



**Desenvolvimento de metodologias de biologia molecular
para a deteção de *Ephedra sinica* e *Citrus aurantium* em
infusões e suplementos alimentares à base de plantas**

Dissertação do Mestrado em Controlo de Qualidade

Inês Martins Pinto de Sousa

Trabalho realizado sob orientação:

Joana Andréa Soares Amaral

Isabel Maria Sousa Gomes Mafra

Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira

Porto, julho de 2016

Agradecimentos

À Professora Doutora Joana Amaral, por me ter orientado e acompanhado ao longo deste ano e também por toda a disponibilidade e apoio constante.

À Doutora Isabel Mafra, pela oportunidade de trabalhar neste projeto e pela disponibilidade e apoio constante ao longo deste ano.

À Professora Doutora Beatriz Oliveira por ter disponibilizado todos os recursos necessários para a realização deste trabalho.

À Doutora Joana Costa, por todos os conhecimentos transmitidos, pela persistência e por toda a dedicação e empenho durante a realização deste projeto.

Ao Telmo e à Caterina, pelo apoio, boa disposição e partilha de conhecimentos diários.

À Cíntia e à Catarina, pelo apoio, por todos as conversas, conselhos e gargalhadas. E fundamentalmente pela amizade.

Aos meus pais, por serem os pilares da minha vida e por me transmitirem confiança e segurança, fazendo com que nunca desista dos meus objetivos. Um sincero obrigada por nunca me largarem a mão.

Às minhas irmãs de coração, Sara e Ana, por ao longo da minha vida nunca deixarem de acreditar em mim. E essencialmente, por toda a paciência, motivação e por todos os conselhos, conversas, gargalhadas e carinho.

Ao Daniel, por ser quem é para mim e por estar sempre ao meu lado fazendo com que os momentos mais difíceis se tornassem mais fáceis. Por todo o incentivo, ajuda e partilha de conhecimentos.

À minha amiga Mariana por me ter apoiado ao longo da minha vida académica, pelo companheirismo, apoio e amizade.

À minha amiga Daniela, que apesar de estar longe nunca deixou de me tentar apoiar e motivar ao longo deste ano.

Ao meu Noah, por ser o meu companheiro fiel em todos os momentos da minha vida.

A toda a família e amigos que se preocuparam comigo durante este meu percurso.

Resumo

Atualmente, tem-se assistido a um aumento do consumo de suplementos alimentares à base de plantas (PFS), principalmente em países desenvolvidos. Sendo estes produtos considerados alimentos e não estando sujeitos às mesmas regras aplicadas aos medicamentos, torna-se essencial desenvolver métodos eficazes que consigam detetar práticas fraudulentas. Entre estas, destaca-se a possibilidade de adulterações botânicas, as quais podem ocorrer devido a trocas fortuitas ou intencionais para obtenção de lucros superiores. Em PFS publicitados para perda de peso, torna-se importante a avaliação da presença de determinadas espécies, cuja utilização está associada à perda de peso pelos seus efeitos termogénicos, tais como a *Ephedra sinica*, cuja inclusão em PFS é atualmente proibida pela na UE e nos EUA, e a laranja-amarga (*Citrus aurantium*).

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de novas metodologias com base nas técnicas de PCR qualitativa e PCR em tempo real acoplada à análise por *High Resolution Melting* (HRM) e sua aplicação na deteção de *C. aurantium* e *E. sinica* em infusões medicinais e PFS para perda de peso. Para tal, foram utilizadas 30 plantas de referência do género *Citrus* e 22 do género *Ephedra*, obtidas em Bancos de Germoplasma e Jardins Botânicos. Foram ainda testadas 10 amostras de PFS e 6 de infusões medicinais para perda de peso. Todos os extratos de ADN foram amplificados por PCR qualitativa utilizando com *primers* universais, tendo-se obtido ampliações positivas para a maioria das plantas de referência e amostras. Posteriormente, utilizando diversas regiões genómicas, foram desenhados *primers* para a deteção específica das plantas *C. aurantium* e *E. sinica*. A avaliação da especificidade, realizada por PCR qualitativa, permitiu concluir que nenhum dos *primers* propostos era específico apenas para a espécie *C. aurantium*. Os *primers* Cita6-F/Cita6R1, com alvo no gene RGAs4-1-like, foram aqueles que demonstraram maior potencial discriminatório, uma vez que amplificaram um menor número de espécies do género *Citrus*. Os *primers* Eph3-F/Eph3R, com alvo na região ITS, permitiram amplificar todas as espécies do género *Ephedra*, podendo ser usados para a deteção do género. Os *primers* Eph4-F/Eph4R, com alvo na região ITS, permitiram amplificar *E. sinica* e outras duas espécies, cuja discriminação foi conseguida pela aplicação de PCR em tempo real com análise HRM. Os métodos foram aplicados aos PFS, não sendo detetada a presença de *E. sinica* em nenhuma amostra e permitindo verificar a presença de *C. aurantium* numa de três amostras rotuladas como contendo esta espécie. Nas infusões, também não foi verificada a presença de *E. sinica*, contudo, verificando-se uma rotulagem incorreta nas amostras descritas como contendo *C. aurantium* como ingrediente.

Palavras chave: PFS, *Citrus aurantium*, *Ephedra sinica*, adulteração, PCR, HRM.

Abstract

Currently, there has been an increase in the consumption of plant food supplements (PFS), in particular in developed countries. Being these products legally considered as foods and not being subjected to the same rules applied to medicines, it is essential to develop effective methods that can detect fraudulent practices. One of the possible frauds comprises botanical adulterations, which may occur due to the swap of plants, these being either occasional or intentional to obtain higher profits. In PFS advertised for weight loss, it is important to assess the presence of certain species, whose use is associated with weight loss due to thermogenic effects, such as *Ephedra sinica*, whose inclusion in PFS is currently prohibited by the EU and the USA, and bitter orange (*Citrus aurantium*).

This work aimed at developing new methodologies based on qualitative PCR and real time PCR coupled to High Resolution Melting (HRM) analysis and their application to detect the species *C. aurantium* and *E. sinica* in infusions and PFS for weight loss. For this purpose, 30 reference plants of *Citrus* spp. and 22 of *Ephedra* spp. were obtained from germplasm banks and botanical gardens. Commercial samples, including 10 PFS and 6 infusions for weight loss were also tested. All DNA extracts were amplified by conventional PCR using universal primers, resulting in positive amplifications for most reference plants and samples. Primers for the specific detection of *C. aurantium* and *E. sinica* were designed, targeting several genomic regions. Evaluation of specificity, performed by qualitative PCR, showed that none of the proposed *primers* were specific only to the species *C. aurantium*. The primers Cita6-F/Cita6R1, targeting gene RGAs4-1-like, were those that showed the greatest discriminatory potential since they amplified a smaller number of species of the genus *Citrus*. The *primers* Eph3-F/Eph3R, targeting ITS region, allowed the amplification of all tested *Ephedra* spp., and, therefore, can be used for genus detection. The primers Eph4-F/Eph4R, targeting ITS region, allowed the amplification of *E. sinica* together with two other species. Discrimination of the three amplified species was successfully achieved by real-time PCR coupled with HRM analysis. The developed methods were applied to PFS samples, allowing identifying *C. aurantium* in one of three labelled samples and concluding that *E. sinica* was not present in any of the tested samples. For the infusions, *E. sinica* was also not detected, though it was verified an incorrect labelling of the samples described as containing *C. aurantium* as an ingredient.

Keywords: PFS, *Citrus aurantium*, *Ephedra sinica*, adulteration, PCR, HRM.

Índice

| | |
|--|-----|
| Agradecimentos | iii |
| Resumo | v |
| Abstract..... | vi |
| Índice | vii |
| Índice de figuras | ix |
| Índice de tabelas | xiv |
| Lista de Abreviaturas | xv |
| Componente Teórica..... | 1 |
| 1 Suplementos Alimentares | 3 |
| 1.1 Suplementos Alimentares à base de plantas para perda de peso | 4 |
| 2 Legislação e controlo de Suplementos Alimentares..... | 5 |
| 2.1 Controlo a nível internacional..... | 5 |
| 2.2 Controlo a nível nacional | 8 |
| 3 Adulteração em suplementos alimentares à base de plantas..... | 9 |
| 4 Métodos utilizados para a identificação de plantas medicinais em suplementos alimentares | 10 |
| 4.1 Métodos físicos..... | 11 |
| 4.2 Métodos químicos/bioquímicos | 12 |
| 4.3 Marcadores moleculares | 12 |
| 4.3.1 PCR convencional | 13 |
| 4.3.2 RAPD e SCAR | 15 |
| 4.3.3 SSR e ISSR..... | 16 |
| 4.3.4 AFLP | 19 |
| 4.3.5 PCR em tempo real | 20 |
| 4.3.6 Sequenciação de ADN..... | 25 |
| 4.3.7 <i>DNA barcoding</i> | 26 |
| 5 Plantas utilizadas em suplementos alimentares para emagrecimento | 28 |
| 5.1 Ephedra sinica..... | 28 |
| 5.1.1 Descrição e propriedades | 28 |
| 5.1.2 Metodologias de identificação | 30 |
| 5.2 <i>Citrus aurantium</i> (Laranja-amarga) | 32 |
| 5.2.1 Descrição e propriedades..... | 32 |
| 5.2.2 Metodologias de identificação | 33 |
| 6 Objetivos e âmbito do trabalho | 35 |
| Componente Experimental..... | 37 |
| 7 Material e Métodos..... | 39 |
| 7.1 Descrição e preparação das amostras | 39 |
| 7.2 Reagentes e soluções..... | 43 |

| | | |
|-------|--|----|
| 7.3 | Métodos de extração de ADN..... | 44 |
| 7.3.1 | CTAB 1% PVP..... | 45 |
| 7.3.2 | Nucleospin Plant II..... | 46 |
| 7.4 | Avaliação e quantificação do ADN extraído..... | 46 |
| 7.5 | Amplificação por PCR..... | 47 |
| 7.5.1 | Primers..... | 47 |
| 7.5.2 | PCR qualitativa..... | 48 |
| 7.5.3 | PCR em tempo real e análise por HRM..... | 50 |
| 8 | Resultados e discussão..... | 53 |
| 8.1 | Desenvolvimento de metodologias para diferenciação de <i>Citrus</i> spp. | 53 |
| 8.1.1 | Avaliação dos extratos de ADN..... | 53 |
| 8.1.2 | Desenvolvimento de métodos de PCR específicos..... | 55 |
| 8.1.3 | PCR em tempo real com análise por HRM..... | 62 |
| 8.2 | Desenvolvimento de metodologias para diferenciação de <i>Ephedra</i> spp. | 64 |
| 8.2.1 | Avaliação dos extratos de ADN..... | 64 |
| 8.2.2 | Desenvolvimento de primers específicos..... | 66 |
| 8.2.3 | PCR em tempo real com análise por HRM..... | 71 |
| 8.3 | Análise de infusões para emagrecimento..... | 73 |
| 8.3.1 | Avaliação dos extratos de ADN..... | 73 |
| 8.3.2 | Deteção das espécies <i>Citrus aurantium</i> e <i>Ephedra sinica</i> | 74 |
| 8.4 | Análise de suplementos alimentares à base de plantas..... | 76 |
| 8.4.1 | Avaliação dos extratos de ADN..... | 76 |
| 8.4.2 | Deteção das espécies <i>Citrus aurantium</i> e <i>Ephedra sinica</i> | 78 |
| 9 | Conclusões..... | 81 |
| | Referências bibliográficas..... | 83 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Representação das etapas da reação em cadeia da polimerase (PCR). Adaptado de https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Polymerase_Chain_Reaction/How_PCR_is_Performed | 14 |
| Figura 2: Representação esquemática da metodologia RAPD em que a reação em cadeia da polimerase (PCR) é realizada com um único primer decâmico, originando a amplificação de diversas regiões do genoma (Kumar & Gurusubramanian, 2011). | 15 |
| Figura 3: Representação esquemática do desenvolvimento de um marcador SCAR para a identificação da espécie (A). Nesta metodologia, os primers SCAR foram desenhados a partir do perfil obtido por RAPD de todo o genoma. A banda polimórfica de interesse é excisada do gel de agarose e depois sequenciada. Com base na informação obtida, é desenvolvido um marcador SCAR específico para a espécie (A) (Shaw et al., 2009). | 17 |
| Figura 4: Diferenças entre as técnicas SSR e ISSR, em que SSR utiliza primers destinados a amplificar uma única região repetitiva, enquanto ISSR utiliza um único primer contendo repetições por forma a amplificar regiões entre duas repetições (Yip et al., 2007). | 18 |
| Figura 5: Curva de amplificação obtida por PCR em tempo real, demonstrando as diferentes fases da reação (adaptado de Rodriguez-Lazaro & Hernandez, 2013). | 21 |
| Figura 6: Princípio de deteção utilizando o corante SYBR Green I (adaptado de Rodriguez-Lazaro & Hernandez, 2013). | 22 |
| Figura 7: Cinética de PCR em tempo real com os corantes SYBR® Green e EvaGreen® (Adaptado de http://www.gencompare.com/qpcr.htm). | 23 |
| Figura 8: Curva HRM, demonstrando um decréscimo na fluorescência quando ocorre a passagem da estrutura de ADN em cadeia dupla para cadeia simples. Vermelho: homocigótico com guanina; verde: homocigótico com adenina; azul: heterocigótico (Adaptado de http://hrm.genequantification.info/) | 23 |
| Figura 9: Mecanismo de ação da sonda TaqMan®. R: fluoróforo (emite fluorescência), Q: <i>Quencher</i> (absorve fluorescência da sonda intacta). (adaptado de http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimpepr.htm) | 24 |
| Figura 10: <i>Ephedra sinica</i> (http://www.itmonline.org/arts/mahuang.htm). | 29 |
| Figura 11: Produtos de PCR obtidos para as misturas de <i>Ephedra</i> com infusões comerciais (Super Dieter's Tea, Lipton herbal tea, Stash apple cinnamon herbal tea) com diferentes rácios (1/10, 1/100 e 1/1000) utilizando os três pares de <i>primers</i> específicos para <i>Ephedra</i> spp. E.s. - <i>E. sinica</i> , E.m. - <i>E. major</i> , E.o. - <i>E. ochreatea</i> , M - Marcador de ADN (Teichen et al, 2006). | 31 |
| Figura 12: <i>Citrus aurantium</i> (http://www.mdidea.com/products/proper/proper09001.html). | 32 |
| Figura 13: Estruturas químicas de sinefrina e efedrina, evidenciando as diferenças estruturais. (http://planetadocorpo.com/2015/07/oque-e-sinefrina-e-para-que-serve.html). | 33 |
| Figura 14. Amostras de infusões e PFS para perda de peso utilizadas neste estudo. | 39 |
| Figura 15: Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico extraído pelo método NucleoSpin Plant II, (protocolo 2) das plantas de referência pertencentes ao género <i>Citrus</i> . Legenda: 1- <i>C. limon</i> ; 2- <i>C. sinensis</i> ; 3- <i>C. aurantium</i> (EM79); 4- <i>C. medica</i> ; 5- <i>C. changensis</i> , 6- <i>C. myrtifolia</i> ; 7- <i>C. aurantium</i> 'Karna' (EM100); 8- <i>C. 'Ponderosa'</i> ; 9- <i>C. limonia</i> 'Australiam Red'; 10- <i>C. assamensis</i> ; 11- <i>M. australasica</i> ; 12- <i>C. aurantium</i> (EM105); 13- <i>C. gabuensis</i> ; 14- <i>C. wilsonii</i> 'Ichang Lemon'; 15- <i>C. junos</i> 'Yuzu'; 16- <i>C. aurantium</i> 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17- <i>C. tangelo</i> ; 18- <i>C. meyeri</i> ; 19- <i>C. bergamia</i> 'Bergamot'; 20- <i>C. aurantium</i> 'Variegated' (EM113); 21- <i>C. grandis</i> ; 22- <i>C. hystrix</i> ; 23- <i>C. hystrix</i> DC.; 24- <i>C. aurantifolia</i> (Christm.&Panz.) Swingle; 25- <i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.; 26 - <i>C. medica</i> ; 27- <i>C. aurantium</i> (EM124); 28- <i>C. clementina</i> ; 29- <i>C. paridisi</i> ; 30- <i>C. reticulada</i> ; M- marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). | 54 |
| Figura 16: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género <i>Citrus</i> com os <i>primers</i> EG-F/ EG-R. Legenda: 1- <i>C. limon</i> ; 2- <i>C.</i> | |

sinensis; 3- *C. aurantium* (EM79); 4- *C. medica*; 5- *C. changensis*, 6- *C. myrtifolia*; 7- *C. aurantium* 'Karna' (EM100); 8- *C. 'Ponderosa'*; 9- *C. limonia* 'Australiam Red'; 10- *C. assamensis*; 11- *M. australasica*; 12- *C. aurantium* (EM105); 13- *C. gabuensis*; 14- *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 15- *C. junos* 'Yuzu'; 16- *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17- *C. tangelo*; 18- *C. meyeri*; 19- *C. bergamia* 'Bergamot'; 20- *C. aurantium* 'Variegated' (EM113); 21- *C. grandis*; 22- *C. hystrix*; 23- *C. hystrix* DC.; 24- *C. aurantifolia* (Christm.&Panz.) Swingle; 25- *C. maxima* (Burm.) Merr.; 26 - *C. medica*; 27- *C. aurantium* (EM124); 28- *C. clementina*; 29- *C. paridisi*; 30- *C. reticulada*; M- marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido)..... 55

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de *Citrus* spp. com os primers Cita1-F/ Cita1-R. Legenda: 1- *C. limon*; 2- *C. sinensis*; 3- *C. aurantium* (EM79); 4- *C. medica*; 5- *C. changensis*, 6- *C. myrtifolia*; 7- *C. aurantium* 'Karna' (EM100); 8- *C. 'Ponderosa'*; 9- *C. limonia* 'Australiam Red'; 10- *C. assamensis*; 11- *M. australasica*; 12- *C. aurantium* (EM105); 13- *C. gabuensis*; 14- *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 15- *C. junos* 'Yuzu'; 16- *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17- *C. tangelo*; 18- *C. meyeri*; 19- *C. bergamia* 'Bergamot'; 20- *C. aurantium* 'Variegated' (EM113); 21- *C. grandis*; 22- *C. hystrix*; 23- *C. hystrix* DC.; 24- *C. aurantifolia* (Christm.&Panz.) Swingle; 25- *C. maxima* (Burm.) Merr.; 26 - *C. medica*; 27- *C. aurantium* (EM124); 28- *C. clementina*; 29- *C. paridisi*; 30- *C. reticulada*; M- marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). 56

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Citrus*. A- Primers Cita2-F/ Cita2-R e B- Primers Cia3-F/ Cita3-R. Legenda: 1- *C. limon*; 2- *C. sinensis*; 3- *C. aurantium* (EM79); 4- *C. medica*; 5- *C. changensis*, 6- *C. myrtifolia*; 7- *C. aurantium* 'Karna' (EM100); 8- *C. 'Ponderosa'*; 9- *C. limonia* 'Australiam Red'; 10- *C. assamensis*; 11- *M. australasica*; 12- *C. aurantium* (EM105); 13- *C. gabuensis*; 14- *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 15- *C. junos* 'Yuzu'; 16- *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17- *C. tangelo*; 18- *C. meyeri*; 19- *C. bergamia* 'Bergamot'; 20- *C. aurantium* 'Variegated' (EM113); 21- *C. grandis*; 22- *C. hystrix*; 23- *C. hystrix* DC.; 24- *C. aurantifolia* (Christm.&Panz.) Swingle; 25- *C. maxima* (Burm.) Merr.; 26 - *C. medica*; M- marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido)..... 57

Figura 19: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Citrus*. A- Primers Cita4-F/ Cita4-R e B- Primers Cita4-F/Cita4-R. Legenda: 1- *C. limon*; 2- *C. sinensis*; 3- *C. aurantium* (EM79); 4- *C. medica*; 5- *C. changensis*, 6- *C. myrtifolia*; 7- *C. aurantium* 'Karna' (EM100); 8- *C. 'Ponderosa'*; 9- *C. limonia* 'Australiam Red'; 10- *C. assamensis*; 11- *M. australasica*; 12- *C. aurantium* (EM105); 13- *C. gabuensis*; 14- *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 15- *C. junos* 'Yuzu'; 16- *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17- *C. tangelo*; 18- *C. meyeri*; 19- *C. bergamia* 'Bergamot'; 20- *C. aurantium* 'Variegated' (EM113); 21- *C. grandis*; 22- *C. hystrix*; 23- *C. hystrix* DC.; 24- *C. aurantifolia* (Christm.&Panz.) Swingle; 25- *C. maxima* (Burm.) Merr.; 26 - *C. medica*; M- marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido)..... 57

Figura 20: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Citrus*. A- Primers Cita6-F/ Cita6-R1 e B- Primers Cita6-F/ Cita6-R2. Legenda: 1- *C. limon*; 2- *C. sinensis*; 3- *C. aurantium* (EM79); 4- *C. medica*; 5- *C. changensis*, 6- *C. myrtifolia*; 7- *C. aurantium* 'Karna' (EM100); 8- *C. 'Ponderosa'*; 9- *C. limonia* 'Australiam Red'; 10- *C. assamensis*; 11- *M. australasica*; 12- *C. aurantium* (EM105); 13- *C. gabuensis*; 14- *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 15- *C. junos* 'Yuzu'; 16- *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17- *C. tangelo*; 18- *C. meyeri*; 19- *C. bergamia* 'Bergamot'; 20- *C. aurantium* 'Variegated' (EM113); 21- *C. grandis*; 22- *C. hystrix*; 23- *C. hystrix* DC.; 24- *C. aurantifolia* (Christm.&Panz.) Swingle; 25- *C. maxima* (Burm.) Merr.; 26 - *C. medica*; 27- *C. aurantium* (EM124); 28- *C. clementina*; 29- *C. paridisi*; 30- *C. reticulada*; M- marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). 58

Figura 21: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Citrus* com os primers Cita7-F Cita7-R (A) e Cita8-F/Cita8-R (B). Legenda: 1- *C. limon*; 2- *C. sinensis*; 3- *C. aurantium* (EM79); 4- *C. medica*; 5- *C. changensis*, 6- *C. myrtifolia*; 7- *C. aurantium* 'Karna' (EM100); 8- *C. 'Ponderosa'*; 9- *C. limonia* 'Australiam Red'; 10- *C. assamensis*; 11- *M. australasica*; 12- *C. aurantium* (EM105); 13- *C. gabuensis*; 14- *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 15- *C. junos* 'Yuzu'; 16- *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17- *C. tangelo*; 18- *C. meyeri*; 19- *C. bergamia* 'Bergamot'; 20- *C. aurantium* 'Variegated' (EM113); 21- *C. grandis*; 22- *C. hystrix*; 23- *C. hystrix* DC.; 24- *C. aurantifolia* (Christm.&Panz.) Swingle; 25- *C. maxima* (Burm.) Merr.; 26 - *C. medica*; 27- *C. aurantium* (EM124); 28- *C.*

clementina; 29– *C. paridisi*; 30– *C. reticulada*; M– marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). 59

