 – SA44. Legenda de **B**. Linha 10 – SA8; linha 11 – SA12; linha 12- SA14; linha 13 – SA15; linha 14 – SA29; linha 15 – SA32; linha 16 – SA34; linha 17 – SA39. M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). CP – Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

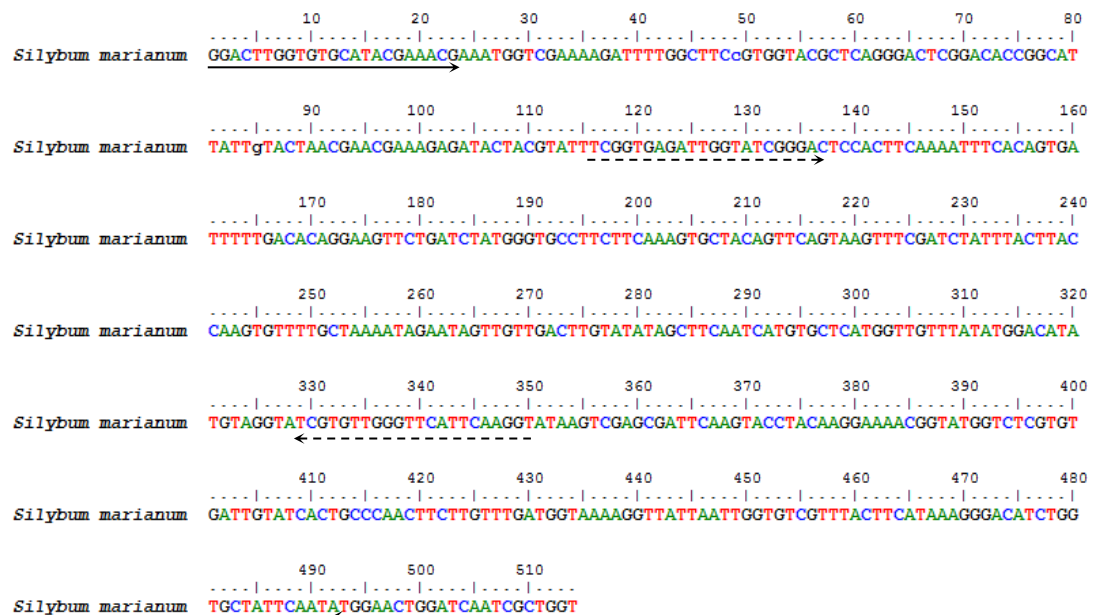
### 5.7.3 Sequenciação

De acordo com os dados da PCR qualitativa, o alvo para a espécie cardo mariano evidenciava a produção de fragmentos com tamanho superior ao esperado (126 pb). De forma a determinar o tamanho correto do produto amplificado, procedeu-se à amplificação da planta com um novo conjunto de *primers* (Sil-FS/Sil-RS) para um fragmento de 321 pb. Após análise dos resultados dos eletroferogramas, foi possível verificar que o produto de sequenciação esperado de 321 pb, foi de facto, de 514 pb (Figura 37). Dado que os *primers* foram desenhados numa sequência de *Silybum mariano* de ARN mensageiro (GenBank: JX535388.1), o aumento no tamanho do produto poderá resultar de zonas que foram

previamente editadas no momento do *splicing*. O tamanho do fragmento alvo de 126 pb foi, de igual forma, afetado pelo mesmo fenômeno pelo que resultou na produção de um fragmento de 234 pb em vez dos esperados 126 pb (Figura 38).



**Figura 37** Alinhamento do produto de PCR de *Silybum mariano* com a sequência da mesma espécie retirada do GenBank com o número de acesso JX535388.1.



**Figura 38** Sequenciação do produto da planta *Silybum marianum*. As setas tracejadas indicam o emparelhamento dos primers Sil-F1/Sil-R1 e as setas contínuas, o emparelhamento dos primers Sil-FS/Sil-RS (sequenciação).

## 6 Conclusões

Sendo o principal objetivo deste trabalho identificar as espécies *C. scolymus* e *S. marianum* em suplementos alimentares à base de plantas para a perda de peso, para tal foram desenvolvidos métodos baseados em PCR qualitativa e PCR em tempo real com análise por HRM. Através do uso de diferentes marcadores moleculares, nomeadamente duas regiões nucleares (*18S rRNA*) e dois genes cloroplastidiais (*rbcl* e *matK*), várias plantas medicinais e espécies filogeneticamente próximas das espécies em estudo foram avaliadas por PCR qualitativa. Os marcadores com melhor desempenho na identificação específica das plantas em estudo foram também usados em PCR qualitativa para analisar 17 amostras de suplementos alimentares, contendo alcachofra e/ou cardo mariano.