Figura 22: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Citrus* com os primers Cita6-F/ Cita6-R1. Legenda: 1– Erva ríncipe; 2– Funcho; 3– Dente-de-leão; 4– Cavalinha); 5– Sálvia; 6– Hortelã-pimenta; 7– Sene; 8– Tília; 9– Uva-ursina; 10– S. Roberto; 11– Passiflora; 12– Pés de cereja; 13– Alecrim; 14– Camomila; 15– Nogueira; 16– Oliveira; 17– *Ephedra californica*; 18– *E. torreyana*; 19– *E. viridis*; 20– *E. aphylla*; 21– *E. fragilis*; 22– *E. gerardiana*; 23– *E. distachya*; 24– *E. tweediana*; 25– *Ephedra* sp. (EM89); 26– *Ephedra* sp. (EM90); 27– *E. fragilis* (EM91); 28– *E. chilensis*; 29– *E. gerardiana* (EM93); 30– *E. distachya* (EM95); 31– *E. fragilis* (EM94); 32– *E. major* (EM97); 33– *E. sinica* (EM120); 34– *E. gerardiana* (EM121); 35– *E. sinica* (EM122); 36– *E. sinica* (EM123); 37– Boldo; 38– Verbena; 39– Espinheiro alvar; 40– Cardo mariano; 41– Oregãos; 42– Manjeriço; 43– Coentros; 44– Açafraão das índias; 45– Lúcia-lima; 46– Eucalipto; 47– Castanheiro-da-índia; CP- controlo positivo; CN- controlo negativo; M– marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). .61

Figura 23: Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real com corante EvaGreen (A) e respetivas curvas de desnaturação (B) de amostras de *Citrus aurantium* e com os primers Cita6-F/Cita6-R1. 62

Figura 24: Gráfico das curvas normalizadas (A) e de diferença (B) obtidas por análise HRM das amostras de *Citrus aurantium* com o corante EvaGreen e com os primers Cita6-F/Cita6-R1. Cluster vermelho – EM105, EM113 e EM124; Cluster verde – EM109. 63

Figura 25: Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico extraído pelo método NucleoSpin Plant II, (protocolo 2) de todas as espécies pertencentes ao género *Ephedra*. Legenda: 1– *E. californica*; 2– *E. torreyana*; 3– *E. viridis*; 4– *E. aphylla*; 5– *E. fragilis*; 6– *E. gerardiana* (EM86); 7– *E. distachya*; 8– *E. tweediana*; 9– *Ephedra* sp. (EM89); 10– *Ephedra* sp. (EM90); 11– *E. fragilis*; 12– *E. chilensis*; 13– *E. gerardiana* (EM93); 14– *E. fragilis*; 15– *E. distachya*; 16– *E. major* (EM96); 17– *E. major* (EM97); 18– *E. gerardiana* (EM121); 19– *E. sinica* (EM122); 20– *E. sinica* (EM123); 21– *E. equisetina*; M– marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). 66

Figura 26: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Ephedra* com os primers EG-F/EG-R. Legenda: 1– *E. californica*; 2– *E. torreyana*; 3– *E. viridis*; 4– *E. aphylla*; 5– *E. fragilis*; 6– *E. gerardiana* (EM86); 7– *E. distachya*; 8– *E. tweediana*; 9– *Ephedra* sp. (EM89); 10– *Ephedra* sp. (EM90); 11– *E. fragilis*; 12– *E. chilensis*; 13– *E. gerardiana* (EM93); 14– *E. fragilis*; 15– *E. distachya*; 16– *E. major* (EM96); 17– *E. major* (EM97); 18– *E. gerardiana* (EM121); 19– *E. sinica* (EM122); 20– *E. sinica* (EM123); 21– *E. equisetina*; M– marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). 66

Figura 27: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Ephedra* com os primers Eph1-F/Eph1-R (A) e Eph2-F/Eph2-R (B). Legenda: 1– *E. californica*; 2– *E. torreyana*; 3– *E. viridis*; 4– *E. aphylla*; 5– *E. fragilis*; 6– *E. gerardiana* (EM86); 7– *E. distachya*; 8– *E. tweediana*; 9– *Ephedra* sp. (EM89); 10– *E. chilensis*; 11– *E. gerardiana* (EM93); 12– *E. distachya*; 13– *E. major*; 14– *E. sinica* (EM120); 15– *E. gerardiana* (EM121); 16– *E. sinica* (EM122); 17– *E. sinica* (EM123); M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN – Controlo negativo..... 67

Figura 28: Alinhamento das sequências ITS disponíveis no Genbank para diferentes *Ephedra* spp utilizadas no desenho dos primers Eph3-F/Eph3-R. 68

Figura 29: Alinhamento das sequências ITS disponíveis no Genbank para diferentes *Ephedra* spp utilizadas no desenho dos primers Eph4-F/Eph4-R. 68

Figura 30: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Ephedra* com os primers Eph3-F/ Eph3-R. Linha 1– E1– *E. californica* (EM81); 2– *E. torreyana* (EM82); 3– *E. viridis* (EM83); 4– *E. aphylla* (EM84); 5– *E. fragilis* (EM85); 6– *E. gerardiana* (EM86); 7– *E. distachya* (EM87); 8– *E. tweediana* (EM88); 9– *Ephedra* sp. (EM89); 10– *E. chilensis* (EM92); 11– *E. gerardiana* (EM93); 12– *E. distachya* (EM95); 13– *E. major* (EM97); 14– *E. equisetina* (EM121); 15– *E. sinica* (EM122); 16– *E. sinica* (EM123); 17– *E. equisetina* (EM139); M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN – Controlo negativo. 69

Figura 31: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Ephedra* com os primers Eph4-F/ Eph4-R. Legenda: 1- *E. californica* (EM81); 2- *E. torreyana* (EM82); 3- *E. viridis* (EM83); 4- *E. aphylla* (EM84); 5- *E. fragilis* (EM85); 6- *E. gerardiana* (EM86); 7- *E. distachya* (EM87); 8- *E. tweediana* (EM88); 9- *Ephedra* sp. (EM89); 10- *E. chilensis* (EM92); 11- *E. gerardiana* (EM93); 12- *E. distachya* (EM95); 13- *E. major* (EM97); 14- *E. equisetina* (EM121); 15- *E. sinica* (EM122); 16- *E. sinica* (EM123); 17- *E. equisetina* (EM139); M - Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN - Controlo negativo. 69

Figura 32: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos para estudo da reatividade cruzada com os primers Eph4-F/ Eph4-R. Legenda: 1- Erva príncipe; 2- Funcho; 3- Dente-de-leão; 4- Cava; 5- Sálvia; 6- Hortelã-pimenta; 7- Sene; 8- Tília; 9- Uva-ursina; 10- Erva de S. Roberto; 11- Passiflora; 12- Verbena; 13- Valeriana; 14- Oregãos; 15- Manjeriço; 16- Coentros; 17- Pés de cereja; 18- Lúcia-lima; 19- Eucalipto; 20- Alecrim; 21- *C. limon*; 22- *C. sinensis*; 23- *C. aurantium*; 24- *C. medica*; 25- *C. limonia*; 26 - *C. paradisi*; 27- *C. changensis*; 28- *C. myrtifolia*; 29- *C. aurantium* 'Karna'; 30- *C. 'Ponderosa'*; 31- *C. limonia* 'Australiam Red'; 32- *C. assamensis*; 33- *M. australasica*; 34- *C. aurantium* (EM105); 35- *C. gabuensis*; 36- *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 37- *C. junos* 'Yuzu'; 38- *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs'; 39- *C. tangelo*; 40- *C. meyeri*; 41- *C. bergamia* 'Bergamot'; 42- *C. aurantium* 'Variegated'; 43- *C. grandis*; 44- *C. hystrix*; 45- *C. hystrix* DC.; 46- *C. aurantifolia*; 47- *C. maxima*; 48- *C. medica*; 49- *C. aurantium* (EM124); 50- *C. clementina*; 51- *C. paridisi*; M - Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN - Controlo negativo. 71

Figura 33: Curvas de amplificação das espécies de *E. aphylla*, *E. distachya* e *E. sinica* com os primers Eph4-F/Eph4-R (A) e respetivas curvas de desnaturação (B) obtidas por PCR em tempo real com o corante EvaGreen. 72

Figura 34: Gráfico da curva de diferença por análise HRM, obtido após amplifica o das amostras de *Ephedra* spp. por PCR em tempo real com o corante EvaGreen utilizando os primers Eph4-F/Eph4-R1. Cluster vermelho - *E. aphylla* (EM84); Cluster verde - *E. sinica* (EM123); Cluster azul- *E. distachya* (EM95); Cluster laranja- *E. sinica* (EM122). 73

Figura 35: Eletroforese em gel de agarose de ADN gen mico das amostras de infusões extraído pelo método CTAB 1% PVP. Legenda: 1- Laranja Flor (EM72); 2- Laranja Flor (Salutem) (EM873); 3- gotu kola + casca de laranja (Celeiro dieta) (EM74); 4- Detox + Control de peso (Naturefoods) (EM75); 5- Diet Linha (CelliSlim Juvamine) (EM76); 6- Mix de plantas naturais (PROSONO) (EM129); M- marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). 74

Figura 36: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplifica o dos extratos das infusões com os primers EG-F/EG-R. Legenda: 1- Laranja Flor (EM72); 2- Laranja Flor (EM73); 3- Gotu Kola + Casca de Laranja (EM74); 4- Detox + Controlo de peso (EM75); 5- Diet (EM76); 6- Mix de plantas naturais (EM129); M - Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN - Controlo negativo. 74

Figura 37: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplifica o dos extratos das infusões. A- Primers Cita6-F/Cita6-R1 e B- Primers Cita6-F/Cita6-R1. Legenda: 1- Laranja Flor (EM72); 2- Laranja Flor (EM73); 3- Gotu Kola + Casca de Laranja (EM74); 4- Detox + Control de peso (EM75); 5- Diet (EM76); 6- Mix de plantas naturais (EM129); M- Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN- Controlo negativo. 75

Figura 38: Eletroforese em gel de agarose de ADN gen mico das amostras de PFS extraídas pelo método Nucespin Plant II (protocolo 2), com pré-tratamento com uma soluço de tampão fosfato. Legenda: 1- EM130; 2- EM131; 3- EM132; 4- EM133; 5- EM134; 6- EM135; 7- EM136; 8- EM137; 9- EM138; M- marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido). 78

Figura 39: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplifica o dos suplementos alimentares   base de plantas com os primers EG-F/EG-R. Legenda: 1- EM130; 2- EM131; 3- EM132; 4- EM133; 5- EM134; 6- EM135; 7- EM136; 8- EM137; 9- EM138; 10- SA24; 11- SA27; M - Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN -Controlo negativo. 78

Figura 40: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplifica o dos suplementos alimentares   base de plantas com os primers Cita6-F/Cita6-R1 (A) e Eph4-F/Eph4-R

(B). Legenda: 1- EM130; 2- EM131; 3- EM132; 4- EM133; 5- EM134, 6- EM135; 7- EM136; 8- EM137; 9- EM138; 10- SA24; 11- SA27; M - Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN -Controlo negativo. 79

Índice de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Descrição das amostras de suplementos alimentares utilizadas no estudo. | 40 |
| Tabela 2: Descrição das amostras de infusões utilizadas no estudo. | 41 |
| Tabela 3: Lista das espécies de referência pertencentes ao género <i>Citrus</i> e respetivas origens. | 42 |
| Tabela 4: Lista das espécies pertencentes ao género <i>Ephedra</i> e respetivas origens. | 43 |
| Tabela 5: Oligonucleótidos usados em PCR qualitativa. | 48 |
| Tabela 6: Componentes e respetivas quantidades utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com diferentes <i>primers</i> para <i>Citrus</i> spp. | 49 |
| Tabela 7: Componentes e respetivas quantidades utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com diferentes <i>primers</i> para <i>Ephedra</i> spp. | 49 |
| Tabela 8: Condições específicas utilizadas na PCR qualitativa para cada par de <i>primers</i> | 50 |
| Tabela 9: Componentes e respetivas quantidades utilizados nas amplificações por PCR em tempo real com os <i>primers</i> Cita6-F/Cita6-R1 e Eph4-F/Eph4-R. | 51 |
| Tabela 10: Condições necessárias para as amplificações por PCR em tempo real e análise por HRM com os <i>primers</i> Cita6-F/R1 e Eph4-F/R. | 51 |
| Tabela 11: Valores das purezas e concentrações médias do ADN extraído das amostras do género <i>Citrus</i> | 54 |
| Tabela 12: Resultados da amplificação por PCR dos extratos de plantas de referência do género <i>Citrus</i> utilizando os diferentes conjuntos de <i>primers</i> desenhados. | 60 |
| Tabela 13: Valores das purezas e concentrações médias do ADN extraído das amostras referentes ao género <i>Ephedra</i> | 65 |
| Tabela 14: Resultados das amplificações por PCR dos extratos de ADN das amostras do género <i>Ephedra</i> usando os <i>primers</i> EG-F/EG-R, Eph1-F/Eph1-R, Eph2-F/Eph2-R, Eph3-F/Eph3-R, Eph4-F/Eph4-R. | 70 |
| Tabela 15: Valores das purezas e concentrações médias do ADN extraído das amostras de infusões. | 73 |
| Tabela 16: Valores das purezas e concentrações médias do ADN extraído das amostras de suplementos alimentares. | 77 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|-----------------|--|
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| AFLP | <i>Amplified Fragment Length Polymorphisms</i> |
| ARNr | Ácido ribonucleico ribossomal |
| ASAE | Autoridade de Segurança Alimentar e Económica |
| CBOL | Consortium for the Barcode of Life |
| ChlB | Região do cloroplasto |
| COI | Citocromo c oxidase subunidade I |
| Ct | <i>Cycle Threshold</i> |
| ddNTP | Didesoxirribonucleótidos trifosfatados |
| DGAV | Direção Geral de Alimentação e Veterinária |
| dNTP | Desoxirribonucleótido trifosfato |
| DSHEA | Dietary Supplement Health and Education |
| EFSA | Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (<i>European Food Safety Authority</i>) |
| ESI-MS | Espetrometria de massa com ionização eletrospray |
| FDA | Food and Drug Administration |
| GC | Cromatografia gasosa |
| GC-MS | Cromatografia gasosa com espetrometria de massa |
| GPP | Gabinete de Planeamento e Políticas |
| HPLC | Cromatografia líquida de elevada resolução |
| HRM | <i>High Resolution Melting</i> |
| iBOL | International Barcode of Life |
| INFARMED | Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde |
| ISSR | <i>Inter Simple Sequence Repeats</i> |
| ITS | <i>Internal Transcribed Space</i> |
| MS | Espetrometria de Massa |
| NHANES | National Health and Nutrition Examination Survey |
| NHIS | National Health Interview Surveys |
| PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PFS | Suplementos à base de plantas |
| QPS | Qualified presumption of safety |
| RASFF | Rapid Alert System for Food and Feed |
| RAPD | Amplificação aleatória de ADN polimórfico (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>) |

| | |
|----------------------|---|
| RFLP | Polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>) |
| RMN | Ressonância magnética nuclear |
| SCAR | <i>Sequence Characterized Amplified Regions</i> |
| SNP | Polimorfismos de nucleotídeo único (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>) |
| SRAP | <i>Sequence-related Amplified Polymorphism</i> |
| SSR | Microssatélites or repetições simples repetitivas (<i>Simple Sequence Repeats</i>) |
| THMP | <i>Traditional Herbal Medicinal Products</i> |
| TLC | Cromatografia em camada fina |
| T_m | Temperatura de <i>melting</i> |
| UE | União Europeia |
| UV | Ultravioleta |

Componente Teórica

1 Suplementos Alimentares

Na última década, tem-se verificado um interesse crescente pela utilização de “terapias alternativas” face a uma insatisfação crescente por parte de diversos indivíduos perante a medicina convencional. Em particular, a utilização de suplementos alimentares, com especial destaque para os suplementos alimentares à base de plantas (PFS), tem recebido uma aceitação crescente pela generalidade dos consumidores (Egan et al., 2011). O sucesso a nível comercial dos PFS como produtos que apoiam um estilo de vida saudável, deve-se a vários fatores, incluindo o crescente interesse perante ingredientes de origem natural, a perceção de que produtos “naturais” são seguros, a falta de confiança na indústria farmacêutica e na utilização de fármacos, uma maior tendência para automedicação, e também, por vezes, à falta de tempo ou recursos financeiros para recorrer à medicina especializada (Egan et al., 2011; Vargas-Murga et al., 2011). Adicionalmente, estes produtos podem ser facilmente adquiridos através de diversos canais, tais como farmácias, internet, lojas de fitoterapia e supermercados.

Com o crescente interesse e procura destes produtos, a indústria produtora de suplementos alimentares tem-se revelado um importante setor de negócio em diversos países desenvolvidos (Petroczi et al., 2011). Em 2013, o consumo de suplementos alimentares foi estimado, a nível global, pelo *Nutrition Business Journal*, o qual concluiu que o valor em vendas destes produtos teria excedido os 100 biliões de dólares americanos nesse ano. Cerca de um terço deste consumo global em 2013 (cerca de 34,8 biliões de dólares em vendas) diz respeito à população adulta dos EUA, correspondendo a um crescimento de 7,5% em relação a 2012 (New Hope, 2016). De facto, nos últimos anos tem-se assistido a um crescente consumo de suplementos alimentares, com particular ênfase nos EUA e na União Europeia (EU). Segundo diversos estudos realizados através de inquéritos à população em geral, este tipo de produtos é usado com diversos propósitos, incluindo a contribuição para uma alimentação equilibrada, compensação pela falta de nutrientes, compensação pela falta de exercício físico ou estilos de vida pouco saudáveis, contribuição para a manutenção da saúde, prevenção de doenças crónicas, melhoramento da aparência, melhoramento do bem-estar físico e mental, melhoramento a performance sexual e desportiva, entre outros.

De uma forma geral, são ainda escassos os dados concretos sobre a prevalência de consumo de suplementos alimentares, e em de particular no caso dos PFS. Estes estudos são frequentemente de difícil realização devido ao facto de os suplementos alimentares apresentarem diferentes categorias, tais como suplementos vitamínicos, minerais e à base de plantas, e de estes últimos poderem ser confundidos com medicamentos tradicionais à base de plantas (THMP) dado serem frequentes as designações ambíguas, tais como

“medicina natural”, “remédio à base de plantas” ou “fitoterapia”. A maioria dos dados atualmente disponíveis foi obtida no âmbito de inquéritos realizados a larga escala nos EUA, tais como o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) e o *National Health Interview Surveys* (NHIS) (Garcia-Alvarez et al., 2014). Assim, segundo os dados do NHANES (de 2003 a 2006), foi estimado que aproximadamente 49% da população dos EUA consome suplementos alimentares, dos quais 14% corresponde ao consumo de PFS. Em 2007, segundo dados obtidos no NHIS, esta percentagem aumentou para 18% dos adultos entrevistados.

Na UE, no âmbito do projeto europeu PlantLiBRA, realizou-se um estudo retrospectivo sobre o tipo e frequência de consumo de PFS em seis países europeus, nomeadamente Finlândia, Alemanha, Itália, Roménia, Espanha e Reino Unido, ao longo de 12 meses. Num total de 2359 participantes, cerca de 19% referiu ter consumido pelo menos um PFS, tendo os valores mais elevados sido obtidos em Itália (22,7%) e os mais baixos na Finlândia (9,6%). As cápsulas ou comprimidos foram descritos como sendo as formas de dosagem mais utilizadas, ao passo que as plantas usadas nos suplementos alimentares de maior consumo foram as seguintes: ginkgo (*Ginkgo biloba*), prímula (*Oenothera biennis*), alcachofra (*Cynara scolymus*), ginseng (*Panax ginseng*), aloés (*Aloe vera*), funcho (*Foeniculum vulgare*), valeriana (*Valeriana officinalis*), soja (*Glycine max*), cidreira (*Melissa officinalis*), equinácea (*Echinacea purpurea*) e mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) (Garcia-Alvarez, et al., 2014).

Apesar do consumo de suplementos alimentares à base de plantas poder variar de acordo com a demografia e fatores de saúde, entre outros, a informação disponível na literatura sugere que os consumidores destes produtos sejam predominantemente do sexo feminino, adultos com idade avançada e indivíduos com níveis de educação e socioeconómicos elevados. Adicionalmente, verifica-se ainda um consumo elevado de suplementos, incluindo PFS, por atletas, para melhorar a sua performance (Garcia-Alvarez et al., 2014).

1.1 Suplementos Alimentares à base de plantas para perda de peso

A obesidade é atualmente reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crónicas e como sendo um crescente problema de saúde pública que afeta milhões de indivíduos, principalmente em países desenvolvidos. Para além disso, a sociedade atual tende ainda a promover que a pessoa apresente um peso normal por forma a manter uma figura esguia e esbelta. Contudo, a manutenção ou perda de peso, implica frequentemente mudanças de

estilos de vida e de alimentação. Por forma a evitar estas mudanças, por vezes de difícil implementação, muitas pessoas têm recorrido à utilização de PFS publicitados como sendo produtos para perda de peso rápida. Pelo facto destes produtos conterem na sua composição plantas ou os seus extratos, estes são muitas vezes publicitados como sendo “naturais” e também como sendo uma alternativa segura e menos dispendiosa (Mathon et al., 2013; Vaclavik et al., 2014). Desta forma, os PFS comercializados para perda de peso encontram-se entre os mais populares entre os consumidores.

Segundo os dados fornecidos ao Jornal *i* pela consultora IMS Health, em 2014, os Portugueses gastaram cerca de 19,5 milhões de euros em produtos para emagrecimento (principalmente para controlar o apetite, aumentar a função depurativa do fígado e/ou reduzir a retenção de líquidos) adquiridos em farmácias e parafarmácias (ionline, 2015), correspondendo a cerca de 53 mil euros por dia gastos em suplementos alimentares para emagrecimento.

2 Legislação e controlo de Suplementos Alimentares

A legislação que se aplica aos produtos à base de plantas utilizados para a promoção da saúde divide-se em duas vertentes completamente distintas, nomeadamente a categoria dos medicamentos tradicionais à base de plantas (*Traditional Herbal Medicinal Products*, THMP) e a categoria dos suplementos alimentares. A nível Europeu, cada um destes produtos é regulamentado pela sua legislação específica, nomeadamente pela Diretiva 2002/46/CE no caso dos suplementos alimentares e pela Diretiva 2004/24/CE no caso dos THMP. Sendo considerados alimentos, os suplementos alimentares (incluindo PFS) estão ainda sujeitos às disposições gerais da legislação para alimentos (Regulamento CE nº. 178/2002), mediante a qual a responsabilidade pela segurança alimentar recai sobre os operadores do setor. Desta forma, apenas para os medicamentos tradicionais à base de plantas é obrigatória a autorização de introdução no mercado, carecendo os suplementos desta autorização.

O simples facto dos PFS não serem comercializados como THMP, permite-lhes escapar às exigências de apresentação de dados de segurança, eficácia e toxicidade, bem como entrar no mercado de uma forma mais rápida e com menos custos associados (Soares & Simón, 1992).

2.1 Controlo a nível internacional

O mercado mundial dos suplementos alimentares tem conquistado um lugar de destaque nos últimos 50 anos, com uma diversidade exponencial, pelo que se tem

demonstrado indispensável em garantir ao consumidor a informação e segurança adequadas. Para além disso, tornou-se necessário distinguir os suplementos alimentares, enquanto género alimentar específico, de outros produtos como o medicamento.

Neste sentido, a UE entendeu tornar autónomo juridicamente o conceito de *Suplemento Alimentar* através da Diretiva 2002/46/CE que define estes produtos como sendo “géneros alimentícios que se destinam a complementar o regime alimentar normal e que constituem fontes concentradas de determinados nutrientes ou outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico, estemes ou combinados, comercializados em forma doseada, ou seja, as formas de apresentação como cápsulas, pastilhas, comprimidos, pílulas e outras formas semelhantes, saquetas de pó, ampolas de líquido, frascos com conta-gotas e outras formas similares de líquidos ou pós que se destinam a ser tomados em unidades medidas de quantidade reduzida”. Esta diretiva, transposta para a ordem jurídica nacional pelo Decreto-Lei 136/2003, de 28 de junho, o qual foi posteriormente alterado pelo Decreto-Lei 296/2007 e, mais recentemente, pelo Decreto-lei 118/2015, especifica ainda “*nutrientes*” como sendo vitaminas e minerais e estabelece níveis máximos e mínimos para os compostos permitidos, não mencionando contudo o que pode, ou não, ser aceite como “*outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico*”. Desta forma, várias substâncias diferentes são geralmente aceites no âmbito desta definição, tais como aminoácidos, enzimas, ácidos gordos essenciais, plantas e/ou seus extratos (Silano et al., 2011). Uma vez que o mercado dos suplementos alimentares é extremamente diversificado consoante o Estado-membro em questão, a utilização destas substâncias encontra-se sujeita às normas em vigor na legislação nacional de cada membro da UE, sem prejuízo de outras disposições comunitárias a elas aplicáveis. Assim, a falta de especificação e harmonização entre os diferentes países da UE sobre o uso de plantas em suplementos alimentares originou a ocorrência de discrepâncias entre eles, sendo a utilização de alguns materiais botânicos ou seus extratos em PFS permitida em alguns países e não regulamentada, ou proibida, noutros. Além disso, com base na legislação atual da UE, as plantas medicinais e seus extratos podem ser usados quer em suplementos alimentares quer em medicamentos tradicionais (Diretiva 2004/24/CE), com a distinção entre o uso alimentar e uso medicinal sendo frequentemente baseada em hábitos nacionais e na interpretação subjetiva de definições legais (Silano et al., 2011). A título de exemplo, a planta *Ginkgo biloba* pode ser vendida como suplemento alimentar no Reino Unido e nos Países Baixos, como um medicamento sem prescrição na Alemanha e França e como um medicamento sujeito a prescrição médica na Irlanda. Esta disparidade resulta na necessidade de uma contínua avaliação da legalidade dos produtos em cada país da Europa (Asmussen, 2006).

Como referido, sendo considerados como alimento, na UE, os suplementos alimentares à base de plantas, estão sujeitos à Lei Geral dos Alimentos (Regulamento CE nº. 178/2002) bem como à demais legislação alimentar, ou seja, às normas de higiene (Regulamento CE nº. 852/2004), nível máximo de contaminantes (Regulamento CE nº. 1881/2006), novos alimentos (Regulamento CE nº 258/97), entre outros. A nível da UE, a Comissão Europeia é assistida pelo Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal no que respeita a aplicação das diretivas referentes aos suplementos alimentares (por exemplo na determinação dos critérios de pureza dos nutrientes, fixação dos níveis máximos, alteração dos anexos, etc.) e ainda pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) no que toca às disposições que possam ter incidência na saúde pública.

No seguimento da solicitação efetuada pela Comissão Europeia, a EFSA concluiu, em julho de 2009, a primeira avaliação abrangente de substâncias utilizadas como fontes de nutrientes e de vitaminas em suplementos alimentares atualmente comercializados na UE (EFSA, 2009). Com base neste trabalho, a Comissão Europeia reviu a lista de vitaminas e minerais autorizados em suplementos alimentares, que constam no Anexo II da Diretiva 2002/24/CE, posteriormente revista pelo Regulamento CE nº. 1170/2009.

Com o objetivo de fornecer uma abordagem de base científica que possa auxiliar os técnicos responsáveis pela avaliação de risco de ingredientes específicos em suplementos alimentares, em 2009, e após ser efetuada uma consulta pública ao documento, a EFSA publicou um documento orientador para a avaliação da segurança de plantas ou preparados à base de plantas utilizados em suplementos alimentares e um compêndio de materiais botânicos, para os quais foi descrita a presença de substâncias tóxicas, suscetíveis de causar habituação ou psicotrópicas (EFSA, 2012). Posteriormente, entre 2010 e 2012, o Comité Científico da EFSA trabalhou numa segunda versão do compêndio, considerando materiais botânicos não autorizados ou sujeitos a restrições em pelo menos um estado membro da UE, resultando na adição de dois anexos comparativamente à primeira versão, um dos quais refere uma lista de materiais botânicos para os quais é considerado não existir informação sobre substâncias possivelmente adversas, ou para as quais não é possível verificar a informação existente, enquanto o outro anexo lista os materiais botânicos para os quais o Comité Científico não identificou substâncias ou outras razões que levassem à sua inclusão no compêndio. Recentemente, em 2014, o Comité Científico da EFSA emitiu um parecer sobre a implementação da abordagem “Presunção Qualificada de Segurança” (QPS) para a avaliação da segurança de materiais e preparações botânicas. Este parecer, sugere a utilização de um sistema de avaliação estruturado que permita estabelecer a adequação de uma preparação botânica ao *status* QPS. Este sistema consiste num método prático para a avaliação de botânicos e

suas preparações, para os quais existe informação científica adequada, não sendo, por isso, necessária a realização de testes adicionais (EFSA, 2014). Desta forma, a EFSA recomenda a utilização desta abordagem em complementaridade ao documento orientador publicado em 2009 para a avaliação da segurança de plantas ou preparados à base de plantas utilizados em suplementos alimentares.

Por último, refira-se que a EFSA trabalha com autoridades nacionais de segurança alimentar responsáveis pela avaliação de risco nos diferentes países-membros, através do seu Fórum Consultivo (*EFSA Advisory Forum*). Em Portugal a representação no Fórum Consultivo da EFSA está remetida à Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) (EFSA, 2007).

Nos Estados Unidos da América (EUA), os suplementos alimentares e seus ingredientes são regulamentados pela lei de 1994 “*Dietary Supplement Health and Education Act of 1994*” (DSHEA), a qual reconhece estes produtos como sendo uma categoria diferente de alimentos e estabelece os seus próprios requisitos de segurança e rotulagem, limitando de certa forma a função reguladora da *Food and Drug Administration* (FDA) (Rocha et al., 2016). Esta lei define suplemento dietético como “um produto (com exceção do tabaco) que se destina a complementar a dieta e que contém pelo menos um dos seguintes ingredientes: vitaminas, minerais, plantas medicinais ou outras, aminoácidos, substâncias dietéticas usadas pelo homem para suplementação da dieta, concentrados, metabolitos, extratos, ou uma combinação dos ingredientes referidos, destinando-se ainda a ser administrado por via oral na forma de comprimido, cápsula ou líquido”. Ainda de acordo com a lei DSHEA, este tipo de produto não deve ser utilizado como um alimento convencional, devendo ser rotulado como “*dietary supplement*”. Adicionalmente, segundo esta legislação, a indústria produtora e/ou distribuidora é responsável pela segurança destes produtos, bem como por garantir que quaisquer alegações feitas são substanciadas por evidências adequadas, não necessitando, contudo, de comprovar a segurança e eficácia dos produtos (Garcia-Alvarez et al., 2014). Desta forma, também nos EUA, de forma semelhante ao que acontece na UE, os suplementos alimentares não necessitam de qualquer aprovação pela FDA para serem introduzidos no mercado (Rapaka & Coates, 2006; Silano et al., 2011).

2.2 Controlo a nível nacional

Segundo o Decreto-Lei n.º 136/2003 de 28 junho, para uma eficiente monitorização de suplementos alimentares, o fabricante ou o responsável pela colocação no mercado nacional deverá notificar a autoridade competente, a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), desse facto através do envio de cópia do rótulo

utilizado para esse produto. O mesmo procedimento é requerido para suplementos alimentares que sofram alterações (DGAV, 2014). Para notificar um suplemento alimentar, o notificante deverá enviar a cópia do rótulo do produto, bem como a tabela de notificação devidamente preenchida (Anexo I) por via eletrónica (SuplementosDSNA@dgav.pt). A comercialização de suplementos alimentares não necessita de uma aprovação por parte da DGAV. Deste modo, após a notificação, os produtos podem ser colocados à venda no mercado. Todas as notificações destes géneros alimentícios são registadas pela DGAV após uma análise preliminar simples (DGAV, 2014). Relativamente à fiscalização do cumprimento da legislação referente aos suplementos alimentares a nível nacional, existe uma atuação conjunta da ASAE, Órgão de Polícia Criminal do Ministério da Economia e da Inovação, e do Gabinete de Planeamento e Políticas (GPP).

3 Adulteração em suplementos alimentares à base de plantas

Para além de potenciais efeitos adversos associados às próprias plantas utilizadas como ingredientes em PFS ou à interação de compostos fitoquímicos com medicamentos, nos últimos anos, diversos estudos têm referido a ocorrência de casos de adulteração de PFS pela adição de fármacos ou seus análogos (Rocha et al., 2016), bem como casos de substituição de material vegetal (Dong et al., 2003; Fu et al., 2009). Sendo os PFS considerados legalmente como alimentos, não estão sujeitos às mesmas regras aplicadas aos medicamentos, não sendo por isso obrigatória qualquer avaliação de segurança antes da sua comercialização, o que contribui para uma maior propensão à ocorrência de adulterações nestes produtos. Por outro lado, dado o elevado valor monetário envolvido na comercialização destes produtos, produtores sem escrúpulos podem adicionar fármacos, de forma ilegal, para potenciar o efeito desejado pelo consumidor. De facto, a adição ilegal de fármacos a PFS tendo sido reportada em estudos científicos, bem como através de notificações emitidas pela FDA e através do sistema de alerta rápido para os géneros alimentícios e alimentos para animais (RASFF). Em Portugal, em fevereiro de 2014, foi assinado um protocolo de colaboração entre o INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.) e a ASAE, com o objetivo de reforçar o controlo dos suplementos alimentares que na sua composição possam conter substâncias ativas com ação farmacológica utilizadas em medicamentos, constituindo assim um risco para a saúde pública. No seguimento desta colaboração, em 2014, foram recolhidos 98 suplementos alimentares para emagrecimento (n=58) ou melhoria do desempenho sexual

(n=40), disponíveis no mercado nacional e suspeitos de adulteração pela adição de substâncias com ação farmacológica. Destes, concluiu-se que 27 suplementos estavam adulterados com substâncias ativas não permitidas, dos quais 5 eram suplementos para emagrecimento.

Outro tipo de adulteração que pode ocorrer em PFS consiste na troca de plantas, a qual pode ocorrer devido à identificação incorreta de espécimes colhidas na natureza, ou de forma intencional, através da substituição de plantas medicinais por espécies próximas ou morfológicamente semelhantes, mas de menor valor comercial. Consoante o tipo de adulterantes/plantas substituintes usadas, o efeito farmacológico poderá ser inexistente ou totalmente diferente do esperado. Como tal, a troca de plantas medicinais em PFS compromete a segurança destes produtos, estando na origem de casos reportados de intoxicação e mortes que ocorreram após o seu consumo (Elvin-Lewis, 2001; Gallo et al., 2012; Marieschi et al., 2011). A título de exemplo, em 1998 na Bélgica, cerca de 100 consumidoras de um suplemento alimentar para perda de peso contendo plantas medicinais chinesas, desenvolveram disfunções renais, que em alguns casos provocaram a morte ou a necessidade de transplantes renais. Verificou-se que estes casos se deveram à troca não intencional de *Stephania tetrandra* por *Aristolochia fangchi*, sendo esta última tóxica por conter uma nefrotoxina (ácido aristolóquico) (Debelle et al., 2008).

Assim, e considerando que os produtos à base de plantas podem variar na composição e propriedades, torna-se essencial realizar o controlo das matérias usadas na produção de PFS de forma a garantir a sua qualidade, eficácia e segurança. Desta forma, é de especial relevância a identificação/autenticação de plantas medicinais, quer a nível das matérias-primas botânicas usadas na produção de suplementos alimentares quer no produto final, de modo a detetar eventuais práticas fraudulentas e assim assegurar a proteção dos consumidores e a verificação de situações de concorrência desleal entre produtores. Surge assim a necessidade de técnicas que permitam verificar a presença de plantas declaradas e detetar e/ou excluir a presença de outras não autorizadas ou tóxicas, em suplementos alimentares à base de plantas (Dhanya & Sasikumar, 2010; Mir et al., 2010).

4 Métodos utilizados para a identificação de plantas medicinais em suplementos alimentares

Até à presente data, têm sido propostas diferentes metodologias para a identificação de plantas medicinais, nomeadamente métodos físicos, métodos

químicos/bioquímicos e, mais recentemente, marcadores moleculares com base na análise de ADN (Dhanya & Sasikumas, 2010).

4.1 Métodos físicos

Os métodos físicos, usados na deteção de adulterações de plantas medicinais, incluem a observação morfológica, a nível microscópico e macroscópico (avaliação estrutural), bem como a análise de outros parâmetros como textura, solubilidade, densidade e propriedades organoléticas (Dhanya & Sasikumar, 2010).

No caso das plantas, estas apresentam determinadas características morfológicas que determinam a identidade de cada uma (Applequist e Miller, 2013). A identificação macroscópica avalia características tais como a forma, a cor e odor, sendo efetuada por técnicos especialistas em taxonomia a partes específicas da planta, tais como folhas, raízes ou frutos (Tehen et al., 2014). Para que a identificação da planta seja correta, esta deverá ser efetuada na altura da colheita de modo a que a aparência, o aroma ou as propriedades urticantes possam ser examinadas e se consiga diagnosticar a presença de contaminantes (areia, cascalho ou material botânico morfológicamente distinto) (Sanzini et al., 2011). Apesar desta técnica permitir a autenticação de amostras à base de plantas, esta requer uma vasta experiência na identificação de plantas, em especial tratando-se de produtos que resultem de misturas, que tenham sofrido algum tipo de degradação ou que sejam provenientes de espécies relacionadas entre si com características histológicas muito próximas (Zhang et al., 2007). Adicionalmente, esta metodologia apresenta a desvantagem de não ser adequada para amostras muito fragmentadas, como pós, os quais são frequentemente usados em PFS.

Relativamente à identificação microscópica, este é um método que revela as características dos componentes celulares ou tecidos de uma planta. Ao contrário da análise macroscópica, este método pode ser aplicado a plantas fragmentadas ou, até mesmo, em pó (Sanzini *et al.*, 2011). Em diversos casos, a análise microscópica fornece elevada quantidade de informações que por sua vez podem ser aplicadas na identificação de plantas, na avaliação da pureza e na determinação da qualidade de um produto vegetal (Tehen et al., 2014). Esta técnica, tal como a anterior, requer profissionais com elevada experiência em termos de análise de materiais botânicos. A sua aplicação no caso de PFS pode revelar-se como sendo inadequada, uma vez que são produtos bastante processados, logo apresentando o material vegetal na forma de pó muito fino, o que pode levar à perda das características microscópicas. A dificuldade acresce pelo facto dos PFS conterem material botânico misturado com muitos compostos sintéticos (excipientes). Por este motivo, outros métodos, tais como a identificação e quantificação de diferentes compostos

fitoquímicos, bem como a pesquisa de marcadores moleculares, têm sido sugeridas por diversos autores por forma a verificar a presença de plantas declaradas em PFS e a detetar e/ou excluir a presença de outras não autorizadas ou tóxicas (Dhanya & Saskumar, 2010; Mir et al., 2010).

4.2 Métodos químicos/bioquímicos

As técnicas *fingerprinting*, com base em perfis químicos característicos, têm desempenhado um papel fundamental relativamente à análise de produtos como PFS. De entre as utilizadas para a análise de marcadores químicos ou grupos de compostos que permitam obter um perfil característico (*fingerprint*) da planta, destacam-se as técnicas cromatográficas e espectroscópicas, tais como a cromatografia em camada fina (TLC), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a diferentes detetores (ultra-violeta, díodos, fluorescência ou espetrometria de massa (MS)), a cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa (GC-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN), entre outras (Deconinck *et al.*, 2013; Kulkarni *et al.*, 2014; Shaw et al., 2009). Apesar destas técnicas serem frequentemente usadas em estudos fitoquímicos e referidas em várias monografias de Farmacopeias para a identificação de plantas medicinais, a composição e a quantidade de diferentes compostos podem variar dentro da mesma espécie, sendo afetadas pelo clima, condições de cultivo, parte da planta utilizada, processo de colheita, processamento e armazenamento. O efeito combinado destes fatores pode induzir uma grande variabilidade fitoquímica entre populações da mesma espécie ou, até mesmo, de planta para planta. Adicionalmente, espécies intimamente relacionadas possuem muitas vezes padrões fitoquímicos idênticos. Por estes motivos, a utilização de perfis de compostos fitoquímicos obtidos mediante a aplicação de técnicas cromatográficas pode revelar-se como sendo uma abordagem inadequada para autenticação de PFS, os quais apresentam frequentemente misturas de várias plantas medicinais na sua formulação (Kazi *et al.*, 2013).

4.3 Marcadores moleculares

Recentemente, os métodos baseados na análise de ADN têm demonstrado ser alternativas eficazes na avaliação da autenticidade, mesmo quando aplicados a matrizes muito processadas, uma vez que permitem ultrapassar algumas das dificuldades apresentadas pelas técnicas anteriormente referidas. Estes métodos apresentam diversas vantagens, principalmente quando comparados com as metodologias clássicas, que poderão fazer com que a análise de ADN se torne rotineira na identificação e autenticação de plantas medicinais. No caso dos suplementos alimentares, os quais são geralmente

vendidos numa forma que não permite a identificação morfológica das plantas medicinais usadas na sua formulação (seja por estarem na forma de comprimidos, cápsulas, ampolas, entre outros), o uso de marcadores de ADN poderá ser uma vantagem por permitir a sua análise mesmo em preparações muito processadas, dada a sua integridade ser ainda suficientemente (Xu et al., 2002). As técnicas com base na análise de ADN são ainda especialmente úteis nos casos em que as amostras de material botânico correspondem à mistura de várias espécies, por vezes do mesmo género, pois tanto as características morfológicas como as químicas são muito semelhantes entre indivíduos próximos. Como tal, dependendo na escolha da técnica, as análises de ADN permitem a distinção não só entre espécies ou subespécies, mas até entre indivíduos. Outros fatores contribuem ainda para a crescente aplicabilidade das técnicas de biologia molecular, nomeadamente o facto de apenas uma pequena quantidade de amostra ser necessária para realizar as análises e de o ADN ser estável e poder ser armazenado durante um longo período de tempo (entre 3 a 5 anos), desde que nas condições apropriadas. Assim, a análise de ADN fornece ferramentas fundamentais na deteção inequívoca de adulterantes biológicos e identificação de espécies intimamente relacionadas.

Os métodos baseados na amplificação de ADN para a deteção de adulterantes e autenticação de materiais botânicos incluem o uso de *primers* para sequências arbitrárias, tal como nas técnicas de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) e *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP). Outras técnicas utilizadas incluem a análise de polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP), a qual se baseia na digestão de ADN genómico com enzimas de restrição, e o uso de *primers* específicos, tais como *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR), sequências simples repetitivas (*Simple Sequence Repeats* - SSR) ou microssatélites, *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), PCR em tempo real e PCR-sequenciação.

A maioria dos métodos com alvo em marcadores de ADN baseia-se na reação da cadeia em polimerase (PCR) e requerem apenas algumas cópias de ADN para análise. A sequenciação de ADN e, mais recentemente, *DNA barcoding* são outras abordagens também utilizadas na análise de ADN com aplicação na identificação de plantas em suplementos alimentares (Galimberti et al., 2013; Newmaster et al., 2013; Techen et al., 2014; Wallace et al., 2012; Zuo et al., 2011).

4.3.1 PCR convencional

A técnica de PCR convencional é fundamentalmente um mecanismo de replicação *in-vitro* de ADN, por forma a amplificar sequências específicas, consideradas como alvo,

de um determinado material genético. A PCR envolve a mistura de ADN alvo numa solução contendo uma polimerase de ADN termoestável, cloreto de magnésio, solução tampão, desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP) e oligonucleótidos iniciadores (*primers*). A enzima mais frequentemente utilizada é obtida a partir da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, sendo por isso denominada por *Taq* polimerase. A fidelidade da enzima depende em larga escala do pH da solução e da concentração de Mg^{2+} e dNTP utilizadas (Terpe, 2013). A especificidade da amplificação por PCR é conferida pela presença de oligonucleótidos iniciadores da reação (*primers*) que se ligam de forma a flaquarem a sequência alvo. OS *primers* deverão ser desenhados de forma a garantir a inexistência da formação de *hairpins* ou dímeros, que pode ocorrer quando os são complementares entre si ou consigo próprios, a inexistência de mais do que 2 citosinas e guaninas nos últimos 5 nucleótidos da extremidade 3' e, por último, garantir que a temperatura de *melting* deve ser similar para o par de *primers* (McPherson e Simon, 2006).

A amplificação por PCR envolve três etapas realizadas a temperaturas diferentes, nomeadamente desnaturação, hibridação e extensão, as quais em conjunto compreendem um ciclo de amplificação. Dependendo da quantidade de ADN alvo inicial, os ciclos podem ser repetidos entre 25 a 45 vezes, permitindo o aumento exponencial das sequências ao longo da reação da PCR. No final da PCR, os fragmentos amplificados são analisados por eletroforese em gel, por forma a verificar o tamanho dos fragmentos obtidos (Mafra et al., 2008). O processo da reação de PCR encontra-se esquematizado na Figura 1.