Os suplementos alimentares são matrizes muito complexas e com elevado processamento mecânico (ex: trituração), o que leva a uma frequente degradação do ADN. Neste trabalho, foi possível a deteção de ADN amplificável em amostras líquidas e sólidas de suplementos alimentares, utilizando os *primers* EG-F/EG-R com alvo numa região nuclear (*18S rRNA*) e a técnica de extração de ADN baseada no protocolo 2 do *kit* comercial NucleoSpin Plant II. No entanto, dada a dificuldade de extrair ADN com qualidade adequada para PCR a partir destas matrizes (suplementos alimentares), outras estratégias deverão ainda ser avançadas em trabalhos futuros.

Na identificação da alcachofra, a PCR qualitativa possibilitou a identificação do género *Cynara*, uma vez que os *primers* desenhados amplificaram outras espécies deste género. A aplicação do método em amostras suplementos alimentares permitiu ainda a deteção de *Cynara* spp. em três amostras sólidas e em uma amostra líquida de suplementos. O desenvolvimento de um sistema de PCR em tempo real acoplado a análise por HRM possibilitou a diferenciação da *C. scolymus* das restantes espécies do mesmo género, bem como a identificação inequívoca da alcachofra nas amostras de suplementos testadas, o que estava de acordo com a rotulagem.

Para a identificação de cardo mariano, foi possível desenvolver um método de PCR específico para a espécie através do desenho de novos *primers* (Sil-F1/Sil-R1). No entanto, estes amplificaram um fragmento maior (234 pb) do que o esperado (126 pb). A aplicação da técnica de PCR qualitativa às amostras de suplementos alimentares não permitiu a deteção de *S. marianum*.

Com este estudo foi possível desenvolver dois métodos de biologia molecular que permitem a autenticação a rápida e efetiva de *C. scolymus* e *S. marianum* em suplementos alimentares à base de plantas. Há que salientar, que no universo dos suplementos

alimentares há muito por explorar, ou seja, são ainda necessários avanços substanciais para o desenvolvimento de ferramentas analíticas robustas e fiáveis. A contínua otimização e desenvolvimento de novas técnicas são de elevada importância para a identificação de possíveis adulterações, garantindo assim a segurança do consumidor.