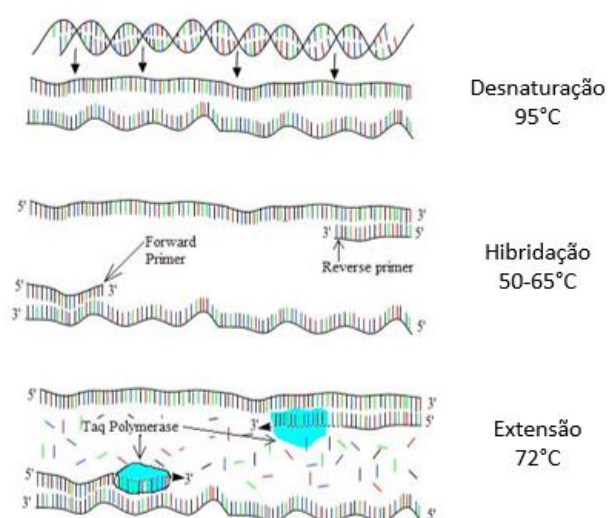


Figura 1: Representação das etapas da reação em cadeia da polimerase (PCR). Adaptado de https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Polymerase_Chain_Reaction/How_PCR_is_Performed.

A PCR é uma técnica simples, sensível e específica, contudo apresenta algumas limitações como por exemplo a necessidade do conhecimento prévio da sequência de ADN, por forma a permitir o desenho de *primers* específicos (Mafra et al., 2008).

4.3.2 RAPD e SCAR

A técnica RAPD baseia-se na identificação de polimorfismos do ADN através da amplificação por PCR de múltiplas regiões do genoma, utilizando um único *primer* de pequeno tamanho (geralmente com 10 bases), de sequência arbitrária e com conteúdo mínimo de 50% guanina-citosina (Sucher & Carles, 2008; Trindade, 2010). Os produtos amplificados são perfis de fragmentos, de tamanhos geralmente entre 100-2000 pares de bases, detetados através de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (Figura 2) (Kumar et al., 2009; Yip et al., 2007).

As condições de amplificação usadas, nomeadamente uma baixa temperatura de hibridação, potenciam a ligação do *primer* a um elevado número de locais distribuídos por todo o ADN genómico, mesmo que as sequências não sejam totalmente complementares (Yip et al., 2007). Os polimorfismos detetados através da técnica de RAPD, visualizados como presença ou ausência de determinados fragmentos, podem também estar relacionados com deleções/inserções, inversões ou substituições no sítio de hibridação do *primer*. Assim, em alguns casos, a alteração de uma única base no ADN pode ser suficiente para separar o local de ligação do *primer*, originando uma sequência de amplificação de tamanho diferente, ou até mesmo evitando que a sua amplificação (Williams et al., 1990).

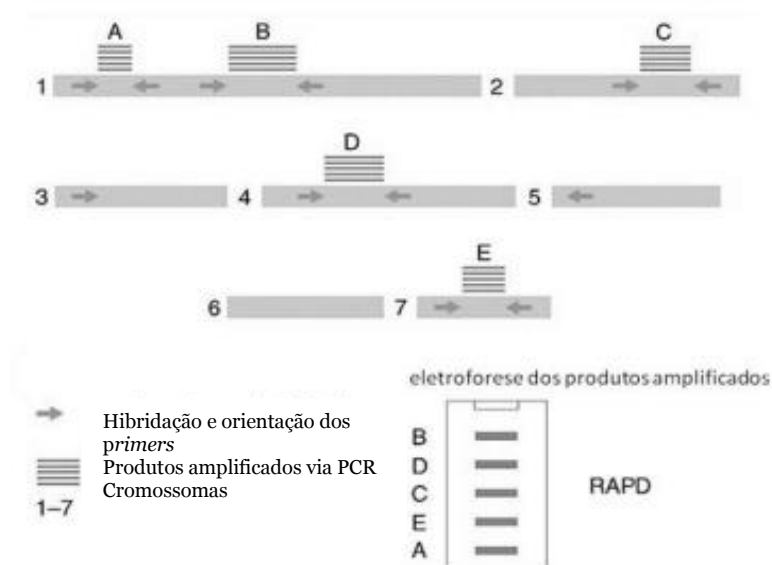


Figura 2: Representação esquemática da metodologia RAPD em que a reação em cadeia da polimerase (PCR) é realizada com um único primer decâmico, originando a amplificação de diversas regiões do genoma (Kumar & Gurusubramanian, 2011).

Devido à sua simplicidade, rapidez, baixo custo e ao facto de não necessitar de elevadas quantidades de ADN, nem do conhecimento prévio do genoma ou sequências a analisar, a técnica RAPD tornou-se amplamente utilizada em diferentes organismos. Para além disso, fornece um número ilimitado de marcadores em todo o genoma, permitindo revelar um elevado nível de polimorfismos intra- e interespécies em casos que tenham mostrado um baixo polimorfismo usando outros marcadores (Kumar et al., 2009; Sucher & Carles, 2008; Trindade, 2010). No entanto, esta técnica apresenta uma baixa reprodutibilidade, requerendo um grande cuidado com as condições de reação e com eventuais contaminações, bem como o uso de extratos de ADN de elevada pureza e peso molecular (Kumar & Gurusubramanian, 2011).

A técnica de RAPD tem sido bastante utilizada na deteção de adulterantes de plantas, devido ao seu baixo custo de operação e à capacidade para discriminar diferentes espécies botânicas (Dhanya & Sasikumar, 2010). Contudo é considerada uma técnica pouco adequada para a deteção de uma dada espécie em misturas complexas, ou em matrizes muito processadas.

As sequências obtidas por RAPD podem ainda ser usadas para desenhar oligonucleótidos específicos usados em análises SCAR (Yip et al., 2007), as quais se baseiam na amplificação de fragmentos de ADN por PCR usando *primers* especificamente desenhados a partir de sequências nucleotídicas selecionadas e sequenciadas de um perfil de RAPD. Após amplificação por PCR utilizando marcadores SCAR, os fragmentos obtidos são analisados por eletroforeses em gel de agarose (Liang et al., 2011). A Figura 3 apresenta de forma esquemática o desenvolvimento de marcadores SCAR, no qual os fragmentos RAPD de interesse são excisados do gel, purificados e sequenciados, e a partir da sua sequência são desenhados *primers* específicos (Talebi et al., 2012). A técnica SCAR é considerada como sendo rápida, de fácil execução e para além disso apresenta uma maior reprodutibilidade em comparação com RAPD para cada *locus* específico. Tem ainda a vantagem de necessitar apenas de pequenas quantidades de ADN alvo (10-100 ng por reação). A principal desvantagem reside na necessidade de ter informação prévia da sequência a amplificar. Esta técnica tem-se revelado útil na deteção e diferenciação de produtos medicinais à base de plantas, uma vez que a conversão de perfis RAPD em marcadores específicos SCAR torna o processo de deteção de potenciais adulterantes de amostras comerciais num método mais fácil, sensível e específico (Liang et al., 2011).

4.3.3 SSR e ISSR

Microsatélites, ou marcadores SSR, baseiam-se em repetições em *tandem* de sequências simples (Figura 4), as quais consistem em dois, três ou quatro nucleótidos que se podem repetir 10-100 vezes e, que por sua vez, estão espalhados pelo genoma

(incluindo regiões codificantes e não codificantes) da maior parte das espécies eucariotas (Morgante et al., 2002). Se as sequências nucleotídicas das regiões que flanqueiam os microssatélites forem conhecidas, torna-se possível desenhar *primers* específicos (normalmente com 20-25 pb) de modo a amplificar os microssatélites por PCR (Spooner et al., 2005).

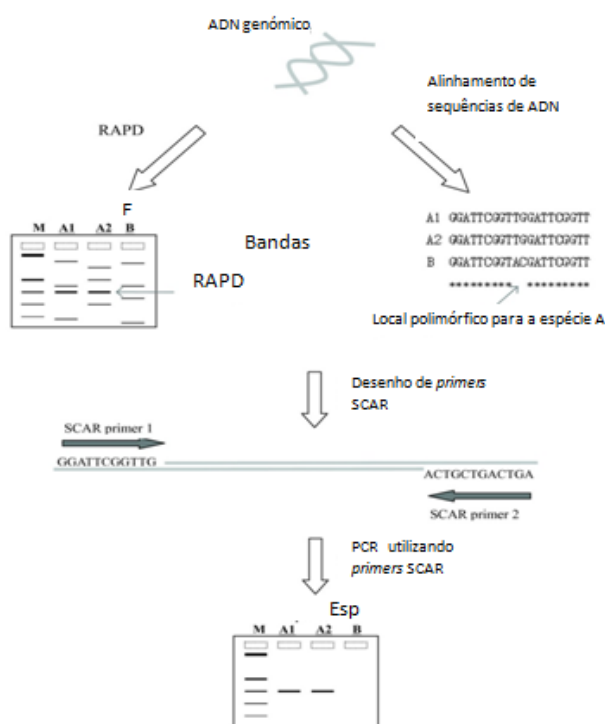


Figura 3: Representação esquemática do desenvolvimento de um marcador SCAR para a identificação da espécie (A). Nesta metodologia, os primers SCAR foram desenhados a partir do perfil obtido por RAPD de todo o genoma. A banda polimórfica de interesse é excisada do gel de agarose e depois sequenciada. Com base na informação obtida, é desenvolvido um marcador SCAR específico para a espécie (A) (Shaw et al., 2009).

As principais vantagens desta técnica baseiam-se na elevada abundância de microssatélites em genomas eucariotas, na sua elevada variabilidade e distribuição aleatória. Acresce ainda a grande reprodutibilidade associada a esta técnica e o facto de não requerer ADN de qualidade e quantidade elevadas (Spooner et al., 2005). Contudo, a análise de microssatélites apresenta algumas desvantagens, uma vez que se limitam a analisar regiões repetitivas, contrariamente a outras técnicas como RAPD e RFLP, que permitem analisar todo o genoma. Adicionalmente, esta técnica tem a desvantagem de necessitar de um elevado investimento inicial de tempo e recursos para o desenvolvimento destes marcadores (Rassmann et al., 1991).

As sequências de microssatélites são frequentemente aplicadas na distinção de génotipos relacionados, uma vez que as variações de tamanho dos *loci* SSR são muito mais frequentes do que em regiões não repetitivas, permitindo a distinção entre espécies do

mesmo género, bem como entre variedades ou até mesmo entre indivíduos. Por este motivo, são muito utilizadas em estudos de populações e na identificação de cultivares estritamente relacionadas, sendo, no caso das plantas, bastante úteis na distinção entre indivíduos (Kumar et al., 2009; Trindade, 2010).

A técnica de ISSR, tal como SSR, baseia-se em regiões microssatélite, isto é, em regiões repetitivas do genoma (Figura 4), contendo pequenas sequências de 2 a 8 nucleótidos que se repetem em *tandem* (ex: ATGATGATGATG) e que se encontram abundantemente distribuídas pela maioria dos genomas nucleares eucarióticos (Yip et al., 2007). Os ISSR são fragmentos de ADN com cerca de 100 a 3000 pb localizados entre regiões microssatélite adjacentes e orientadas em oposição (Spooner et al., 2005). Enquanto os *primers* usados em SSR são complementares a sequências que flanqueiam os microssatélites, amplificando por isso os próprios microssatélites, em ISSR, um único *primer* composto por uma sequência do microssatélite, usualmente de 16-25pb, é utilizado para amplificação por PCR de fragmentos de ADN localizados entre as sequências repetitivas (Figura 4) (Kumar et al., 2009; Trindade, 2010). Desta forma, são gerados simultaneamente cerca de 10-60 fragmentos a partir de múltiplos *loci*, os quais podem depois ser separados por eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida (Liu & Wendel, 2001; Spooner et al., 2005).

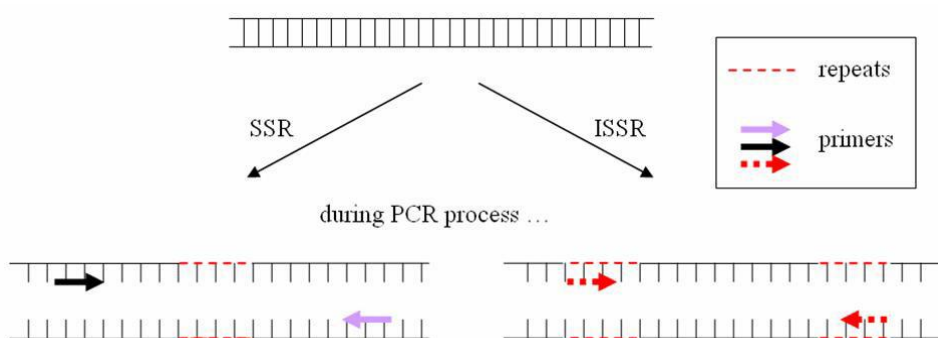


Figura 4: Diferenças entre as técnicas SSR e ISSR, em que SSR utiliza primers destinados a amplificar uma única região repetitiva, enquanto ISSR utiliza um único primer contendo repetições por forma a amplificar regiões entre duas repetições (Yip et al., 2007).

A técnica ISSR fornece resultados altamente reprodutíveis e gera diversos polimorfismos em muitos sistemas. Uma das suas grandes vantagens consiste na distribuição universal dos microssatélites, permitindo que esta técnica seja aplicada a todos os organismos. É ainda um método simples e rápido que combina a universalidade da técnica RAPD com a maior parte das vantagens dos microssatélites (SSR) e AFLP (Trindade, 2010). No entanto, enquanto outras técnicas como RFLP e RAPD permitem

analisar todo o genoma, ISSR, à semelhança de SSR, é mais restritiva por se limitar a regiões ricas em microssatélites.

4.3.4 AFLP

A técnica AFLP é de sequência arbitrária e de *DNA fingerprint* que deteta fragmentos de restrição amplificados por PCR depois da digestão do ADN genómico por endonucleases de restrição. Nesta técnica, fragmentos de ADN genómico (80-500 pb) obtidos da digestão com enzimas de restrição, são ligados a adaptadores de cadeia dupla (oligonucleótidos específicos), complementares aos locais de restrição dos produtos de digestão, seguindo-se uma amplificação seletiva por PCR utilizando *primers* específicos complementares à sequência do adaptador e do local de restrição (Phillips & Vasil, 2001; Vos et al., 1995). 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). Os polimorfismos são detetados através das diferenças no comprimento dos fragmentos amplificados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), por eletroforese capilar ou por metodologias autorradiográficas ou de fluorescência.

Esta técnica tem sido utilizada de forma crescente em análises *fingerprinting*, mapeamento genético localizado e construção de mapas genéticos, principalmente em espécies de plantas cultivadas que apresentam uma baixa taxa de polimorfismo de ADN (Zabeu, 1993). Apresenta quatro etapas principais: (i) o ADN genómico total do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição; (ii) os adaptadores específicos ligam-se aos terminais dos fragmentos genómicos gerados pela clivagem; (iii) uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR, utilizando *primers* especificamente desenhados para reconhecer sequências nos adaptadores; (iv) a subpopulação de fragmentos amplificados é separada em eletroforese de elevada resolução.

A vantagem que mais se destaca das demais técnicas de *DNA fingerprinting* está associada ao grande número de fragmentos que são gerados e resolvidos num único gel, sendo o número de marcadores simultaneamente analisados num único gel considerado como sendo o mais elevado entre as tecnologias disponíveis. Adicionalmente, não necessita da informação da sequência para o desenho de *primers*, e fornece um grande número de marcadores polimórficos numa única reação (Kumar et al., 2009; Loh et al., 1999; Trindade, 2010). Comparativamente com a técnica RAPD, AFLP apresenta maior robustez essencialmente devido ao facto de serem usados *primers* mais longos, o que aumenta significativamente a especificidade da amplificação por PCR e para além disso é mais reprodutível (Cara *et al.*, 2014; Kulkarni *et al.*, 2014). A técnica AFLP reúne,

portanto, a vantagem da PCR específica com a vantagem de RAPD, em que se exploram sequências arbitrárias (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Vos et al., 1995). De forma análoga aos marcadores RAPD, a principal limitação da técnica de AFLP reside no baixo conteúdo de informação genética por *locus*. De salientar ainda que a digestão parcial ou a má qualidade do ADN poderão levar a interpretações equivocadas relativamente aos polimorfismos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). É ainda considerado um método dispendioso, moroso e tecnicamente desafiante (Techen *et al.*, 2014).

4.3.5 PCR em tempo real

A PCR em tempo real surgiu como forma de ultrapassar a dificuldade em obter informação quantitativa através da técnica de PCR convencional. Nesta última, a análise de resultados é efetuada apenas no fim da reação, ou seja, no final da fase exponencial, em que a quantidade do produto final amplificado já não é diretamente proporcional à quantidade de ADN inicial. Em contrapartida, a PCR em tempo real é considerada um processo quantitativo, pois permite obter dados no início da fase exponencial de amplificação que, nesta etapa, são diretamente proporcionais à quantidade de ADN inicial na reação (Brookes, 1999). O procedimento segue o princípio geral da PCR diferindo essencialmente na possibilidade de monitorizar, em cada ciclo de amplificação, uma ou mais sequências específicas de ADN amplificado, permitindo desta forma a sua quantificação (Garcia-Canas et al., 2004).

A técnica de PCR em tempo real é amplamente aceite como sendo robusta, com elevada sensibilidade, especificidade e maior gama de deteção comparativamente à PCR convencional (Rodriguez-Lazaro & Hernandez, 2013). Esta técnica possibilita a utilização de sequências de ADN alvo mais pequenas (60 a 70 pb) e, dependendo da sequência e/ou da matriz testada, permite detetar quantidades de ADN ≤ 10 pg, sendo por isso útil no estudo de amostras com elevado grau de processamento. Não necessitando de eletroforese em gel de agarose, apresenta ainda menor risco de contaminação e diminui o tempo de análise (Rodriguez-Lazaro & Hernandez, 2013; Rojas et al., 2012). A deteção dos produtos da PCR é efetuada através da medição contínua de um sinal de fluorescência correlacionado diretamente com a quantidade de produto amplificado à medida que a reação ocorre. A medição do sinal de fluorescência permite efetuar a representação gráfica semilogarítmica, que se traduz no aumento do sinal em função do número de ciclos, ao longo de três fases: fase inicial, fase exponencial (ou fase log) e a fase plateau (Figura 5).

Na fase inicial, não é detetado produto, uma vez que o sinal de fluorescência está abaixo do limite de deteção do aparelho (Smith & Osborn, 2009). A partir de um determinado número de ciclos atinge-se uma fase de crescimento exponencial, ou fase *log*, em que a eficiência da reação é próxima de 100% e a quantidade de produto duplica em

cada ciclo. Na fase exponencial ocorre um aumento acentuado de fluorescência, proporcional à quantidade de ADN que está a ser amplificado, sendo por isso considerada a melhor fase para se estudar a reação devido à elevada eficiência registada. Assim, durante a fase exponencial a quantidade de ADN pode ser determinada recorrendo ao parâmetro Ct (*Cycle threshold*) (Smith & Osborn, 2009). O número de ciclos necessários para a produção de sinal de fluorescência estatisticamente acima do nível de ruído de fundo do aparelho corresponde ao valor de Ct, sendo que este valor está inversamente relacionado com a concentração inicial de ADN alvo, isto é, quanto maior a concentração inicial de ADN na amostra, mais cedo o Ct é atingido. Com o aumento da concentração de produto, o nível de eficiência da amplificação pode eventualmente começar a diminuir, entrando a reação entra na fase plateau, em que há muito pouco ou nenhum aumento do nível de fluorescência devido à diminuição dos reagentes disponíveis para a reação e à perda de atividade da enzima (Butler, 2005; Smith & Osborn, 2009).

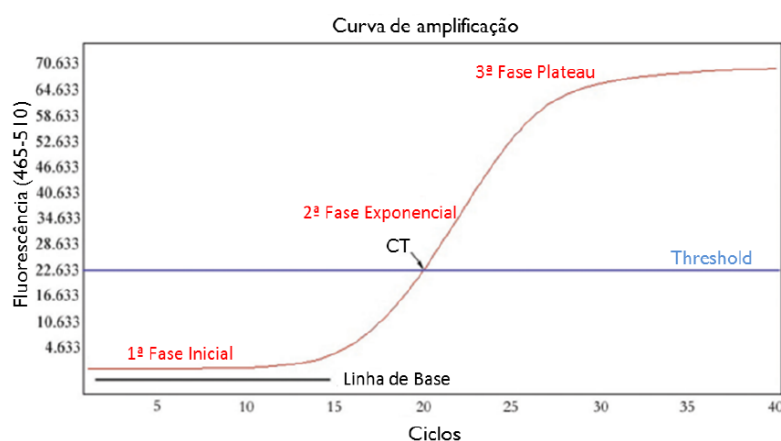


Figura 5: Curva de amplificação obtida por PCR em tempo real, demonstrando as diferentes fases da reação (adaptado de Rodriguez-Lazaro & Hernandez, 2013).

Atualmente, existem dois formatos para correlacionar a quantidade dos produtos da PCR com o sinal de fluorescência: a utilização de sondas de ADN de sequência específica marcadas com um elemento fluorescente (fluoróforo) e corantes fluorescentes não específicos que se intercalam em qualquer cadeia dupla de ADN (Fajardo et al., 2008; Kesmen et al., 2009; Levin, 2005; Pelt-Verkuil et al., 2008). As sondas mais utilizadas são as de hidrólise do tipo TaqMan™, ao passo que o SYBR Green I é o corante universal mais comum. Relativamente às sondas, os corantes têm a vantagem de não serem tão dispendiosos (Levin, 2005). A utilização do corante SYBR Green I é a forma mais simples e direta de efetuar a PCR em tempo real. Este corante, que quando ligado apresenta uma fluorescência cerca de 1000 vezes superior à do corante livre, intercala-se na cadeia dupla de ADN durante a extensão dos *primers*, emitindo fluorescência a cada ciclo de extensão

(Figura 6) (Levin, 2005). No fim da fase de extensão de cada ciclo, a fluorescência é monitorizada e quantificada, permitindo assim determinar a concentração de ADN.

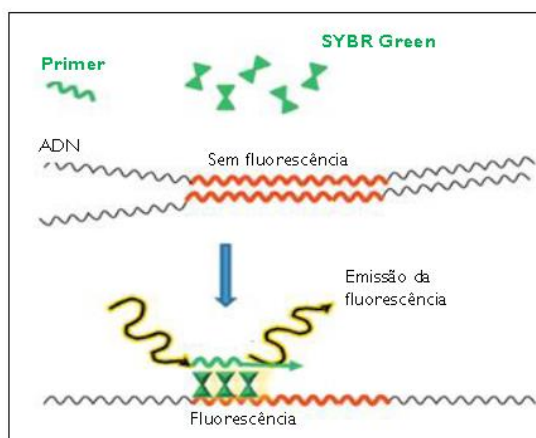


Figura 6: Princípio de detecção utilizando o corante SYBR Green I (adaptado de Rodriguez-Lazaro & Hernandez, 2013).

Devido à ligação do corante a qualquer cadeia dupla, a escolha dos *primers* é crítica para não levar à formação de produtos não específicos, como dímeros de *primers*, que iriam contribuir para o sinal, alterando o resultado da quantificação. Deve-se ainda realizar uma análise dos produtos amplificados através da curva de desnaturação, a qual permite avaliar a especificidade dos produtos obtidos com base no cálculo da temperatura de *melting* (T_m) do fragmento alvo. A T_m de cada produto de amplificação depende do seu conteúdo em guanina e citosina (G+C), comprimento e características da sequência, permitindo distinguir diferentes produtos da PCR.

A tecnologia SYBR® Green apresenta como principais vantagens a grande sensibilidade, o custo reduzido e a facilidade de manuseamento. Em contrapartida, apresenta como principal desvantagem a possibilidade de ligação a todo o ADN de cadeia dupla, incluindo produtos não específicos, e o facto de poder inibir a PCR se usado em concentrações relativamente elevadas (Zhang et al., 2007). Por este motivo, mais recentemente, surgiram como alternativas os corantes de nova geração. Estes corantes, dos quais se destacam o EvaGreen®, apresentam uma fluorescência melhorada, podendo ser utilizados em maior quantidade na reação sem provocar a sua inibição (Figura 7) (Zhang et al., 2007).

Recentemente, diversos estudos têm descrito a utilização da técnica de PCR acoplada à análise HRM (*High Resolution Melting*). Esta trata-se de uma abordagem pós-PCR que consiste na caracterização de amostras de ADN de acordo com o seu comportamento de dissociação durante a transição de ADN de dupla cadeia para ADN de cadeia simples, recorrendo a corantes fluorescentes e de nova geração que, juntamente

com equipamentos de maior resolução, permitem determinar a T_m com elevado poder de resolução. Nesta técnica, a análise dos dados é feita com um *software* específico que permite identificar diferenças a nível da composição de bases do ADN (Herrmann et al., 2007; Krypuy et al., 2006; Reed & Wittwer, 2004). Deste modo, a simples alteração de um nucleótido pode ser suficiente para distinguir duas sequências nucleotídicas aparentemente iguais (Figura8). Esta nova ferramenta tem sido amplamente utilizada nas mais variadas áreas da biologia molecular, tais como genotipagem, ou avaliação de mutações genéticas (doenças genéticas). Mais recentemente, tem sido aplicada com muito sucesso na identificação e quantificação de adulterantes em alimentos processados, na diferenciação de espécies/cultivares e na deteção de alergénios (Costa et al., 2015a; Costa et al., 2016; Zhang et al., 2007).

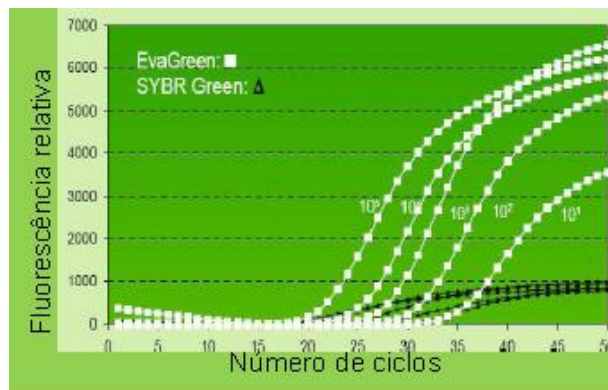


Figura 7: Cinética de PCR em tempo real com os corantes SYBR® Green e EvaGreen® (Adaptado de <http://www.gencompare.com/qpcr.htm>).

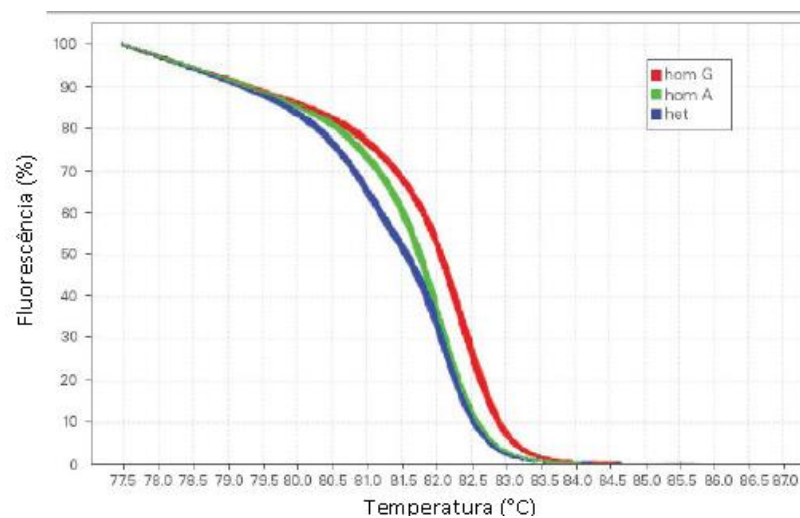


Figura 8: Curva HRM, demonstrando um decréscimo na fluorescência quando ocorre a passagem da estrutura de ADN em cadeia dupla para cadeia simples. Vermelho: homozigótico com guanina; verde: homozigótico com adenina; azul: heterozigótico (Adaptado de <http://hrm.gene-quantification.info/>).

Os métodos de PCR em tempo real com a utilização de sondas específicas para o fragmento alvo aumentam significativamente a especificidade da reação. A sonda TaqMan consiste num oligonucleótido que contém simultaneamente um fluoróforo na extremidade 5' e um elemento anulador (*quencher*) na extremidade 3', que anula esta emissão quando está perto do fluoróforo (Pelt-Verkuilet al., 2008). Durante a fase de extensão, através da atividade exonucleásica da *Taq* polimerase, ocorre a separação física do fluoróforo e do anulador, sendo possível detetar um aumento da intensidade da fluorescência (Espy et al., 2006; Kesmen et al., 2009) (Figura 9). Assim, a acumulação de produtos amplificados ao longo de cada ciclo leva a um aumento proporcional da fluorescência (Espy et al., 2006).

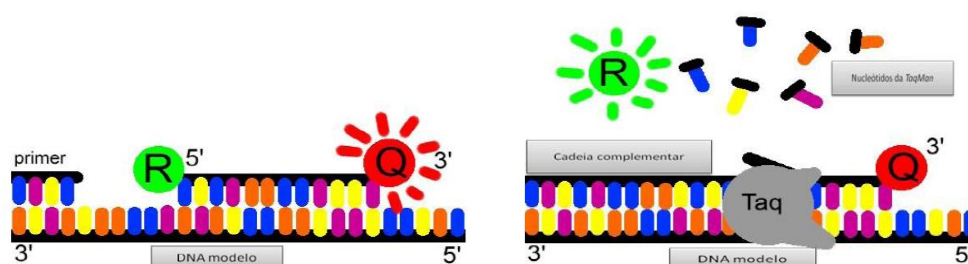


Figura 9: Mecanismo de ação da sonda TaqMan®. R: fluoróforo (emite fluorescência), Q: *Quencher* (absorve fluorescência da sonda intacta). (adaptado de <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimepcr.htm>)

A amplificação da sequência de interesse pode então ser medida pelo aumento da libertação de fluoróforos e da emissão de fluorescência que ocorre em cada ciclo de PCR. No caso da análise de fluorescência por sondas, não é necessária a criação de uma curva de desnaturação, dado que a especificidade da sonda assegura que a fluorescência medida se deve apenas à amplificação da sequência de interesse. A utilização de sondas apresenta como vantagem uma maior especificidade do método, sendo contudo uma estratégia mais dispendiosa e complexa por requerer o desenho adequado da sonda e otimização das condições de amplificação (Espy et al., 2006).

Quer pela utilização de sondas ou de corantes específicos, a técnica da PCR em tempo real permite a quantificação do ADN, de forma absoluta ou relativa. Na quantificação absoluta determina-se o número exato de moléculas (número de cópias de ADN), sendo esta realizada a partir da amplificação de um conjunto de diluições de uma solução conhecida de ADN, que permite o traçado da curva de calibração. Para tal, o valor de Ct da amostra é interpolado numa curva de calibração, em que os valores de Ct obtidos nas diferentes diluições do padrão se encontram em função do logaritmo da concentração de ADN (Mohamad et al., 2013; Pelt-Verkuil et al., 2008). Para a quantificação relativa de ADN, pode-se recorrer a dois métodos diferentes: o método da dupla curva de calibração e o método da comparação do limiar da fase exponencial (método do ΔCt) (Pelt-Verkuil et

al., 2008). O primeiro utiliza duas curvas de calibração, uma para a sequência de interesse e outra para um gene de referência, sendo as quantidades absolutas de ADN alvo e de ADN de referência determinadas por interpolação dos valores de Ct nas respetivas curvas (Butler, 2005). No método do ΔCt , usam-se padrões com concentrações conhecidas e compara-se a amplificação relativa da sequência alvo com a amplificação da sequência do gene de referência. O resultado traduz-se numa curva de valores de ΔCt ($\Delta Ct = Ct$ gene de referência – Ct gene alvo) em função do logaritmo da quantidade de ADN a analisar. A quantidade de ADN presente na amostra é obtida por interpolação do valor de ΔCt da amostra com a curva padrão (Butler, 2005).

Um parâmetro importante que deve ser calculado em PCR em tempo real é a eficiência de amplificação, uma vez que há mecanismos interferentes cujo resultado se traduz na redução da eficiência, sendo um deles a inibição da atividade da *Taq* polimerase. Este parâmetro pode ser calculado a partir do declive da curva de calibração, pela seguinte expressão:

$$E (\%) = 10^{\left(-\frac{1}{\text{declive}}\right)} - 1$$

sendo um declive de -3,32 correspondente a uma eficiência de 100% (Pelt-Verkuil et al., 2008).

A técnica de PCR em tempo real, pelas suas características, permite detetar e determinar quantidades mínimas de diferentes espécies em produtos de composição complexa, pelo que tem sido considerada como uma ferramenta promissora para a autenticação de suplementos alimentares (Costa et al., 2015b; Costa et al., 2016).

4.3.6 Sequenciação de ADN

A sequenciação é uma técnica que permite determinar a ordem das bases nucleotídicas ao longo da cadeia de ADN, possibilitando uma análise completa da molécula, uma vez que fornece a sequência exata de bases num segmento de ADN. A técnica de PCR seguida de sequenciação envolve a determinação da sequência nucleotídica dentro de um fragmento de ADN amplificado por PCR, usando *primers* específicos para um determinado local genómico (Zhang et al., 2007).

O método de Sanger é o mais popular, e consiste na formação de fragmentos de ADN cujos comprimentos dependem da última base adicionada. Para isso, a reação é feita em quatro tubos, separadamente, para que ocorra a reação de terminação. Cada um dos tubos contém os componentes essenciais para a amplificação de PCR e um dos quatro didesoxirribonucleótidos trifosfatados (ddNTP) marcados com fluorescência de modo a identificar a nova cadeia (Robarts & Wolfe, 2014). Os ddNTP estão desprovidos do grupo OH na posição 3' da desoxirribose, impedindo a síntese de ADN após a sua adição, uma vez que não ocorre a ligação fosfodiéster. Os diferentes fragmentos sintetizados nas quatro

misturas reacionais são separados de acordo com a sua dimensão por eletroforese em gel de poliacrilamida e analisados por autorradiografia (Kumar et al., 2009). Recentemente, a deteção da ordem dos nucleótidos pode ainda ser feita de uma forma mais automática e precisa recorrendo-se à marcação de cada ddNTP com corantes fluorescentes específicos e diferentes para cada um. Desta forma, as reações podem ser feitas no mesmo tubo, sendo os resultados finais apresentados na forma de eletroferograma.

O recurso à análise por sequenciação tem como vantagem a elevada reprodutibilidade da técnica, a necessidade de uma quantidade reduzida de ADN por reação quando este é amplificado por PCR, e o facto da maior parte do processo ser passível de automatização (Spooner et al., 2005). Esta técnica proporciona a análise da variação genética entre indivíduos, para além de possibilitar a sequenciação do genoma cloroplastidial, mitocondrial e ribossomal. Por outro lado, após obtenção da informação proveniente da sequenciação, a identidade das espécies poder ser pesquisada inserindo a sequência em bases de dados públicas como o GenBank. No entanto, a PCR-sequenciação tem como desvantagem a cobertura de um baixo nível do genoma. Para além disso, é necessário proceder ao desenho de novos *primers* para a amplificação da região de interesse, o que implica ter um conhecimento prévio da sequência dessa região.

A sequenciação de ADN tem-se revelado uma ferramenta extremamente útil em áreas como a taxonomia, os estudos de relações filogenéticas e de genética populacional ou os estudos evolutivos (Zhang et al., 2007). Atualmente, a sequenciação tem também sido uma das técnicas mais usadas na identificação e avaliação da autenticidade de plantas medicinais (Hebert et al., 2003; Jia & Zhao, 2009).

4.3.7 DNA barcoding

DNA barcoding designa um novo sistema de identificação de amostras biológicas utilizando sequências de ADN curtas, quer de genomas nucleares ou de organelos (Techen et al., 2014). Esta abordagem, proposta pela primeira vez por Paul Hebert, em 2003 (Techen et al., 2014), é baseada na análise da variabilidade de pequenas regiões específicas denominadas de *DNA barcode*, permitindo assim, identificar e distinguir um organismo de outros geneticamente relacionados. Um *DNA barcode* ideal deveria obedecer a duas características fundamentais: universalidade (elevada cobertura taxonómica) e elevada resolução. Assim, como princípio geral, uma região de *DNA barcode* deve apresentar uma elevada variabilidade interespecífica e baixa variabilidade intraespecífica (Galimberti et al., 2013).

Esta abordagem tem a vantagem de combinar três importantes aspetos: a molecularização dos processos de identificação, a padronização do procedimento e a informatização (Galimberti et al., 2013). No entanto, a principal vantagem reside na

disponibilidade da informação através de uma plataforma de identificação universal, criada pelo consórcio CBOL (Consortium for the Barcode of Life), que pretende estabelecer métodos de amostragem e protocolos baseados no uso de *DNA barcodes*–iBOL (International Barcode of Life). Hebert et al. (2003) sugeriu a utilização da extremidade 5' do gene mitocondrial do citocromo c oxidase subunidade I (*cox1*, também conhecido por COI) como região de *DNA barcode* padrão para o sistema de identificação no reino animal. Este gene apresenta vantagens que permitem a sua utilização na generalidade dos animais superiores, nomeadamente o facto de ter um elevado poder de discriminação, de existirem *primers* universais robustos para a amplificação desta sequência e da sua taxa de evolução ser suficientemente rápida para permitir a discriminação, não só de espécies próximas, mas também de grupos intraespecíficos (Hollingsworth et al., 2011). No entanto, em plantas terrestres, os genes mitocondriais apresentam uma evolução mais lenta e têm taxas de substituição mais baixas, o que os torna inadequados para *DNA barcoding* (Mower et al., 2007; Techen et al., 2014). Não sendo este gene considerado como um *barcode* adequado nas plantas, a pesquisa de um análogo do gene *cox1* em plantas terrestres centrou-se no genoma cloroplastidial e nuclear. Após a realização de diversos estudos *in-silico* e experimentais para avaliação de diferentes *loci* cloroplastidiais e nucleares, concluiu-se não existir nenhum *locus* que possa individualmente ser usado como *barcode* de plantas, sendo necessário recorrer a uma alternativa multi-*loci* (Jiang et al., 2003; Techen et al., 2014; Wang et al., 2006).

Desta forma, foram avaliadas sete regiões pelo CBOL, tendo sido proposta a utilização da combinação de duas regiões codificantes plastidiais, *rbcL+matK*, como *barcodes* de plantas. Contudo, estes podem ser complementados com marcadores adicionais, como proposto, por exemplo, pelo grupo *China Plant Barcode for Life*, que sugeriu a adição da região nuclear *Internal Transcribed Space* (ITS) (Techen et al., 2014). O gene *matK* foi escolhido por ser uma das regiões codificantes do genoma plastidial que mais rapidamente evolui (Hilu & Liang, 1997), sendo, nas plantas, o análogo mais próximo para o *barcode* COI, apresentando ainda alta resolução. Infelizmente, o gene pode ser de difícil amplificação por não ser flanqueado por sequências conservadas, apresentando assim baixa universalidade (Techen et al., 2014). A região *rbcL*, por outro lado, é fácil de amplificar e sequenciar, mas tem um poder de discriminação relativamente baixo (baixa resolução) (Hollingsworth et al., 2011).

No entanto, refira-se que, face à dificuldade sentida na determinação de um *barcode* universal para plantas, têm sido efetuados numerosos estudos. Na literatura encontram-se reportadas um total de 17 regiões estudadas como potenciais *DNA barcode* de plantas medicinais, incluindo *matK*, *rbcL*, ITS, ITS2, *psbA-trnH*, *atpF-atpH*, *yef5*, *psbK-I*, *psbM trnD*, *rps16*, *coxI*, *nad1*, *trnL-F*, *rpoB* e *rpoC1* (Techen et al., 2014). Destas,

a região ITS do ADN ribossomal nuclear (18S-5.8S-26S) tem sido a mais utilizada como *DNA barcode* em trabalhos de autenticação e sistemática molecular de plantas (China Plant BOL Group et al., 2011; Hollingsworth et al., 2011). Das diferentes razões para o seu uso alargado destacam-se a disponibilidade de vários conjuntos de *primers* universais para uma grande diversidade de grupos taxonómicos, o facto desta região evoluir rapidamente e, portanto, ter uma elevada variabilidade, fornecendo frequentemente marcadores moleculares bastante adequados para estudos evolutivos a nível das espécies. Acresce ainda o facto de existirem mais de 100 cópias de genes ARNr numa célula, o que permite uma fácil amplificação desta região (Babaei et al., 2014; Feliner & Rosselló, 2007) e o elevado grau de variabilidade mesmo em espécies geneticamente relacionadas (Kress et al., 2005). No entanto, esta região tem problemas que não permitem que seja um dos principais *barcodes* em plantas, nomeadamente a existência de cópias diferentes entre indivíduos e a interferência provocada por contaminações com fungos (Alvarez & Wendel, 2003). Contudo, de entre as regiões nucleares, o ITS é uma das possíveis escolhas para *barcode* suplementar.

5 Plantas utilizadas em suplementos alimentares para emagrecimento

O uso de plantas medicinais para o tratamento e prevenção de inúmeras doenças é uma das práticas mais antigas. São várias as plantas que podem ser utilizadas com a finalidade de emagrecimento, entre as quais se incluem as espécies *Ephedra sinica* (Efedra) e *Citrus aurantium* (Laranja-amarga), pelas suas propriedades termogénicas devido à presença de aminas simpaticomiméticas. No entanto, refira-se que a utilização da primeira em PFS para perda de peso não é permitida atualmente, ao passo que a segunda continua a ser frequentemente usada.

5.1 Ephedra sinica

5.1.1 Descrição e propriedades

A espécie *Ephedra sinica* (Figura 10), também chamada de "Ma huang" em chinês e "Mao" em japonês, tem sido usada na medicina tradicional, sobretudo chinesa (Kitani et al., 2009). O género *Ephedra* contém mais de 50 espécies e pertence à família Ephedraceae. A *E. sinica* é usada na medicina tradicional chinesa há mais de 5000 anos para tratar problemas de asma, infeções respiratórias, constipações, gripes fortes, para aumentar a tensão arterial e, possivelmente, para iniciar a menstruação (Chevallier, 1996).

A *E. sinica* apresenta seis alcaloides oticamente ativos na sua composição: a efedrina (isómero principal) e outros alcaloides que existem em menor quantidade, como a pseudoefedrina, metilefedrina, metilpseudoefedrina, norefedrina e norpseudoefedrina (Schaneberg et al., 2003). A concentração de alcaloides (efedrina e seus derivados) pode variar entre 0,02 a 3,40% nas partes aéreas da planta (Leung & Foster, 1996). O interesse da medicina ocidental na *E. sinica* começou em 1923, com a demonstração de que o alcaloide isolado desta planta, a efedrina, causava uma série de efeitos farmacológicos. A efedrina foi sintetizada em 1927 e, desde então, tanto a efedrina como a pseudoefedrina são usadas em medicamentos sem receita médica.



Figura 10: *Ephedra sinica* (<http://www.itmonline.org/arts/mahuang.htm>).

Os alcaloides de *E. sinica* são semelhantes na sua estrutura química à adrenalina - uma hormona estimulante que é produzida naturalmente pelo corpo. Assim, atuam sobre os mesmos recetores que a adrenalina e têm os mesmos efeitos colaterais e perigos, nomeadamente poderem causar vasoconstricção, dilatação bronquial e excitação cardíaca. Crê-se que a efedrina e o seu diastereoisómero, a pseudoefedrina, são compostos muito estáveis e os responsáveis pela maioria das propriedades da *E. sinica*. A efedrina afeta principalmente os sistemas respiratório e cardiovascular, contraindo os vasos sanguíneos e aumentando os batimentos cardíacos. Para além disso, esta também estimula o sistema nervoso central e simpaticomimético, libertando norepinefrina, estimulando a transpiração e a micção. Assim, apesar da efedrina ser usada principalmente como broncodilatador e descongestionante, ela pode ser incluída em suplementos de perda de peso devido aos seus efeitos estimulantes, que provocam um aumento na taxa metabólica, contribuindo para a perda de peso, mas podendo também originar diversos efeitos secundários graves. Por forma a aumentar os efeitos estimulantes de suplementos contendo plantas, tais como guaraná, café, chá verde, raiz de salgueiro-branco e erva-mate, estes podem eventualmente ser adicionados com *E. sinica* ou efedrina para potencializar os efeitos de emagrecimento do produto.

Para além do uso desta planta na medicina tradicional, ela foi também usada em suplementos dietéticos nos EUA e na Europa (Kitani et al., 2009). No entanto, o consumo indevido e/ou o seu abuso resultou em vários efeitos adversos, incluindo nervosismo, insónia, irritabilidade, psicose, dor de cabeça, tonturas, convulsões, acidente vascular cerebral, hipertensão, enfarte do miocárdio e morte (Boullata & Nace, 2000; Sanzini et al., 2011). Por este motivo, em alguns países, foram criadas regulamentações e/ou proibição

da venda de suplementos dietéticos contendo *E. sinica* ou efedrina (Kitani et al., 2009). A proibição desta nos EUA surgiu em 2004 após ter sido ligada a dezenas de casos de enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral e morte.