## 7 Bibliografia

- ACQUADRO, Alberto *et al.* - Development and characterization of microsatellite markers in *Cynara cardunculus* L. **Genome**. . ISSN 0831-2796. 48:2 (2005) 217–225. doi: 10.1139/g04-111.
- ACQUADRO, Alberto *et al.* - Genetic mapping and annotation of genomic microsatellites isolated from globe artichoke. **Theoretical and Applied Genetics**. . ISSN 00405752. 118:8 (2009) 1573–1587. doi: 10.1007/s00122-009-1005-6.
- AHMED, Farid E.; ONCOLOGY, Radiation; JENKINS, Leo W. - Quantitative Real-time RT-PCR : Application to Carcinogenesis. 332:(2005) 317–332.
- ALEMARDAN, Ali; KARKANIS, Anestis; SALEHI, Reza - Breeding Objectives and Selection Criteria for Milk Thistle [*Silybum marianum* ( L .) Gaertn .] Improvement. 41:2 (2013) 340–347.
- ANTHONY, Kevin *et al.* - Antioxidant and Anti-Hepatitis C Viral Activities of Commercial Milk Thistle Food Supplements. **Antioxidants**. . ISSN 2076-3921. 2:1 (2013) 23–36. doi: 10.3390/antiox2010023.
- APPLEQUIST, Wendy L.; MILLER, James S. - Selection and authentication of botanical materials for the development of analytical methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. . ISSN 16182642. 405:(2013) 4419–4428. doi: 10.1007/s00216-012-6595-1.
- ARABIC, Names - *Silybum marianum* ( L .) Gaertn . *Silybum marianum* ( L .) Part ( s ) used Collection Preparation Use Constituents Pharmacopoeias Pharmacological Action and Toxicity. 378:1791 (1968) 255–258.
- ARIF, Ibrahim A. *et al.* - A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. **International Journal of Molecular Sciences**. . ISSN 14220067. 11:5 (2010) 2079–2096. doi: 10.3390/ijms11052079.
- BANDYOPADHYAY, S.; RAYCHAUDHURI, S. S. - Development and comparison of RAPD, SCAR and AFLP markers for distinguishing some medicinally important species of the genus *Phyllanthus*. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**. . ISSN 1126-3504. 147:1 (2013) 12–20. doi: 10.1080/11263504.2011.635714.
- BHATTACHARYYA, Paromik; KUMARIA, Suman - Molecular characterization of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid, based on randomly amplified polymorphic DNA. **Plant Systematics and Evolution**. . ISSN 03782697. (2014) 201–210. doi: 10.1007/s00606-014-1065-1.
- BIOLABS - **Master Mixes Polymerases and Amplification Technologies** [Em linha] [Consult. 29 jan. 2015]. Disponível em WWW:<URL:https://www.neb.com/products/pcr-polymerases-and-amplification-technologies/master-mixes/master-mixes>.
- BORGOGNONE, Daniela *et al.* - Salinity source-induced changes in yield, mineral composition, phenolic acids and flavonoids in leaves of artichoke and cardoon grown in floating system. **Journal of the science of food and agriculture**. . ISSN 1097-0010. 94:6 (2014) 1231–7. doi: 10.1002/jsfa.6403.
- BRANDENBERG, Oliver *et al.* - **MODULE A:Introduction to Molecular Biology and Genetic Engineering**. Rome : FAO, 2011
- BRANTLEY, Scott J. *et al.* - Two Flavonolignans from Milk Thistle ( *Silybum marianum* ) Inhibit CYP2C9-Mediated Warfarin Metabolism at Clinically Achievable Concentrations. 332:3 (2010) 1081–1087. doi: 10.1124/jpet.109.161927.ularly.
- BRIGHAM, Tim; SCHRÖDER, Michelle; COCKSEGE, Wendy - Good practices for plant identification for the herbal industry. **Saskatchewan Herb and Spice Association/National Herb and Spice Coalition**. Canada. [Em linha](2004) 1–49. Disponível em WWW:<URL:http://www.saskherbspice.org/graphics/Good Practices for plant identification.pdf>.



- BROWN, T. A. - **Introduction of DNA into Living Cells**. 6. ed. Manchester : Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 9781405181730.
- BUBNER, Ben; BALDWIN, Ian T. - Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. **Plant Cell Reports**. . ISSN 07217714. 23:5 (2004) 263–271. doi: 10.1007/s00299-004-0859-y.
- CAMILO, Maria De Lourdes - PERSPECTIVA LEGAL E REGULAMENTAR DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES. Lisboa. (2009) 6–10.
- CARA, Nicolás *et al.* - Comparison of two detection systems to reveal AFLP markers in plants. 500:June (2014) 607–610.
- CBOL PLANT WORKING GROUP - A DNA barcode for land plants. **PNAS**. ISSN 1091-6490. 106:31 (2009) 12794–12797. doi: 10.1073/pnas.0905845106.
- CHEN, Shilin *et al.* - Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. **PLoS one**. . ISSN 1932-6203. 5:1 (2010) e8613. doi: 10.1371/journal.pone.0008613.
- CORCHETE, P.; FERNANDEZ-TARRAGO, J. - Involvement of phospholipase A2 in the release of silymarin to the culture medium of *Silybum marianum* cell suspensions. **Biologia Plantarum**. . ISSN 0006-3134. 58:1 (2013) 147–152. doi: 10.1007/s10535-013-0368-3.
- COSTA, Joana *et al.*- DNA extraction from plant food supplements:Influence of different pharmaceutical excipients.**Molecular and Cellular Probes**. (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2015.06.002>
- COSTA, Angélica Reolon Da *et al.* - Morphophysiological characterization in artichoke accessions aimed at selecting materials for in natura consumption. **Acta Scientiarum. Agronomy**. . ISSN 1807-8621. 34:4 (2012) 431–437. doi: 10.4025/actasciagron.v34i4.14551.
- <sup>b</sup>COSTA, Joana; MAFRA, Isabel; OLIVEIRA, M. Beatriz P. P. - High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 133:3 (2012) 1062–1069. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.01.077.
- <sup>a</sup>COSTA, Maria *et al.* - Estudos de suplementos alimentares à base de plantas no mercado português. **ASAE**. (jul. 2012). 12.
- DAILY, Sky; SPELLMAN, Kate - **Nutrition Business Journal Unveils the 2014 Global Supplement & Nutrition Industry Report** [Em linha], atual. 2014. [Consult. 5 jun. 2015]. Disponível em WWW:<URL:[http://www.bizjournals.com/prnewswire/press\\_releases/2014/02/11/CL62435](http://www.bizjournals.com/prnewswire/press_releases/2014/02/11/CL62435)>.
- DECONINCK, E. *et al.* - A strategy for the identification of plants in illegal pharmaceutical preparations and food supplements using chromatographic fingerprints. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. . ISSN 16182642. 405:2013 (2013) 2341–2352. doi: 10.1007/s00216-012-6649-4.
- DECONINCK, E. *et al.* - Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Detection of sibutramine in adulterated dietary supplements using attenuated total reflectance-infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. . ISSN 0731-7085. 100:(2014) 279–283. doi: 10.1016/j.jpba.2014.08.009.
- DIREITO, Susana O. L.; MAREES, Andries; RÖLING, Wilfred F. M. - Sensitive life detection strategies for low-biomass environments: Optimizing extraction of nucleic acids adsorbing to terrestrial and Mars analogue minerals. **FEMS Microbiology Ecology**. . ISSN 01686496. 81:1 (2012) 111–123. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01325.x.
- DORAK, M. Tevfik - **Real-time PCR** [Em linha]. New York : Taylor & Francis Group, 2006 Disponível em WWW:<URL:<http://www.gene-quantification.de/dorak-book-real-time-pcr-2006.pdf>>. ISBN 0–203–96731–3.