5.1.2 Metodologias de identificação

As características morfológicas há muito tempo que têm sido investigadas para identificar e/ou discriminar as plantas de *Ephedra* spp., em particular de *E. sinica*, *E. equisetina* e *E. intermedia* (Guo et al., 2006). No entanto, algumas populações têm sido muito difíceis de identificar porque a morfologia destas plantas é muito simples, mudando facilmente de forma a se adaptarem ao ambiente ao seu redor. Inclusivamente, foi descrita a existência de plantas do género *Ephedra* apresentando características de duas espécies distintas, simultaneamente no mesmo indivíduo (Kitani et al., 2009), o que inviabiliza a sua identificação apenas com base nas características morfológicas. Como alternativa, alguns investigadores tentaram identificar estas plantas com base na sua composição química em alcaloides ou através da utilização de técnicas de biologia molecular. Guo et al. (2006) avaliou a possibilidade de utilizar o gene *chlB*, localizado no genoma cloroplastidial das plantas gimnospérmicas, como marcador molecular para a identificação e discriminação de espécies de *Ephedra*. Este gene foi escolhido pelo facto de apresentar uma taxa evolutiva superior ao gene *rbcL*, o qual tem sido frequentemente sugerido como marcador molecular em análises filogenéticas. Para tal, procedeu à amplificação e sequenciação do gene *chlB* de diferentes amostras de *E. sinica*, *E. equisetina*, *E. przewalskii* e *E. intermedia*. O alinhamento das sequências obtidas permitiu observar diferenças em 10 posições nucleotídicas e distinguir a existência de quatro genótipos distintos. Adicionalmente, foi ainda realizada a sequenciação do gene referido para outras seis espécies, nomeadamente *E. campulopoda*, *E. gerardiana*, *E. minuta*, *E. pachyclada*, *E. procea*, *E. regeriana* and, as quais demonstraram pertencer a genótipos distintos das quatro espécies estudadas. Com base nos dados de sequenciação, os autores concluíram existir um local de restrição no fragmento de *E. sinica* devido à ocorrência de uma citosina na posição nucleotídica 267 do gene *chlB*, a qual não existe nas restantes espécies estudadas por apresentarem uma timina nessa posição. Desta forma, os autores propõem a utilização de PCR-RFLP como uma metodologia expedita e capaz de distinguir as espécies de *Ephedra* analisadas, sem necessidade de recorrer a sequenciação. Contudo, não sendo possível diferenciar *E. intermedia* e *E. przewalskii* com base na sequência do gene *chlB*, Guo et al. (2006) recorreram à análise da região ITS1, permitindo a sua discriminação com base na diferença apresentada no nucleótido na posição 884 desta região. As metodologias desenvolvidas foram posteriormente aplicadas à autenticação de 21 amostras de plantas comercializadas no mercado Chinês como sendo

Ephedra. Com base na sequência do gene *chlB*, 9 das referidas amostras foram identificadas como sendo *E. sinica*, 3 como *E. equisetina* e as restantes como sendo *E. intermedia* ou *E. przewalskii*. Destas últimas, com base na sequência da região ITS, 7 foram classificadas como *E. intermedia* e 2 como *E. przewalskii*.

Com o objetivo de desenvolver marcadores moleculares para detetar a presença de *E. sinica* em mistura de plantas e em suplementos dietéticos, Techen et al. (2006) procedeu à amplificação e sequenciação da região cloroplastidial *psbA-trnH* de 21 amostras de diferentes espécies de *Ephedra* e de 2 amostras de espécies próximas, nomeadamente *Welwitschia mirabilis* e *Gnetum gnemon*. Os resultados obtidos demonstraram que a região amplificada apresentou um tamanho de 555 pb para a espécie *G. gnemon*, de 564 pb para *W. mirabilis*, sendo variável para as espécies de *Ephedra*, nomeadamente de 459 pb para *E. sinica* juntamente com outras quatro espécies e de 471 pb para as restantes 17 espécies de *Ephedra* spp. As sequências obtidas foram alinhadas, permitindo o desenho de 3 pares de *primers* específicos para *Ephedra* spp. nas regiões onde existia menor homologia com as duas outras espécies incluídas no estudo.

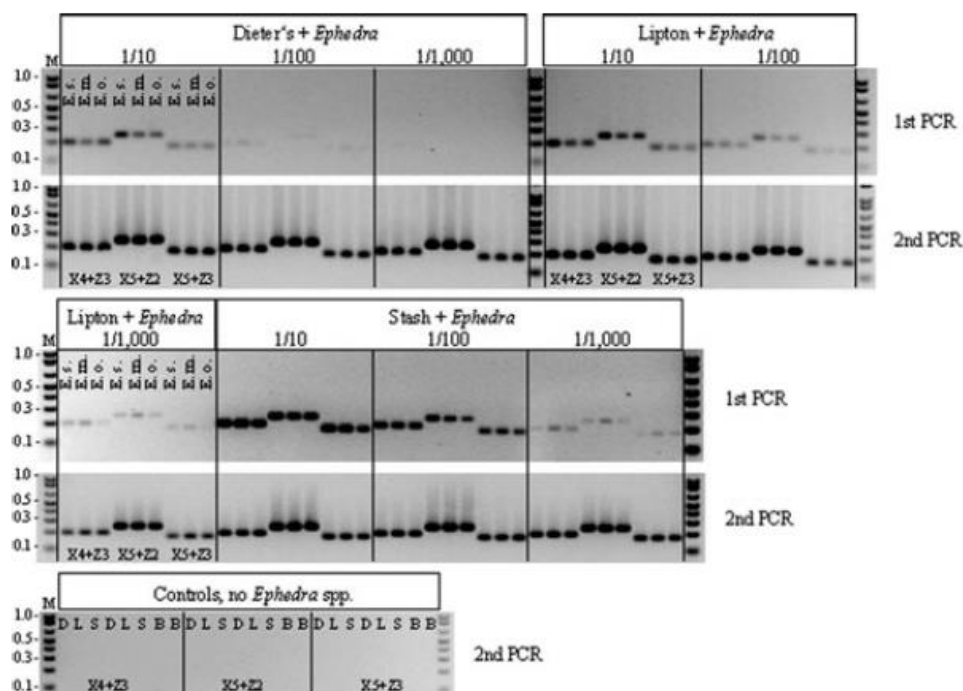


Figura 11: Produtos de PCR obtidos para as misturas de *Ephedra* com infusões comerciais (Super Dieter's Tea, Lipton herbal tea, Stash apple cinnamon herbal tea) com diferentes rácios (1/10, 1/100 e 1/1000) utilizando os três pares de *primers* específicos para *Ephedra* spp. E.s. - *E. sinica*, E.m. - *E. major*, E.o. - *E. ochreata*, M - Marcador de ADN (Techen et al, 2006).

Os conjuntos de *primers* desenhados foram aplicados a misturas de *Ephedra* spp. com plantas usadas em infusões, misturas essas preparadas com um rácio de 1/1 até

1/1,000, tendo-se verificado a amplificação de todas as amostras apenas para o rácio 1/10 (Figura 11). No entanto, para as misturas 1/100 e 1/1000 apenas se conseguiram obter resultados positivos quando se procedeu a uma segunda PCR usando como *template* 2 µL de produto da reação de PCR (Figura 11).

5.2 *Citrus aurantium* (Laranja-amarga)

5.2.1 Descrição e propriedades

O género *Citrus* inclui diversas frutas importantes e amplamente cultivadas. Estas plantas são produzidas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente na América (liderada pelo Brasil, EUA, México e Argentina), Mediterrâneo (liderada pela Espanha, Itália, Egito e Turquia), e regiões da Ásia Oriental (liderada pela China, Índia e Japão) (Talon & Gmitter, 2008). *Citrus aurantium* L. pertence à família Rutaceae, sendo conhecida popularmente como laranja-amarga, laranja-azedada, laranja-cavalo, laranja-de-sevilha (Figura 12). Na



Figura 12: *Citrus aurantium* (<http://www.mdidea.com/products/proper/propero9001.html>).

medicina tradicional chinesa, os seus frutos são conhecidos como “zhi shi” e utilizados como estimulante da função gastrointestinal. No Oriente utiliza-se tradicionalmente o fruto verde seco. Além do fruto em si, as folhas são usadas em infusões como auxiliares na digestão, em casos de gripe, as flores têm propriedades sedativas e a casca do fruto é usada como regulador da digestão. O fruto é tradicionalmente usado como antiemético, antitússico, sudorífico, digestivo e expetorante, considerando-se que o fruto imaturo apresenta geralmente uma ação mais forte, sendo utilizado no tratamento da dispepsia, prisão de ventre, distensão abdominal, sensação de aperto no peito e prolapso do útero. A casca do fruto é amarga e funciona como digestivo estomacal.

As aminas adrenérgicas (octopamina, sinefrina, tiramina, metiltiramina e hordenina) são consideradas como sendo os compostos ativos mais importantes de *C. aurantium* uma vez que a sinefrina, hordenina e tiramina atuam no metabolismo da gordura, ativando a lipólise por meio de ação adrenérgica/estimulação de recetores beta-3 (Arbo et al., 2009). A sinefrina, principal composto da laranja-amarga, é uma amina quiral e está presente na natureza na forma (R)-(-)-*p*-sinefrina (Arai et al., 1997). Devido ao seu interesse farmacológico, também é comercializada como fármaco sintético sob o nome de oxedrina. Quimicamente, a *p*-sinefrina é uma substância similar a outras aminas simpatomiméticas como a efedrina (presente na *E. sinica*) (Figura 13).

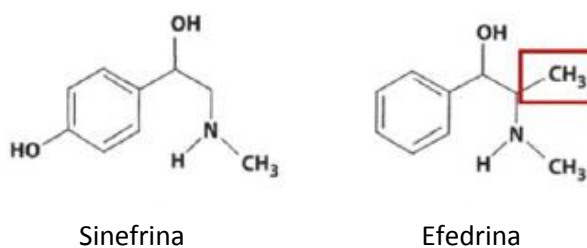


Figura 13: Estruturas químicas de sinefrina e efedrina, evidenciando as diferenças estruturais. (<http://planetadocorpo.com/2015/07/oque-e-sinefrina-e-para-que-serve.html>).

A efedrina atua como estimulante, mas o seu uso não é indicado, pois acelera os batimentos cardíacos e a pressão arterial, aumentando o risco de insónia, enfarte e derrame. A utilização de extrato de *C. aurantium* é permitido nos suplementos alimentares, contudo, vários países estabeleceram limites para o teor de aminas ativas. Em 2004, quando a FDA proibiu a venda de suplementos dietéticos contendo efedrina, de uma forma geral, os fabricantes tendencialmente substituíram este composto pela sinefrina (Rossato et al., 2011). Assim, indiretamente, a proibição por parte da FDA levou ao aumento de consumo de *C. aurantium* (Haller & Benowitz, 2000; Miller et al., 2001). O que despertou especial interesse para a utilização da laranja-amarga, foi o facto de o seu extrato apresentar propriedades termogénicas e estimulantes do metabolismo, tanto isoladamente como combinado com outros princípios ativos (ex: cafeína). Adicionalmente, as suas fibras solúveis formam um gel no estômago que origina uma sensação de saciedade, a presença de pectinas dificulta a taxa de absorção de carboidratos, lípidos e colesterol em excesso. Desta forma, o extrato de *C. aurantium* tem sido frequentemente incluído em suplementos alimentares para reduzir o peso e inibir o apetite.

5.2.2 Metodologias de identificação

Devido ao elevado consumo de produtos para perda de peso, muitos dos quais incluem na sua composição *C. aurantium*, têm sido desenvolvidas novas metodologias para a deteção e quantificação de aminas adrenérgicas, com particular ênfase para a determinação de sinefrina, em extratos e/ou produtos à base de plantas contendo citrinos. Estas incluem HPLC com deteção por UV (Arbo et al., 2009; Niemann & Gay, 2003; Pellati & Benvenuti, 2007; Santana et al., 2008; Schaneberg et al., 2004), fluorescência (Niemann & Gay, 2003), quimioluminescência (Slezak et al., 2007), electroquímica (Kusu et al., 1996), ESI-MS (Mattoli et al., 2005) e MS/MS (Gay et al., 2006), bem como técnicas eletroforéticas (Avula et al., 2005). No que respeita a aplicação de técnicas de biologia molecular, estudos recentes têm utilizado diversas abordagens, tais como marcadores SSR e SRAP (Barkley et al., 2006), RAPD e SCAR (Nicolosi et al., 2000) e AFLP (Liang et al., 2007; Pang et al., 2006) como forma de revelar as relações filogenéticas entre as diversas

espécies *Citrus*. No entanto, refira-se que a taxonomia e filogenia do género *Citrus* é considerada como sendo muito complicada e controversa, devido à compatibilidade sexual com plantas de outros géneros próximos, à frequência elevada de mutações e à sua ampla dispersão global (Nicolosi et al., 2000).

Recentemente, Aldeguer et al. (2014) sugeriu a utilização de PCR em tempo real com a utilização simultânea de duas sondas, marcadas com diferentes corantes fluorescentes, para a identificação e quantificação de tangerina em sumos de laranja (Aldeguer et al., 2014). Neste trabalho, foram usadas nove variedades de laranja (*Citrus sinensis*) e treze de tangerina (*C. reticulata*), tendo-se confirmado a existência de um SNP na região intergénica cloroplastidial *trnL-trnF*, pelo que esta sequência polimórfica foi utilizada como alvo das duas sondas. Relativamente a estudos de autenticidade por biologia molecular de material botânico ou suplementos alimentares contendo *C. aurantium*, não são conhecidos até á presente data. Contudo, estão descritas abordagens baseadas em técnicas cromatográficas, as quais se baseiam sobretudo na determinação por HPLC-ESI-MS/MS de diferentes amins (tirosina, octopamina, sinefrina, tiramina e hordenina), principais compostos ativos da planta *Citrus aurantium*, como marcadores químicos da espécie em extratos e formulações fitoterápicas (Bagatela et al., 2015).

6 Objetivos e âmbito do trabalho

O consumo de PFS é frequentemente publicitado como sendo uma solução eficaz para a redução de peso, sendo geralmente assumido pelos consumidores que estes são alternativas seguras. Contudo, estes produtos são legalmente considerados como alimentos, não estando sujeitos às mesmas regras aplicadas aos medicamentos e não existindo nenhum requisito de avaliação obrigatória de eficácia, segurança e qualidade antes da sua comercialização.

Entre os diferentes tipos de adulterações descritas para este tipo de produtos, encontra-se a possibilidade de ocorrer a substituição acidental, ou a troca intencional, de espécies botânicas. Deste modo, torna-se essencial desenvolver técnicas analíticas para uma identificação correta de espécies vegetais, que possam ser aplicáveis quer à autenticação de materiais botânicos utilizados na produção de PFS, quer ao produto final.

No que respeita o caso do PFS para emagrecimento, algumas espécies de plantas são propícias de serem utilizadas nestes produtos pelas suas propriedades associadas à perda de peso. A espécie *Ephedra sinica* é uma planta que, devido às suas propriedades termogénicas, foi muito utilizada em suplementos alimentares para perda de peso nos EUA e na Europa. No entanto, o consumo desta planta foi associado a diversos casos de enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral e morte, não sendo atualmente permitida a sua presença na formulação de PFS. Assim, por forma a garantir a segurança dos consumidores, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias que permitam, de forma específica, verificar a presença ilegal desta espécie em PFS para perda de peso.

Após a interdição da incorporação de *Ephedra sinica* ou efedrina em PFS, a indústria de PFS para emagrecimento tendencialmente optou pela sua substituição por outras espécies com efeito termogénico similar. Pela sua composição em sinefrina, uma amina adrenérgica similar à efedrina, mas com efeitos adversos menos graves, uma das plantas muito usada nestes produtos é a laranja-amarga (*Citrus aurantium*).

Neste sentido, o presente trabalho teve como principal objetivo a deteção das plantas *Ephedra sinica* e *Citrus aurantium* em infusões e em suplementos alimentares à base de plantas para perda de peso. Para tal, recorreu-se ao desenvolvimento de marcadores moleculares com base nas técnicas da PCR convencional e PCR em tempo real acoplada à análise por HRM.

Componente Experimental

7 Material e Métodos

7.1 Descrição e preparação das amostras

Para a realização deste estudo utilizaram-se 10 suplementos alimentares à base de plantas e 6 amostras de infusões, ambos comercializados para fins de perda de peso (Figura 14). Todos os suplementos se apresentavam na forma de cápsulas ou comprimidos, sendo que 4 referiam no rótulo a presença de *Citrus aurantium* (Tabela 1). Uma das amostras de PFS foi cedida por um consumidor frequente deste tipo de produtos, duas foram adquiridas em superfícies comerciais e as restantes foram gentilmente cedidas pela ASAE. As infusões para emagrecimento foram adquiridas em supermercados e ervanárias (Tabela 2), sendo que 5 delas indicavam conter *Citrus aurantium*. As 30 amostras do género *Citrus* utilizadas como plantas de referência, incluindo 6 amostras da espécie *Citrus aurantium* (Tabela 3), foram obtidas na forma de folhas provenientes de Bancos de Germoplasma e Jardins Botânicos. As amostras do género *Ephedra*, sob a forma de sementes, folhas, ramos ou extratos de ADN, foram obtidas através de diversos Bancos de Germoplasma e Jardins Botânicos, sendo que 3 das 22 amostras correspondem à espécie *Ephedra sinica* (Tabela 4). Foram ainda utilizadas 51 plantas medicinais, adquiridas comercialmente ou colhidas na natureza, para fins de avaliação de reatividade cruzada relativamente aos *primers* específicos para a espécie *Ephedra sinica* e 47 plantas medicinais para avaliar a reatividade cruzada dos *primers* específicos para a espécie *Citrus aurantium*.

Inicialmente, as amostras (sementes, folhas e ramos) foram trituradas com recurso a um moinho de lâmina dupla (Grindomix GM200, Retsch, Alemanha). No caso das amostras sob a forma de folhas e de ramos, antes de serem trituradas foram secas à temperatura ambiente. Após trituração, as amostras foram colocadas em recipientes esterilizados, devidamente rotuladas e posteriormente armazenadas a -20°C.



Figura 14. Amostras de infusões e PFS para perda de peso utilizadas neste estudo.

Tabela 1: Descrição das amostras de suplementos alimentares utilizadas no estudo.

| Código | Embalagem | Origem | Ingredientes |
|--------------|--|----------|--|
| SA24 | Blistre 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-índia, <i>Opuntia ficus indica</i> , 60 mg), FOS (25 mg), <i>Aloé vera</i> (Aloe ferox, 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), toranja (0,2 mg), ananás (0,2 mg). |
| SA27 | 14 cápsulas castanhas, 14 cápsulas azuis, 42 cápsulas laranjas e 4 ampolas | Portugal | Semana 1 (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 bróculos, 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. |
| EM130 | Frasco com 60 cápsulas | Portugal | Glucomanano; cápsula: Gelatina; L-Carnitina; Extrato de Levedura com Crómio; Algas; Citrato de Potássio; agentes de volume: Talco, Sorbitol, Polivinilpirrolidona; antiaglomerante: Sais de Magnésio de Ácidos Gordos; agente de volume: Sílica; Pantotenato de Cálcio; cápsula: Óxido de Titânio, Óxido de Ferro Amarelo, Eritrosina; Cloridrato de Piridoxina. |
| EM131 | Frasco com 90 cápsulas | Portugal | Chá Verde (contendo pelo menos 6% de cafeína) 83 mg; Guaraná (contendo pelo menos 22% de cafeína) 23 mg; Tribulus terrestris 50 mg; Laranja Amarga 100 mg ; L-Carnitina 250 mg; <i>Ginkgo Biloba</i> (contendo pelo menos 24% de heterósidos flavónicos e 6% de lactonas terpénicas) 20 mg; Vitamina B1 0,37 mg; Vitamina B6 0,47 mg; Vitamina B12 0,84 µg; Ácido Fólico 66,67 µg; Ácido Pantoténico 2 mg; Biotina 16,67 µg; Nicotinamida 5,33 mg; Vitamina C 26,67 mg; Crómio 13,33 µg. |
| EM132 | Frasco com 60 cápsulas | Portugal | Citrus aurantium (> 10% de sinefrina) , 80 mg, Teobroma (> 0,5% de feniletilamina e > 3% teobromina) 70 mg, Gelatina, <i>Camellia sinesis</i> (> 5% de teofilina) 60 mg, Vicia faba (> 2% de L-Dopa) 50 mg, Epigalocatequinas 50 mg, Framboesa (> 20% de xantonas) 50 mg, Hesperidina 50 mg, Crómio (cloreto de crómio) 80 µg. |
| EM133 | Frasco com 60 cápsulas | Portugal | <i>Aloe vera</i> 80 mg, <i>Cynara scolymus</i> 80 mg, Gelatina, <i>Malva silvestri</i> (micronizado) 70 mg, <i>Lavandula spica</i> 50 mg, <i>Taraxacum officinale</i> 50 mg, <i>Passiflora incarnata</i> 50 mg, GABA (Ácido Gama-Aminobutírico) 50 mg, Potássio (cloreto de potássio) 50 mg, 5-HTP (L-5-Hidroxitriptofano) 40 mg, Boro (Citrato de Boro e Borato) 5 mg, Melatonina 1,8 mg. |
| EM134 | Blistre de 30 cápsulas | Portugal | Extrato <i>Garcinia cambogia</i> 300mg; Extrato Café Verde 160mg; Extrato Canela 50mg Extrato Papaia 25mg; Vit. B6 0,12mg; Picolinato de Crómio 20mcg; Antiaglomerante: Sais de magnésio de ácidos gordos; Cápsula: gelatina. Pode conter vestígios de glúten, peixe, soja e leite. |

Tabela 1 (continuação): Descrição das amostras de suplementos alimentares utilizadas no estudo.

| Código | Embalagem | Origem | Ingredientes |
|--------|---------------------------------------|----------|--|
| EM135 | Frasco com 60 comprimidos | Portugal | Diluyente: celulose microcristalina, <i>Cassia angustifolia</i> (Sene; extrato seco das folhas contendo pelo menos 6% de senósidos), <i>Griffonia simplicifolia</i> (extrato seco das sementes, 5-HTP), <i>Rhamnus purshiana</i> DC (Cáscara Sagrada; extrato da casca contendo pelo menos 10% de cascarósidos), <i>Cynara scolymus</i> L. (Alcachofra; extrato seco 4:1), <i>Taraxacum officinale</i> (Dente de Leão; extrato seco), <i>Aloe barbadensis</i> (Aloé Vera; extrato seco), <i>Passiflora incarnata</i> (Passiflora; extrato seco 4:1 das partes aéreas), lubrificante: estearato de magnésio, antiaglomerante: dióxido de silício. |
| EM136 | Frasco com 60 comprimidos | Portugal | <i>Camellia sinensis</i> (Chá Verde; extrato seco das folhas contendo pelo menos 6% de cafeína), <i>Paullinia cupana</i> (Guaraná; extrato seco das sementes contendo pelo menos 22% de cafeína), Citrus aurantium (Laranja Amarga; extrato seco do fruto) , tartarato de L-Carnitina, diluyente: celulose microcristalina, <i>Theobroma cacao</i> (Cacau; extrato seco das sementes), colina, lubrificante: estearato de magnésio, antiaglomerante: dióxido de silício, cloreto de crómio. |
| EM137 | Blister de 40 cápsulas | Portugal | Fibra de Aveia 50%; Quitosano 18,3%; cápsula: Hidroxipropilmetilcelulose; Extrato de Slim Rose com Rosavina 10%; Extrato de Chá Verde 10%; Extrato de Gilbarbeira 10%; Acetato de D-alfa-tocoferol 0,5%; D-pantotenato de Cálcio 0,2%; Cloridrato de Piridoxina 0,1%; Crómio 0,01%. |
| EM138 | 1 cápsula fornecida por um consumidor | Portugal | 50 mg de efedrina, 100 mg de cafeína, 25 mg de aspirina, 175 mg de uva ursina. |