- DRUML, Barbara; CICHNA-MARKL, Margit - High resolution melting (HRM) analysis of DNA - Its role and potential in food analysis. **Food Chemistry**. . ISSN 18737072. 158:(2014) 245–254. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.111.
- EFSA - **Food supplements** [Em linha], atual. 2013. [Consult. 25 out. 2014]. Disponível em WWW:<URL:http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/supplements.htm>.
- EPPENDORF - **Overview of real-time quantitative PCR principles** [Em linha] [Consult. 20 fev. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.eppendorf.com/int/index.php?l=131&action=products&contentid=99&sitemap=2.5.1.5#>.
- FALCATO, Ana - **Suplementos Alimentares: Consumo Nacional Estimado de Vitaminas e Minerais em 2012**[Texto policopiado]. Lisboa :[s.n.], 2014.Tese de mestrado
- FDA - **About FDA** [Em linha], atual. 2014. [Consult. 25 out. 2014]. Disponível em WWW:<URL:http://www.fda.gov/AboutFDA/Transparency/Basics/ucm195635.htm>.
- FERNANDES, Paulo - Comportamento do consumidor face aos suplementos alimentares. **Segurança e Qualidade Alimentar**. 6:(2009) 12–13.
- GACHON, Claire; MINGAM, Annaïck; CHARRIER, Bénédicte - Real-time PCR: What relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**. . ISSN 00220957. 55:402 (2004) 1445–1454. doi: 10.1093/jxb/erh181.
- GALIMBERTI, Andrea *et al.* - DNA barcoding as a new tool for food traceability. **Food Research International**. . ISSN 09639969. 50:1 (2013) 55–63. doi: 10.1016/j.foodres.2012.09.036.
- GARCIA-ALVAREZ, Alicia *et al.* - Usage of plant food supplements across six European countries: findings from the PlantLIBRA consumer survey. **PloS one**. . ISSN 1932-6203. 9:3 (2014) e92265. doi: 10.1371/journal.pone.0092265.
- GENETIC SCIENCE LEARNING CENTER - **PCR** [Em linha], atual. 2015. [Consult. 10 mar. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>.
- GENETICS HOME REFERENCE - **Polymorphism** [Em linha], atual. 2015. [Consult. 11 jun. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=polymorphism>.
- GRIFFITHS, Anthony J. F. *et al.* - **Introduction to Genetic Analysis**. 9. ed. New York : W. H. Freeman and Company, 2008. ISBN 0716768879.
- GUIGAS, Bruno *et al.* - Cellular Physiology and Biochemistry The Flavonoid Silibinin Decreases Glucose-6- Phosphate Hydrolysis in Perfused Rat Hepatocytes by an Inhibitory Effect on Glucose-. (2007).
- HARRISON-DUNN, Annie-Rose - **A global look at supplements on the rise** [Em linha], atual. 2014. [Consult. 5 jun. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.nutraingredients.com/Suppliers2/A-global-look-at-supplements-on-the-rise>.
- HEDEGAARD, Rikke V; ROKKJÆR, Inge; SLOTH, Jens J. - Total and inorganic arsenic in dietary supplements based on herbs, other botanicals and algae--a possible contributor to inorganic arsenic exposure. **Analytical and bioanalytical chemistry**. . ISSN 1618-2650. 405:13 (2013) 4429–35. doi: 10.1007/s00216-013-6835-z.
- HELLWEGE, Elke M. *et al.* - Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected in a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs. **FEBS Letters**. . ISSN 00145793. 427:1 (1998) 25–28. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00386-X.
- HENRY, Robert J. *et al.* - Application of large-scale sequencing to marker discovery in plants. **Journal of Biosciences**. . ISSN 02505991. 37:5 (2012) 829–841. doi: 10.1007/s12038-012-9253-z.

- ITIS - **Cynara scolymus L.** [Em linha], atual. 2015. [Consult. 27 mai. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt>.
- KALIVAS, Apostolos *et al.* - DNA barcode ITS2 coupled with high resolution melting (HRM) analysis for taxonomic identification of *Sideritis* species growing in Greece. **Molecular Biology Reports**. . ISSN 15734978. 41:8 (2014) 5147–5155. doi: 10.1007/s11033-014-3381-5.
- KAZI, Tazimuddin *et al.* - The application of a DNA-based identification technique to over-the-counter herbal medicines. **Fitoterapia**. . ISSN 0367326X. 87:2013 (2013) 27–30. doi: 10.1016/j.fitote.2013.03.001.
- KHAN, Ikhlas A.; SMILLIE, Troy - Implementing a «quality by design» approach to assure the safety and integrity of botanical dietary supplements. **Journal of Natural Products**. . ISSN 01633864. 75:9 (2012) 1665–1673. doi: 10.1021/np300434j.
- KLANCNIK, Anja *et al.* - PCR in Food Analysis. Em HERNANDEZ-RODRIGUEZ, PATRICIA; GOMEZ, ARLEN PATRICIA RAMIREZ (Eds.) - **Polymerase Chain Reaction** [Em linha]. Croatia : InTech, 2012 Disponível em WWW:<URL:http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/pcr-in-food-analysis>. ISBN 978-953-51-0612-8. p. 195–220.
- KOLE, Chittaranjan; ABBOTT G., Albert - **Principles and Practices of Plant Genomics**. South Carolina : Science Publishers, 2010. ISBN 978-1-57808-683-2.
- KULKARNI, Kirti M. *et al.* - FINGERPRINTING TECHNIQUES IN HERBAL STANDARDIZATION. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**. 4:02 (2014).
- KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; MISRA, A K. - Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics** .... 2:4 (2009) 141–162.
- LACERDA, Daniela R. *et al.* - A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**. 3:2 (2002) 87–92.
- LANTERI, S. *et al.* - A first linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) based on AFLP, S-SAP, M-AFLP and microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**. . ISSN 00405752. 112:8 (2006) 1532–1542. doi: 10.1007/s00122-006-0256-8.
- LATTANZIO, Vincenzo *et al.* - Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. **Journal of Functional Foods**. . ISSN 17564646. 1:2 (2009) 131–144. doi: 10.1016/j.jff.2009.01.002.
- LEROY, Andree *et al.* - Characterization and identification of alfalfa and red clover dietary supplements using a PCR-based method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 50:18 (2002) 5063–5069. doi: 10.1021/jf0255634.
- LI, Xiwen *et al.* - Plant DNA barcoding: From gene to genome. **Biological Reviews**. . ISSN 14647931. 90:(2014) 157–166. doi: 10.1111/brv.12104.
- LINNARSSON, Sten - Recent advances in DNA sequencing methods - general principles of sample preparation. **Experimental Cell Research**. . ISSN 00144827. 316:8 (2010) 1339–1343. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.036.
- LITTLE, Damon P. - A DNA mini-barcode for land plants. **Molecular Ecology Resources**. . ISSN 1755098X. (2013) 437–446. doi: 10.1111/1755-0998.12194.
- LITTLE, Damon P.; JEANSON, Marc L. - DNA barcode authentication of saw palmetto herbal dietary supplements. **Scientific reports**. . ISSN 2045-2322. 3:(2013) 3518. doi: 10.1038/srep03518.
- LLONGUERAS, Jose P. *et al.* - Comparing DNA extraction methods for analysis of botanical materials found in anti-diabetic supplements. **Molecular Biotechnology**. . ISSN 10736085. 53:3 (2013) 249–256. doi: 10.1007/s12033-012-9520-0.