Tabela 2: Descrição das amostras de infusões utilizadas no estudo.

| Código | Embalagem | Origem | Ingredientes |
|--------|------------------------------|----------|---|
| EM72 | Pacote com 10 saquetas | Portugal | Laranjeira (Citrus aurantium), botões florais |
| EM73 | Saco com folhas secas (50 g) | Portugal | Citrus aurantium |
| EM74 | Pacote com 10 saquetas | Portugal | Gotu Kola (planta) (<i>Hydrocotyle asiatica</i> L.) 25%, Bétula (folhas) 20%, Bodelha (planta) (<i>Fucus vesiculosus</i> L.) 20%, Dente-de-leão (planta) (<i>Taraxacum officinale</i> Web.) 10%, Gilbarbeira (raiz) (<i>Rucus aculeatus</i> L.) 10%, Casca de laranja (<i>Citrus sinensis</i> L.) 5%. |
| EM75 | Pacote com 20 saquetas | Portugal | CháPu Erh- Thea Sinensis (folha): 25%, Ortosifão- <i>Orthosiphon stamineus</i> (hoja): 23,7%, Pé de cereja- <i>Prunus avium</i> L. (pedúnculo): 20%, Dente-de-leão - <i>Taraxacum officinale</i> (raiz): 10%, Aroma de limão: 8%, Flor de laranjeira Citrus aurantium L.: 7,3% Groselha negra- <i>Ribes Nigrum</i> L. (hoja), Limão- <i>Citrus limon</i> L. (corteza): 2,7%. |
| EM76 | Pacote com 24 saquetas | Portugal | <i>Betula alba</i> L. (Bétula, folhas) 25%, <i>Cassia angustifolia</i> VAHL. (cassia, folhas) 20%, <i>Rhamnus frangula</i> L. (Amieiro-negro, casca) 15%, <i>Mentha piperita</i> L. (Hortelã-pimenta, folhas) 15%, <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (<i>Rhamnus purshiana</i> D.C. (Cascara sagrada, caca) 5%, Alcacuz, raiz) 10%, Citrus aurantium L. (Laranja-amarga, casca) 5%, <i>Malvas silvestris</i> L. (Malvas, planta) 5%. |
| EM129 | Pacote com 10 saquetas | Portugal | Pilriteiro (<i>Crataegus oxyacantha</i>), folha florida, Tília (<i>Tilia Argentea</i>), flor, Funcho (<i>Foeniculum Vulgare</i>), fruto, Laranjeira (Citrus aurantium), flor. |

Tabela 3: Lista das espécies de referência pertencentes ao género *Citrus* e respetivas origens.

| Código | Amostra | Origem | Número de acesso |
|---------------|---|--|-------------------------|
| EM77 | <i>Citrus limon</i> | Campo (Portugal) | - |
| EM78 | <i>Citrus sinensis</i> | Campo (Portugal) | - |
| EM79 | <i>Citrus aurantium</i> | Royal Botanic Garden Edinburgh (Reino Unido) | 19696427 B |
| EM80 | <i>Citrus medica</i> | Royal Botanic Garden Edinburgh (Reino Unido) | 20101668 A |
| EM98 | <i>Citrus ichangensis</i> | US Department of Agriculture (EUA) | 131-10 |
| EM99 | <i>Citrus myrtifolia</i> | US Department of Agriculture (EUA) | 264-92 |
| EM100 | <i>Citrus aurantium</i> 'Karna' | US Department of Agriculture (EUA) | 4-04 |
| EM101 | <i>Citrus</i> 'Ponderosa' | US Department of Agriculture (EUA) | 6230 PA |
| EM102 | <i>Citrus limonia</i> 'Australiam Red' | US Department of Agriculture (EUA) | 6-04 |
| EM103 | <i>Citrus assamensis</i> | US Department of Agriculture (EUA) | 129-10 |
| EM104 | <i>Microcitrus australasica</i> | US Department of Agriculture (EUA) | 147-14 |
| EM105 | <i>Citrus aurantium</i> | US Department of Agriculture (EUA) | 130-10 |
| EM106 | <i>Citropsis gabuensis</i> | US Department of Agriculture (EUA) | 37-12 |
| EM107 | <i>Citrus wilsonii</i> 'Ichang Lemon' | US Department of Agriculture (EUA) | 137-10 |
| EM108 | <i>Citrus junos</i> 'Yuzu' | US Department of Agriculture (EUA) | 132-10 |
| EM109 | <i>Citrus aurantium</i> 'Bouquet de Fleurs' | US Department of Agriculture (EUA) | 241-05 |
| EM110 | <i>Citrus tangelo</i> | US Department of Agriculture (EUA) | 1-02 |
| EM111 | <i>Citrus meyeri</i> | US Department of Agriculture (EUA) | 265-92 |
| EM112 | <i>Citrus bergamia</i> 'Bergamot' | US Department of Agriculture (EUA) | 242-05 |
| EM113 | <i>Citrus aurantium</i> 'Variegated' | US Department of Agriculture (EUA) | 239-04 |
| EM114 | <i>Citrus grandis</i> | Stellenbosch University Botanical Garden (África do Sul) | 2013-294 |
| EM115 | <i>Citrus hystrix</i> | Stellenbosch University Botanical Garden (África do Sul) | 2015-10 |
| EM116 | <i>Citrus hystrix</i> DC. | Botanische Garten der Universität Bonn (Alemanha) | xx-O-BOON-22280 |
| EM117 | <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.&Panz.) Swingle | Botanische Garten der Universität Bonn (Alemanha) | xx-o-BOON-34374 |
| EM118 | <i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr. | Botanische Garten der Universität Bonn (Alemanha) | xx-O-BONN-19623 |
| EM119 | <i>Citrus medica</i> L. | Botanische Garten der Universität Bonn (Alemanha) | xx-O-BONN-19624 |
| EM124 | <i>Citrus aurantium</i> | Campo (Portugal) | - |
| EM125 | <i>Citrus clementina</i> | Campo (Portugal) | - |
| EM126 | <i>Citrus paridisi</i> | Campo (Portugal) | - |
| EM127 | <i>Citrus reticulada</i> | Campo (Portugal) | - |

Tabela 4: Lista das espécies pertencentes ao género *Ephedra* e respetivas origens.

| Código | Amostras | Origem | Número de acesso |
|---------------|------------------------------|---|-------------------------|
| EM81 | <i>Ephedra californica</i> | USDA, ARS, WRPIS (EUA) | W646543 |
| EM82 | <i>Ephedra torreyana</i> | USDA, ARS, NALPGRU (EUA) | W636786 |
| EM83 | <i>Ephedra viridis</i> | USDA, ARS (EUA) | W640440 |
| EM84 | <i>Ephedra aphylla</i> | Kew Royal Botanical Gardens (Reino Unido) | 0228233 |
| EM85 | <i>Ephedra fragilis</i> | Kew Royal Botanical Gardens (Reino Unido) | 0119797 |
| EM86 | <i>Ephedra gerardiana</i> | Kew Royal Botanical Gardens (Reino Unido) | 0107150 |
| EM87 | <i>Ephedra distachya</i> | EUA | M05.8027 |
| EM88 | <i>Ephedra tweediana</i> | EUA | M05.8027 |
| EM89 | <i>Ephedra</i> sp. | EUA | M06.9026 |
| EM90 | <i>Ephedra</i> sp. | EUA | M06.9027 |
| EM91 | <i>Ephedra fragilis</i> | Botanische Garten der Universitat Bonn (Alemanha) | xx-O-BONN-19185 |
| EM92 | <i>Ephedra chilensis</i> | Botanische Garten der Universitat Bonn (Alemanha) | CL-O-BONN-33689 |
| EM93 | <i>Ephedra gerardiana</i> | Botanische Garten der Universitat Bonn (Alemanha) | xx-O-BONN-0983874 |
| EM94 | <i>Ephedra fragilis</i> | Jardin Botánico de Córdoba (Espanha) | — |
| EM95 | <i>Ephedra distachya</i> | Botanische Garten der Universitat Bonn (Alemanha) | xx-O-BONN-8300 |
| EM96 | <i>Ephedra major</i> | Botanische Garten der Universitat Bonn (Alemanha) | GR-O-BONN-32852 |
| EM97 | <i>Ephedra major</i> | Botanische Garten der Universitat Bonn (Alemanha) | xx-O-BONN-8993 |
| EM120 | <i>Ephedra sinica</i> | Kew Royal Botanic Gardens (Reino Unido) | 1991-154 |
| EM121 | <i>Ephedra gerardiana</i> | The Hillier Gardens (Reino Unido) | SO51 oQA |
| EM122 | <i>Ephedra sinica</i> | Rock Alpine Garden (Reino Unido) | 990547*1 |
| EM123 | <i>Ephedra sinica</i> | Chiltern Seeds (Inglaterra) | 507L |
| EM139 | <i>Ephedra equisetina</i> | Jardim Botânico de Montréal (Canadá) | - |

7.2 Reagentes e soluções

- **CTAB1 1% PVP-40**

Pesaram-se 2 g do reagente CTAB e 1 g de polivinilpirrolidona (PVP-40) e adicionaram-se 4 mL de EDTA (500 mM), 10 ml de Tris HCl (1 M) e 28 mL de NaCl (5 M). Após a dissolução da mistura em água desionizada e correção do pH para 7,5 com solução de HCl, completou-se o volume até 100 mL. Por último, a solução foi autoclavada e armazenada à temperatura ambiente.

- **CTAB₂**

Pesaram-se 0,5 g do reagente CTAB e adicionaram-se 800 µL de NaCl (5 M). Completou-se o volume com água desionizada até 100 mL e de seguida a solução foi autoclavada e armazenada à temperatura ambiente.

- **Tampão TE 0,1x**

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

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

A solução Tampão Fosfato 1M (pH 8) foi preparada a partir das soluções *stock* de hidrogenofosfato de sódio (Na₂HPO₄) e di-hidrogenofosfato de sódio monohidratado (NaH₂PO₄.H₂O), ambas a 1 M. De modo, a obter um volume final de 100 mL de tampão fosfato 1 M, juntaram-se 92 mL da solução *stock* de Na₂HPO₄ a 8 mL da solução *stock* de NaH₂PO₄.H₂O e corrigiu-se o pH para 8. De seguida 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) e completou-se o volume até 2 L com água desionizada.

- **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**

Pesaram-se 5 mg de azul de bromofenol e 4 g de sacarose e dissolveram-se em 5 mL de água desionizada. Após dissolução adicionaram-se 2,4 mL de EDTA (0,5 M) e fez-se o volume até 10 mL com água desionizada. A solução foi autoclavada e armazenada a -20°C.

7.3 Métodos de extração de ADN

Consoante o tipo de amostra, foram utilizados diferentes métodos de extração de ADN, tendo-se selecionado o método mais adequado para cada tipo de matriz/amostra de

acordo com os resultados obtidos em trabalhos anteriores realizados. Assim, para a extração de ADN das infusões utilizou-se o método CTAB, como descrito por Mafra et al. (2008), com algumas modificações, nomeadamente a adição de PVP 1% e β -mercaptoetanol. Para as amostras de PFS, utilizou-se o método Nucleospin Plant II (protocolo 2), precedido de um passo que envolveu a utilização do tampão fosfato 1 M (pH 8; 15% de etanol). Em todas as outras amostras, utilizou-se o kit comercial Nucleospin Plant II (protocolo 2), de acordo com as instruções do fabricante.

7.3.1 CTAB 1% PVP

Para cada tubo estéril de 2 mL, pesaram-se 100 mg de amostra, aos quais se adicionaram 1000 μ L de CTAB 1-1%PVP (contendo 2% CTAB (m/v); 0,1 mol/L Tris; 1,4 mol/L NaCl; 1% PVP-40 (m/v); 0,02 mol/L EDTA; pH 8,0) pré-aquecido a 65°C e 20 μ L de β -mercaptoetanol. De seguida, procedeu-se à agitação vigorosa, com vórtex, de modo a misturar a solução e posteriormente os tubos foram incubados a 65°C durante 1 h num termobloco, a 900 rpm. Ao longo da incubação, os tubos foram agitados no vórtex a cada 15 minutos. No final, procedeu-se à centrifugação dos tubos (15 min, 18 000 x g, a 4°C) e transferiram-se entre 600-700 μ L de sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL. Repetiu-se a centrifugação (5 min, 18 000 x g, a 4°C) e transferiu-se 600 μ L de sobrenadante para um novo tubo estéril de 1,5 mL. De seguida, adicionaram-se 500 μ L de clorofórmio, agitou-se no vórtex durante 20 segundos e centrifugou-se a mistura (10 min, 18 000 x g, a 4°C). Seguidamente, retirou-se a fase superior 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) de modo a promover a precipitação. A solução foi agitada por inversão e incubada 1 h à temperatura ambiente, sendo invertida a cada 15 minutos. De seguida, centrifugou-se a mistura (10 min, 12 000 x g, a 4°C), retirou-se o sobrenadante e dissolveu-se o precipitado em 350 μ L NaCl 1,2 M e 350 μ L clorofórmio. A solução foi agitada num vórtex durante 30 segundos e posteriormente foi centrifugada (10 min, 12 000 x g, a 4°C). Seguidamente, retirou-se a fase superior para um novo tubo estéril de 1,5 mL, adicionou-se 0,6 partes de volume de isopropanol (100%) a -20°C e misturou-se por inversão. Centrifugou-se uma vez mais a mistura (10 min, 12 000 x g, 4°C), descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi lavado com 500 μ L de uma solução de etanol (70%, v/v) a -20°C, tendo-se misturado cuidadosamente por inversão. Procedeu-se a uma nova centrifugação (10 min, 12 000 x g, a 4°C) e retirou-se cuidadosamente o solvente (etanol) por pipetagem. Os tubos foram colocados a secar na estufa a 50°C, durante 1 h de modo a proporcionar a completa evaporação do solvente. Para finalizar, adicionaram-se ao *pellet* 100 μ L de TE 0,1x e procedeu-se a uma agitação suave (300 rpm) a 10°C, para promover uma melhor hidratação dos extratos.

7.3.2 Nucleospin Plant II

Todas as amostras de suplementos alimentares foram extraídas com o kit NucleoSpin Plant II (protocolo 2), tendo inicialmente sido submetidas a um pré-tratamento com tampão fosfato 1 M (pH 8; 15% de etanol), o qual consistiu na adição de 400 μ L do tampão a 100 mg de amostra. De seguida, a mistura foi agitada vigorosamente no vórtex e, posteriormente, incubada a 65°C, durante 20 min, a uma agitação de 700 rpm. De seguida, adicionou-se o tampão PL1 do kit NucleoSpin Plant II e prosseguiu-se com o protocolo sem a adição de RNase. Este protocolo foi igualmente aplicado às amostras utilizadas como material de referência. Assim, para um tubo estéril de 2 mL, pesaram-se 100 mg de cada amostra, aos quais se adicionaram 600 μ L do tampão PL2 e 10 μ L de proteinase K de modo a promover a lise celular. Após agitação vigorosa das soluções, todos os tubos foram incubados num termobloco a 65°C e a 900 rpm durante 60 min, com agitação vigorosa de 15 em 15 min. Posteriormente, adicionou-se a cada tubo 150 μ L de tampão PL3 e colocou-se no congelador durante 5 min, para que o SDS precipitasse completamente. De seguida, procedeu-se a uma centrifugação a 17 000 x *g* durante 10 min (4°C), ao fim da qual se recolheu o sobrenadante para uma coluna de filtração, e se centrifugou novamente (2 min, 11 000 x *g*). Recolheu-se o eluato para tubos estéreis de 1,5 mL, adicionou-se 450 μ L de tampão PC, para ajustar as condições de ligação do ADN, e misturou-se por inversão durante 10 segundos. Posteriormente, montou-se outra coluna no tubo de recolha, pipetaram-se no máximo 700 μ L de cada amostra e centrifugou-se 1 minuto a 11 000 x *g*. De seguida, rejeitou-se o eluato e repetiu-se este procedimento com a restante amostra. Para lavagem, adicionaram-se 400 μ L do tampão PW1 na coluna, centrifugou-se (1 min, 11 000 x *g*) e rejeitou-se o eluato. Adicionaram-se ainda à coluna 700 μ L do tampão PW, centrifugou-se novamente (1 min, 11 000 x *g*) e rejeitou-se o eluato. Por último, adicionaram-se 200 μ L do tampão PW2 e centrifugou-se mais uma vez (2 min, 11 000 x *g*), de modo a remover completamente o tampão e secar completamente a membrana de sílica. Colocou-se a coluna num novo tubo estéril de 1,5 mL e adicionaram-se 50 μ L do tampão de eluição CE, pré-aquecido a 65°C. Incubou-se no termobloco 5 min a 65°C e centrifugou-se durante 1 minuto a 11 000 x *g* para eluir o ADN. Repetiu-se novamente o passo da adição de tampão CE, obtendo-se assim os extratos finais. Para que fosse possível controlar os reagentes de extração, foram realizados brancos nas extrações iniciais. Todos os extratos obtidos foram armazenados a -20°C até amplificação por PCR.

7.4 Avaliação e quantificação do ADN extraído

A concentração e pureza do ADN extraído foram avaliadas por espectrofotometria UV, tendo-se utilizado um Leitor de Microplacas Multidetecção Synergy™ HT e o dispositivo Take3 (Biotek Instruments, Winooski, EUA), específico para leitura UV de

extratos de ácidos nucleicos. Para a determinação da concentração e pureza dos extratos procedeu-se à leitura das absorvências (A) a 260 nm, 280 nm e 320 nm e usou-se o software de análise de dados Gen5 v2.01. Os comprimentos de onda referidos correspondem às absorvências máximas de ácidos nucleicos, proteínas e material estranho, respetivamente. A pureza dos extratos de ADN foi obtida pela razão A_{260}/A_{280} , sendo extratos com elevada pureza apresentam valores próximos de 1,8 (Somma, 2006). Com base na concentração de ADN calculada pelo software, procedeu-se à diluição dos extratos para uma concentração de 10 ng/ μ L para posterior amplificação por PCR.

A integridade dos extratos de ADN de todas as amostras foi avaliada através de uma eletroforese de ADN genómico em gel de agarose a 1%, realizada em tampão SGTB 1x (GRiSP, Porto, Portugal) e corada com Gel Red 1x (Biotium, Hayward, CA, EUA). A eletroforese decorreu a uma tensão elétrica de 200 V durante aproximadamente 25 min. Como marcador de massa molecular utilizou-se o marcador HiperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido) e adicionou-se 5 μ L do marcador diretamente no gel de agarose. Para cada um dos restantes poços, adicionaram-se 4 μ L de tampão de carregamento 6x previamente misturado com 5 μ L de cada amostra. O gel foi posteriormente visualizado num transiluminador de luz UV e a imagem digital foi adquirida utilizando um sistema de imagem Gel Doc EZ (Bio-Rad Laboratories, EUA).

7.5 Amplificação por PCR

7.5.1 *Primers*

Para a realização deste estudo foram desenhados diversos *primers*, os quais se encontram descritos na Tabela 5. Entre estes, utilizaram-se *primers* universais com o objetivo de confirmar a existência de ADN amplificável em todas as amostras em estudo. Para além destes, foram desenhados *primers* para a identificação do género *Ephedra* e *Citrus* e ainda específicos para as espécies *Ephedra sinica* e *Citrus aurantium*. Todos os *primers* foram desenhados com base nas sequências disponíveis na base de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), através do programa Primer3 Output designing tool (<http://frodo.wi.mit.edu/>) e ajustados manualmente quando necessário. De modo a verificar as propriedades dos *primers*, tais como a ausência de formação de *hairpins* ou auto-hibridação, utilizou-se o software Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Para o estudo *in-silico* da especificidade dos *primers* utilizou-se a ferramenta Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), que revela a existência de homologias de um par de *primers* relativamente a todas as sequências presentes na base

de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A síntese dos *primers* foi efetuada pela empresa STABVIDA (Caparica, Portugal).

Tabela 5: Oligonucleótidos usados em PCR qualitativa.

| Espécie | Sequência alvo | Primers | Sequencia dos primers (5'->3') | Amplificação (pb) | Genbank |
|---------------------|----------------------------------|---------------------------------|--|-------------------|------------|
| Eucariotas | 18S rRNA | EG-F EG-R | TCGATGGTAGGATAGTGGCCTACT TGCTGCCTTCCTTGGATGTGGTA | 109 | AF412275 |
| <i>Citrus</i> spp. | RGAs4-6-like | Cita1-F Cita1-R | TCTCGATCAAGGGATTGGCCG CAGCCCTTTACACTTTCCTGCAA | 134 | HM172529 |
| | Marcador anónimo 1 | Cita2-F Cita2-R | ACACGATGCCAACTCCGCTT TGTTTCGCACCAGGCGTAAAAGA | 126 | KM201256 |
| | Marcador anónimo 2 | Cita3-F Cita3-R | GTA GTGGCGTAGGGTGGTCG ATCTGCAGCCTAGGGAGGGAT | 107 | KM201257 |
| | RGAs4-6 like | Cita4-F Cita4-R | TGGTCGTGAATCTCATTAGCTGA TAATCTCCATCCCATATGTCATCT | 111 | HM172529 |
| | RGAs4-8 like | Cita5-F Cita5-R | TGAGAGTCGCCAGAGCAATCATC TTTGTAACTCTCCATCCCACACATC | 149 | HM172533 |
| | RGAs4-1-like | Cita6-F Cita6-R1 Cita6-R2 | TCCGCTATCAACACCATATGTTTGA | 108 | M172528 |
| | | | CCTTCCAGTTTCTGTCTTGTG TAAAATTCTAGCGATGTCCGCAG | | |
| | ITS | Cita7-F Cita7-R | CGACCTCCAACCCTT TGTTGT T GGCACTCGCCTGGGACGAAT | 92 | JN681151.1 |
| | ITS | Cita8-F Cita8-R | TGGTATTGGGTGCCGTCCTTAG AATCGGCAGAGTTCCTCTCCTT | 118 | JN681151.1 |
| <i>Ephedra</i> spp. | Aromatic amino-transferase2 mRNA | Eph1-F Eph1-R | CCATGGAGACCCTGCTGCGTT GAAACAGCTCTTCTTGCCTGCAG | 138 | KC438293.1 |
| | Mcd1 mRNA | Eph2-F Eph2-R | GCAGACCATGAAGCGTTGCAG TCTGACTGAGAAAGGTTGCAGCA | 106 | KR825753.1 |
| | ITS | Eph3-F Eph3-R | GTACCGCCAAGGAAGCAATCTG CGAGATATCCATTGCCGAGAGTC | 97 | AY755749.1 |
| | ITS | Eph4-F Eph4-R | TCGGAATGCTTGGTGC GCGAC AAGCCCCATTGAGCGGCAAGTA | 129 | AY755749.1 |

7.5.2 PCR qualitativa

Para a realização da PCR qualitativa utilizou-se água ultrapura (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), solução tampão (670 mM Tris-HCl, pH 8.8, 160 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20), solução de MgCl₂, dNTPs (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha), enzima SuperHot Taq Polymerase™ (Genaxxon Bioscience GmbH, Alemanha), *primers* e extrato de ADN para um volume final de 25 µL, utilizando as quantidades apresentadas nas Tabelas 6 e 7.