- LLORACH, Rafael *et al.* - Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 50:12 (2002) 3458–3464. doi: 10.1021/jf0200570.
- LÓPEZ, Antonio - **Semillas de cardo mariano** [Em linha] [Consult. 7 jun. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.alrfoto.com/gal26/gal-x-20.htm>.
- MACHEREY-NAGEL - **Genomic DNA from plant User manual** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\_Bio/Protocols/Genomic DNA/UM\_gDNAPlant\_NSPlantII.pdf>.
- MADESIS, Panagiotis *et al.* - Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. **Food Research International**. . ISSN 09639969. 60:(2014) 163–172. doi: 10.1016/j.foodres.2013.10.042.
- <sup>a</sup>MAFRA, Isabel; FERREIRA, Isabel M. P. L. V. O.; OLIVEIRA, M. Beatriz P. P. - Food authentication by PCR-based methods. **European Food Research and Technology**. . ISSN 1438-2377. 227:3 (2008) 649–665. doi: 10.1007/s00217-007-0782-x.
- <sup>b</sup>MAFRA, Isabel *et al.* - Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. 19:(2008) 1183–1190. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.01.004.
- MAO, Fei; LEUNG, Wai-Yee; XIN, Xing - Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. **BMC biotechnology**. . ISSN 1472-6750. 7:(2007) 76. doi: 10.1186/1472-6750-7-76.
- MARTINS, Ana Paula - Suplementos alimentares adulterados com medicamentos. Um problema de saúde pública. **ASAE**. Lisboa. (2012) 19–22.
- MATHON, Caroline *et al.* - Screening and determination of sibutramine in adulterated herbal slimming supplements by HPTLC-UV densitometry. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**. . ISSN 19440049. 31:January 2015 (2014) 15–20. doi: 10.1080/19440049.2013.861934.
- MCPHERSON, Michael; SIMON, Møller - **PCR: The Basics** [Em linha]. 2. ed. Cornwall : Taylor & Francis Group, 2006 Disponível em WWW:<URL:http://books.google.pt/books?id=NSSFjn2-SuUC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs\_ge\_summary\_r&cad=0#v=onepage&q=buffer&f=false>. ISBN 0-4153-5547-8.
- METZKER, Michael L. M. L. L. - Emerging technologies in DNA sequencing. **Genome Res**. . ISSN 1088-9051. 15:12 (2005) 1767–76. doi: 10.1101/gr.3770505.with.
- MIAH, Gous *et al.* - A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. **International Journal of Molecular Sciences**. . ISSN 16616596. 14:11 (2013) 22499–22528. doi: 10.3390/ijms141122499.
- MOGLIA, Andrea *et al.* - Stress-induced biosynthesis of dicaffeoylquinic acids in globe artichoke. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 56:18 (2008) 8641–8649. doi: 10.1021/jf801653w.
- NOVAK, Johannes; GRAUSGRUBER-GRÖGER, Sabine; LUKAS, Brigitte - DNA-based authentication of plant extracts. **Food Research International**. . ISSN 09639969. 40:3 (2007) 388–392. doi: 10.1016/j.foodres.2006.10.015.
- NORTE, Helena-Portugueses gastaram 3 milhões num trimestre para emagrecer. **Jornal de Notícias**. (29 junho 2014) 4.
- PEREIRA, Carla; BARROS, Lillian; FERREIRA, Isabel C. F. R. - Analytical Tools Used to Distinguish Chemical Profiles of Plants Widely Consumed as Infusions and Dietary Supplements: Artichoke, Milk Thistle, and Borututu. **Food Analytical Methods**. . ISSN 1936976X. 7:8 (2014) 1604–1611. doi: 10.1007/s12161-014-9795-9.

- PETROCZI, A; TAYLOR, G.; NAUGHTON, D. P. - Mission impossible? Regulatory and enforcement issues to ensure safety of dietary supplements. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**. . ISSN 1873-6351. 49:2 (2011) 393–402. doi: 10.1016/j.fct.2010.11.014.
- PFAF - **Cynara scolymus** - L. [Em linha] [Consult. 27 mai. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Cynara+scolymus>.
- <sup>a</sup>PLANTLIBRA - **Legislação Alimentar da UE** [Em linha], atual. 2010. [Consult. 24 jan. 2015] Disponível em WWW:<URL:http://www.plantlibra.eu/web/?q=pt-pt/node/120>.
- <sup>b</sup>PLANTLIBRA - **Orientações de Segurança e Compêndio da Autoridade Europeia em Segurança Alimentar – European Food Safety Authority (EFSA)** [Em linha], atual. 2010. [Consult. 24 jan. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.plantlibra.eu/web/?q=pt-pt/node/144>.
- POPPING, Bert; DIAZ-AMIGO, Carmen; HOENICKE, Katrin - **Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists**. 1. ed. New Jersey : John Wiley & Sons, 2010. ISBN 978-0-470-06809-0.
- PRADA-ARISMENDY, Jeanette; CASTELLANOS, Jaime E. - Real time PCR. Application in dengue studies. **Colombia Médica**. North America. [Em linha] 42:(2011). Disponível em WWW:<URL:http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/778/1328>.
- <sup>a</sup>PUBCHEM - **Cinarin** [Em linha], atual. 2015. [Consult. 27 mai. 2015]. Disponível em WWW:<URL:https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281769#section=Top>.
- <sup>b</sup>PUBCHEM - **Chlorogenic acid** [Em linha], atual. 2015. [Consult. 6 jun. 2015]. Disponível em WWW:<URL:https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1794427#section=Top>.
- <sup>c</sup>PUBCHEM - **4RKY41BTBF** [Em linha], atual. 2015. [Consult. 7 jun. 2015]. Disponível em WWW:<URL:https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24721673#section=Top>.
- REED, Gudrun H.; KENT, Jana O.; WITTEWER, Carl T. - High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacogenomics**. . ISSN 1462-2416. 8:6 (2007) 597–608. doi: 10.2217/14622416.8.6.597.
- RUIZ-CANO, Domingo *et al.* - Chemical and functional properties of the different by-products of artichoke (*Cynara scolymus* L.) from industrial canning processing. **Food chemistry**. . ISSN 0308-8146. 160:(2014) 134–40. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.091.
- SAHU, Sunil Kumar; THANGARAJ, Muthusamy; KATHIRESAN, Kandasamy - DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. **ISRN Molecular Biology**. . ISSN 2090-7907. 2012:2012) 1–6. doi: 10.5402/2012/205049.
- SANZINI, Elisabetta *et al.* - Quality control of plant food supplements. **Food & Function**. . ISSN 2042-6496. 2:2011) 740. doi: 10.1039/c1fo10112a.
- SEIFI, Morteza *et al.* - Overview of Real-Time PCR Principles. Em HERNANDEZ-RODRIGUEZ, PATRICIA (Ed.) - **Polymerase Chain Reaction** [Em linha]. [S.l.] : InTech, 2012 Disponível em WWW:<URL:http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/overview-of-real-time-pcrprinciples>. ISBN 978-953-51-0612-8. p. 405–442.
- SELVARAJ, Dhivya; KUMAR, Rajeev - Evaluation of DNA barcode candidates for the discrimination of the large plant family Apocynaceae. (2015) 1263–1273. doi: 10.1007/s00606-014-1149-y.
- SENOUSY, Amira S. EL *et al.* - Developmental changes in leaf phenolics composition from three artichoke cvs. (*Cynara scolymus*) as determined via UHPLC–MS and chemometrics. **Phytochemistry**. . ISSN 00319422. 108:2014) 67–76. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.09.004.

- SHERIF, Fadia EL *et al.* - Improved silymarin content in elicited multiple shoot cultures of *Silybum marianum* L. **Physiology and molecular biology of plants: an international journal of functional plant biology**. . ISSN 0971-5894. 19:1 (2013) 127–36. doi: 10.1007/s12298-012-0141-7.
- SIGMA-ALDRICH - **Quantitative PCR and Digital PCR Detection Methods** [Em linha] [Consult. 8 abr. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/quantitative-pcr-and-digital-pcr-detection-methods.html>.
- SILANO, Vittorio *et al.* - Regulations applicable to plant food supplements and related products in the European Union. **Food & function**. . ISSN 2042-650X. 2:12 (2011) 710–9. doi: 10.1039/c1fo10105f.
- SOUZA, Ana Paula *et al.* - GENOTOXICIDADE ASSOCIADA AO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Cynara scolymus* L. EM CÉLULAS HUMANAS HEPG2. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**. Canoas. (2013) 31–38.
- STARR, Forest; STARR, Kim - **Cynara scolymus. Globe Artichoke** [Em linha], atual. 2007. [Consult. 7 jun. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.biolib.cz/en/image/id55242/>.
- STRYER, Lubert; MARK BERG, Jeremy; TYMOCZKO, John L. - **Biochemistry**. 5. ed. New York : W. H. Freeman, 2002. ISBN 0716746840.
- TECHEN, N. *et al.* - Authentication of medicinal plants using molecular biology techniques to compliment conventional methods. **Current medicinal chemistry**. . ISSN 0929-8673. 11:(2004) 1391–1401.
- TECHEN, Natascha *et al.* - DNA barcoding of medicinal plant material for identification. **Current Opinion in Biotechnology**. . ISSN 09581669. 25:(2014) 103–110. doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.010.
- TEIXEIRA, Gesiane *et al.* - Plantas medicinais, fitoterápicos e/ou nutracêuticos utilizados no controle da obesidade. (2014) 27–42.
- TERPE, Kay - Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**. . ISSN 01757598. 97:24 (2013) 10243–10254. doi: 10.1007/s00253-013-5290-2.
- THEODOSIOU, Eleni *et al.* - Bioavailability of silymarin flavonolignans: drug formulations and biotransformation. **Phytochemistry Reviews**. . ISSN 1568-7767. 13:1 (2013) 1–18. doi: 10.1007/s11101-013-9285-5.
- UNI, Nanyang Technological - Amplified Fragment Length Polymorphism ( AFLP ) Provides Molecular Markers for the Identification of *Caladium bicolor* Cultivars. (1999) 155–161.
- UNIÃO EUROPEIA - Diretiva 2002/46/CE DO Conselho, de 10 de Junho de 2002 relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes aos suplementos alimentares. Jornal Oficial L 183, 12 julho.
- VACLAVIK, Lukas; KRYNITSKY, Alexander J.; RADER, Jeanne I. - Targeted analysis of multiple pharmaceuticals, plant toxins and other secondary metabolites in herbal dietary supplements by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbital ion trap mass spectrometry. **Analytica chimica acta**. . ISSN 1873-4324. 810:(2014) 45–60. doi: 10.1016/j.aca.2013.12.006.
- VIETINA, Michelangelo; AGRIMONTI, Caterina; MARMIROLI, Nelson - Detection of plant oil DNA using high resolution melting (HRM) post PCR analysis: A tool for disclosure of olive oil adulteration. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 141:4 (2013) 3820–3826. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.075.
- WALKER, Ann F.; MIDDLETON, Richard W.; PETROWICZ, Otto - Artichoke leaf extract reduces symptoms of irritable bowel syndrome in a post-marketing surveillance study. **Phytotherapy Research**. . ISSN 0951418X. 15:1 (2001) 58–61. doi: 10.1002/1099-1573(200102)15:1<58::AID-PTR805>3.0.CO;2-R.

- WILHELM, Jochen; PINGOUD, Alfred - Real-Time Polymerase Chain Reaction. **ChemBioChem**. . ISSN 14394227. 4:11 (2003) 1120–1128. doi: 10.1002/cbic.200300662.
- XIN, Tianyi *et al.* - Survey of commercial Rhodiola products revealed species diversity and potential safety issues. **Scientific Reports**. . ISSN 2045-2322. 5:(2015) 8337. doi: 10.1038/srep08337.
- XU, Xianxing; YANG, Jingwen; CHENG, Yuanguo - Pharmacokinetic Study of Viral Vectors for Gene Therapy : Progress and Challenges. **Viral Gene Therapy**. . ISSN 978-953-307-539-6. (2011) 435–450. doi: 10.5772/21259.
- YUAN, Yuan *et al.* - Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers based on a full-length cDNA library of *Scutellaria baicalensis*. **Genomics**. . ISSN 08887543. 105:1 (2015) 61–67. doi: 10.1016/j.ygeno.2014.10.009.
- ZHAO, Ya E.; WU, Li Ping - RAPD-SCAR marker and genetic relationship analysis of three *Demodex* species (Acari: Demodicidae). **Parasitology Research**. . ISSN 09320113. 110:6 (2012) 2395–2402. doi: 10.1007/s00436-011-2778-5.