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

| Componentes | <i>Primers</i> | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|
| | EG-F | Cita1-F | Cita2-F | Cita3-F | Cita4-F | Cita5-F | Cita6-F | Cita7-F | Cita8-F |
| | EG-R | Cita1-R | Cita2-R | Cita3-R | Cita4-R | Cita5-R | Cita6-R1 Cita6-R2 | Cita7-R | Cita8-R |
| Água ultrapura | 13,9 | 14,3 | 14,3 | 14,3 | 14,3 | 14,3 | 14,3 | 14,3 | 14,3 |
| Tampão (10x) | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| MgCl ₂ (25 mM) | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 |
| 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 µM) | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Primer Reverse (10 µM) | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Taq Polimerase (5 U/µL) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Extrato de ADN (25 ng/ µL) | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Volume Total (µL) | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 |

Tabela 7: Componentes e respetivas quantidades utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com diferentes *primers* para *Ephedra* spp.

| Componentes | <i>Primers</i> | | | | |
|-------------------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | EG-F | Eph1-F | Eph2-F | Eph3-F | Eph4-F |
| | EG-R | Eph1-R | Eph2-R | Eph3-R | Eph4-R |
| Água ultrapura | 13,9 | 14,3 | 14,3 | 14,3 | 15,8 |
| Tampão (10x) | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| MgCl ₂ (25 mM) | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 1,5 |
| dNTP (2,5 mM cada) | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Primer Forward (10 µM) | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Primer Reverse (10 µM) | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Taq Polimerase (5 U/µL) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Extrato de ADN (25 ng/ µL) | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Volume Total (µL) | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 |

Todas os ensaios de PCR qualitativa foram realizados nos termocicladores MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, EUA) ou SimpliAmp Gradient Thermal Cycler (Life technologies) com condições de tempo e temperatura diferentes para cada conjunto de *primers*, como apresentado na Tabela 8. Para cada reação foi incluído um controlo negativo (CN) para os reagentes da amplificação, onde se substituiu o extrato de ADN por água ultra-pura.

No final de cada PCR qualitativa, de modo a visualizar os produtos obtidos, procedeu-se a uma eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) em tampão SGTB 1x e corado com Gel Red 1x durante 25 min a 200 V. Assim, em cada poço colocaram-se 20 µL de produto PCR misturados com 4 µL de tampão de carregamento 6x, à exceção de um dos poços no qual se adicionou 2 µL de marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha) misturado com o referido tampão de carregamento. No fim da eletroforese, a

imagem digital do gel foi adquirida utilizando um sistema de imagem Gel Doc EZ (Bio-Rad Laboratories, EUA).

Tabela 8: Condições específicas utilizadas na PCR qualitativa para cada par de *primers*.

| <i>Primers</i> | Etapas da PCR qualitativa | | | | | |
|---------------------------|---------------------------|--------------|----------------|-------------|----------|--------------|
| | Desnaturação | Amplificação | | NºCiclos | Extensão | |
| EG -F/EG -R | | 95°C (30 s) | 65°C (30 s) | 72°C (30 s) | 35 | |
| Cita1-F/Cita1-R | | 95°C (30 s) | 58°C (30 s) | 72°C (30 s) | 40 | |
| Cita2-F/Cita2-R | | 95°C (30 s) | 61°C (30 s) | 72°C (30 s) | 40 | |
| Cita3-F/Cita3-R | | 95°C (30 s) | 60°C (30 s) | 72°C (30 s) | 40 | |
| Cita4-F/Cita4-R | | 95°C (30 s) | 54°C (30 s) | 72°C (30 s) | 40 | |
| Cita5-F/Cita5-R | | 95°C (30 s) | 56°C (30 s) | 72°C (30 s) | 40 | |
| Cita6-F/Cita6-R1/Cita6-R2 | 95°C (5 min) | 95°C (30 s) | 58°C-R1 (30 s) | 72°C (30 s) | 40 | 72°C (5 min) |
| | | 95°C (30 s) | 54°C-R2 (30 s) | 72°C (30 s) | | |
| Cita7 -F/Cita7 -R | | 95°C (30 s) | 63°C (30 s) | 72°C (30 s) | 40 | |
| Cita8 -F Cita8 -R | | 95°C (30 s) | 63°C (30 s) | 72°C (30 s) | 40 | |
| Eph1-F/Eph1 -R | | 95°C (30 s) | 60°C (30 s) | 72°C (30 s) | 40 | |
| Eph2-F/Eph2-R | | 95°C (30 s) | 59°C (30 s) | 72°C (30 s) | 40 | |
| Eph3-F/Eph3-R) | | 95°C (30 s) | 60°C (30 s) | 72°C (30 s) | 40 | |
| Eph4-F/Eph4-R | | 95°C (30 s) | 68°C (30 s) | 72°C (30 s) | 35 | |

7.5.3 PCR em tempo real e análise por HRM

Para discriminar a espécie *Citrus aurantium* das restantes do mesmo género, bem como a espécie *Ephedra sinica* das outras pertencentes ao género *Ephedra*, recorreu-se à técnica de PCR em tempo real acoplada à análise por HRM, por ser uma estratégia rápida e bastante fiável em termos de discriminação de espécies. Deste modo, foram realizados dois ensaios distintos de PCR em tempo real acoplados à análise por HRM, um deles utilizando apenas espécies do género *Citrus* (*C. limon*- EM77, *C. clementine*- EM125, *C. tangerina*- EM127, *C. aurantium*- EM113, *C. toranja*- EM126) e outro utilizando apenas espécies do género *Ephedra* (*E. sinica*- EM123, *E. sinica*- EM122, *E. distachya*- EM95, *E. aphylla*- EM95). Para discriminar as espécies do género *Citrus* utilizaram-se os *primers* Cita6-F/ Cita6-R1, enquanto no caso das espécies de *Ephedra*, os *primers* utilizados foram Eph4-F/ Eph4-R, de acordo com os resultados anteriores por PCR qualitativa.

A amplificação por PCR em tempo real foi realizada num volume total de 20 µL, contendo água ultrapura, EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories, EUA), *primers* e extrato de ADN, conforme descrito na Tabela 9. As condições de temperatura e tempo dos ensaios de PCR em tempo real com análise por HRM, encontram-se apresentadas na Tabela 10. As reações de amplificação foram realizadas 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). Para a análise por

HRM recorreu-se ao *software* Precision Melt Analysis 1.2 (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA). Na análise por HRM, favoreceu-se a hibridação das cadeias duplas de ADN seguida da aplicação das condições específicas para a realização de uma curva de desnaturação, nomeadamente a aplicação de um aumento gradual da temperatura, através de incrementos de 0,2°C a cada 10 segundos, até se atingir os 95°C ou 100°C, dependendo da espécie em questão.

Tabela 9: Componentes e respetivas quantidades utilizados nas amplificações por PCR em tempo real com os *primers* Cita6-F/Cita6-R1 e Eph4-F/Eph4-R.

| Componentes (µL) | <i>Primers</i> | |
|---------------------------|------------------|---------------|
| | Cita6-F/Cita6-R1 | Eph4-F/Eph4-R |
| Água ultrapura | 6,8 | 6,8 |
| Evagreen® Supermix | 10 | 10 |
| <i>Primers</i> (10 µM) | 0,6 cada | 0,6 cada |
| Extrato de ADN (10 ng/µL) | 2 | 2 |
| Volume Total | 20 | 20 |

Tabela 10: Condições necessárias para as amplificações por PCR em tempo real e análise por HRM com os *primers* Cita6-F/R1 e Eph4-F/R.

| PCR em tempo real | <i>Primers</i> | | | | | | | | |
|-------------------|----------------|------------------|------|------|------|---------------|------|------|------|
| | | Cita6-F/Cita6-R1 | | | | Eph4-F/Eph4-R | | | |
| | | Temperatura | 95°C | 95°C | 58°C | 72°C | 95°C | 95°C | 70°C |
| | Duração | 5 min | 15 s | 15 s | 30 s | 5 min | 15 s | 15 s | 30 s |
| | Nº de ciclos | 1 | | 50 | | 1 | | 40 | |

| Análise HRM | <i>Primers</i> | | | | | | |
|-------------|----------------|------------------|-------|--------------|---------------|-------|--------------|
| | | Cita6-F/Cita6-R1 | | | Eph4-F/Eph4-R | | |
| | | Temperatura | 95°C | 63°C | 63-95°C | 95°C | 73°C |
| | Duração | 1 min | 5 min | 0,2°C/10 min | 1 min | 5 min | 0,2°C/10 min |

8 Resultados e discussão

8.1 Desenvolvimento de metodologias para diferenciação de *Citrus* spp.

8.1.1 Avaliação dos extratos de ADN

Inicialmente, as amostras de folhas das diferentes espécies de *Citrus* spp. foram submetidas a extração de ADN pelo método CTAB 1%PVP descrito na secção 4.3.1. Os extratos de ADN obtidos foram seguidamente avaliados quanto à sua concentração, pureza, integridade e capacidade de amplificação. No que respeita a pureza, como anteriormente referido, extratos com elevada pureza devem apresentar valores de A_{260}/A_{280} próximos de 1,8, considerando-se, contudo, que extratos com valores de pureza entre 1,7 e 2,1 são de boa qualidade. Apesar de se terem obtido purezas razoáveis, verificou-se que os extratos obtidos com este método apresentaram concentrações muito baixas, pelo que se recorreu à extração através do método NucleoSpin Plant II, protocolo 2. Os resultados da concentração de ADN, bem como da pureza dos extratos encontram-se apresentados na Tabela 11. À exceção de alguns extratos que apresentaram baixos valores de pureza, o que pode indicar uma possível contaminação com proteínas, polissacarídeos ou metabolitos secundários, de um modo geral, os extratos encontraram-se dentro dos limites de pureza requeridos. Já os valores de concentração de ADN foram bastante diversificados, sendo que o rendimento mais baixo foi de 4,6 ng/ μ L para *C. sinensis* (EM78) e *C. medica* (EM119) e o mais alto foi de 167,6 ng/ μ L para *C. medica* (EM80).

A integridade do ADN genómico das plantas medicinais foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. À exceção de 3 amostras, os resultados obtidos indicaram a presença de ADN de elevado peso molecular (~10.000 pb) (Figura 15). Algumas amostras apresentaram bandas mais ténues, o que está certamente relacionado com a sua concentração mais baixa. Assim, de uma forma geral, considerou-se que todos os extratos das plantas de referência do género *Citrus* apresentaram concentração, qualidade e integridade adequados para serem submetidos a amplificação por PCR.

Todas as plantas do género *Citrus* extraídas pelo método Nucleospin Plant II, foram submetidas a uma PCR qualitativa com um conjunto de *primers* universais, EG-F/EG-R, específico para as regiões de ADN universais (18S rRNA) de modo a confirmar a capacidade de amplificação dos extratos. A utilização de *primers* universais permite verificar se ocorreu algum problema durante a extração ou se existe algum tipo de contaminação nos extratos que iniba a ação da enzima Taq polimerase.

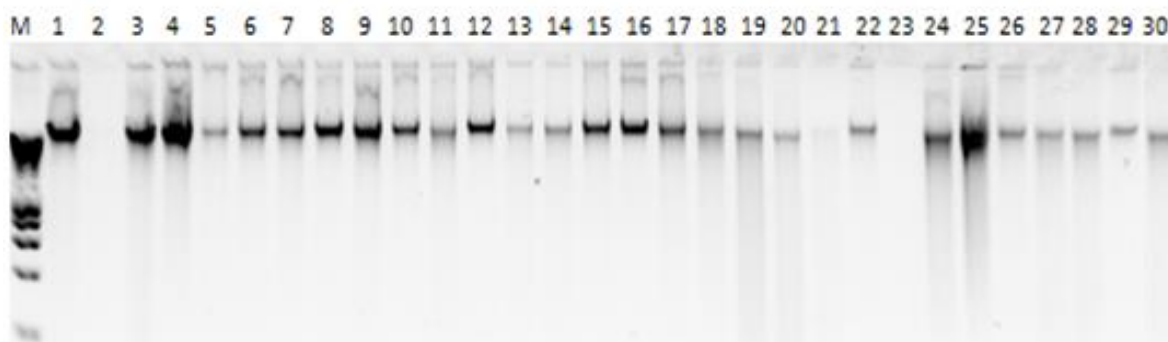


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico extraído pelo método NucleoSpin Plant II, (protocolo 2) das plantas de referência pertencentes ao género *Citrus*. Legenda: 1– *C. limon*; 2– *C. sinensis*; 3– *C. aurantium* (EM79); 4– *C. medica*; 5– *C. changensis*, 6– *C. myrtifolia*; 7– *C. aurantium* 'Karna' (EM100); 8– *C. 'Ponderosa'*; 9– *C. limonia* 'Australiam Red'; 10– *C. assamensis*; 11– *M. australasica*; 12– *C. aurantium* (EM105); 13– *C. gabuensis*; 14– *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 15– *C. junos* 'Yuzu'; 16– *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17– *C. tangelo*; 18– *C. meyeri*; 19– *C. bergamia* 'Bergamot'; 20– *C. aurantium* 'Variegated' (EM113); 21– *C. grandis*; 22– *C. hystrix*; 23– *C. hystrix* DC.; 24– *C. aurantifolia* (Christm.&Panz.) Swingle; 25– *C. maxima* (Burm.) Merr.; 26 – *C. medica*; 27– *C. aurantium* (EM124); 28– *C. clementina*; 29– *C. paridisi*; 30– *C. reticulada*; M– marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

Tabela 11: Valores das purezas e concentrações médias do ADN extraído das amostras do género *Citrus*.

| Código | Amostras | Pureza (A_{260}/A_{280}) | Concentração (ng/ μ L) |
|--------|--|---------------------------------|-------------------------------|
| EM77 | <i>Citrus limon</i> | 1,9 | 68,2 |
| EM78 | <i>Citrus sinensis</i> | 1,9 | 4,6 |
| EM79 | <i>Citrus aurantium</i> | 1,7 | 60,4 |
| EM80 | <i>Citrus medica</i> | 1,9 | 167,6 |
| EM98 | <i>Citrus ichangensis</i> | 1,8 | 29,1 |
| EM99 | <i>Citrus myrtifolia</i> | 1,5 | 34,4 |
| EM100 | <i>Citrus aurantium</i> 'Karna' | 1,8 | 43,1 |
| EM101 | <i>Citrus 'Ponderosa'</i> | 1,7 | 36,4 |
| EM102 | <i>Citrus limonia</i> 'Australiam Red' | 1,9 | 44,2 |
| EM103 | <i>Citrus assamensis</i> | 1,7 | 43,6 |
| EM104 | <i>Microcitrus australasica</i> | 1,9 | 27,5 |
| EM105 | <i>Citrus aurantium</i> | 1,9 | 25,5 |
| EM106 | <i>Citropsis gabuensis</i> | 1,8 | 7,1 |
| EM107 | <i>Citrus wilsonii</i> 'Ichang Lemon' | 1,4 | 17,7 |
| EM108 | <i>Citrus junos</i> 'Yuzu' | 1,5 | 22,5 |
| EM109 | <i>Citrus aurantium</i> 'Bouquet de Fleurs' | 1,7 | 36,4 |
| EM110 | <i>Citrus tangelo</i> | 1,9 | 39,1 |
| EM111 | <i>Citrus meyeri</i> | 2,0 | 38,2 |
| EM112 | <i>Citrus bergamia</i> 'Bergamot' | 1,8 | 49,5 |
| EM113 | <i>Citrus aurantium</i> 'Variegated' | 1,3 | 41,8 |
| EM114 | <i>Citrus grandis</i> | 1,6 | 18,8 |
| EM115 | <i>Citrus hystrix</i> | 1,1 | 13,6 |
| EM116 | <i>Citrus hystrix</i> DC. | 1,8 | 12,0 |
| EM117 | <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.&Panz.)Swingle | 1,9 | 67,3 |
| EM118 | <i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr. | 1,9 | 68,2 |
| EM119 | <i>Citrus medica</i> L. | 1,9 | 4,6 |
| EM124 | <i>Citrus aurantium</i> | 1,7 | 20,6 |
| EM125 | <i>Citrus clementina</i> | 1,6 | 23,0 |
| EM126 | <i>Citrus paridisi</i> | 1,9 | 19,9 |
| EM127 | <i>Citrus reticulada</i> | 1,6 | 24,8 |

A Figura 16 mostra a eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das plantas de referência de *Citrus* spp., usando os *primers* EG-F/EG-R. Os resultados mostram que no total de trinta amostras analisadas todas amplificaram positivamente com os *primers* EG-F/EG-R, sendo que apenas duas apresentaram bandas ténues, nomeadamente *C. hystrix* (EM115, linha 22) e *C. aurantium* (EM124, linha 27).

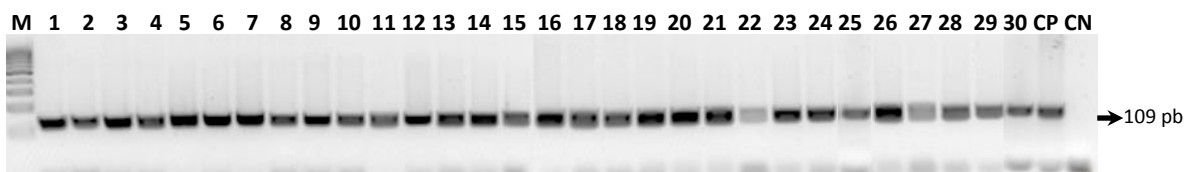


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Citrus* com os *primers* EG-F/ EG-R. Legenda: 1– *C. limon*; 2– *C. sinensis*; 3– *C. aurantium* (EM79); 4– *C. medica*; 5– *C. changensis*; 6– *C. myrtifolia*; 7– *C. aurantium* 'Karna' (EM100); 8– *C. 'Ponderosa'*; 9– *C. limonia* 'Australiam Red'; 10– *C. assamensis*; 11– *M. australasica*; 12– *C. aurantium* (EM105); 13– *C. gabuensis*; 14– *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 15– *C. junos* 'Yuzu'; 16– *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17– *C. tangelo*; 18– *C. meyeri*; 19– *C. bergamia* 'Bergamot'; 20– *C. aurantium* 'Variegated' (EM113); 21– *C. grandis*; 22– *C. hystrix*; 23– *C. hystrix* DC.; 24– *C. aurantifolia* (Christm.&Panz.) Swingle; 25– *C. maxima* (Burm.) Merr.; 26 – *C. medica*; 27– *C. aurantium* (EM124); 28– *C. clementina*; 29– *C. paridisi*; 30– *C. reticulada*; M– marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

8.1.2 Desenvolvimento de métodos de PCR específicos

No sentido de desenvolver uma metodologia específica para a deteção de *Citrus aurantium*, desenharam-se diversos conjuntos de *primers*, com alvo em diferentes genes plastidiais, nomeadamente os genes RGAs4-6-like, RGAs4-8 like, RGAs4-1-like, e regiões intergénicas (ITS1 e ITS2). Foram ainda usadas sequências de dois marcadores anónimos (Marcador anónimo 1 e Marcador anónimo 2) para desenho de *primers*. Deste modo, foram testados um total de 8 conjuntos de *primers*, nomeadamente Cita1-F/Cita1-R, Cita2-F/Cita2-R, Cita3-F/Cita3-R, Cita4-F/Cita4-R, Cita5-F/Cita5-R, Cita6-F/Cita6-R1, Cita6-F/Cita6-R2, Cita7-F/Cita7-R e Cita8-F/Cita8-R.

Inicialmente utilizou-se o *primer* Cita1-F/Cita1-R, desenhado sobre uma sequência do gene de resistência análoga (RGAs 4-6-like) da planta *Citrus aurantium* (Laranja-amarga). Este gene está relacionado com um mecanismo eficaz, presente nas plantas, para reconhecer e combater as infeções. Após a otimização do ensaio para as melhores condições de tempo e temperatura, bem como quantidades das componentes de PCR, procedeu-se à sua utilização para a amplificação por PCR das amostras de plantas de referência extraídas com o método Nucleospin Plant II (protocolo 2). Os resultados obtidos (Figura 17) mostram que a maioria dos extratos apresenta ADN amplificável para os *primers* Cita1-F1/ Cita1-R1, excetuando os extratos de *C. sinensis* (EM78), *C.*

aurantium (EM105 e EM124) e *C. grandis* (EM114). Desta forma, verificou-se que este conjunto de *primers* não amplificou 2 das 6 amostras de *C. aurantium*, possivelmente devido a variações intraespecíficas, pelo que não foram utilizados para a identificação desta espécie.

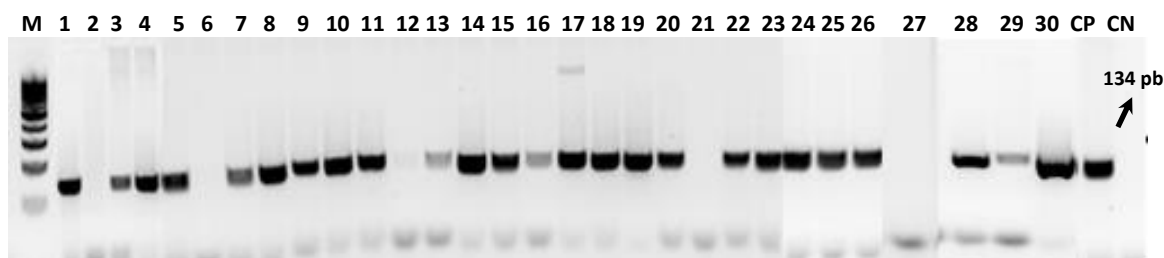


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos de *Citrus* spp. com os primers Cita1-F/ Cita1-R. Legenda: 1– *C. limon*; 2– *C. sinensis*; 3– *C. aurantium* (EM79); 4– *C. medica*; 5– *C. changensis*, 6– *C. myrtifolia*; 7– *C. aurantium* 'Karna' (EM100); 8– *C. 'Ponderosa'*; 9– *C. limonia* 'Australiam Red'; 10– *C. assamensis*; 11– *M. australasica*; 12– *C. aurantium* (EM105); 13– *C. gabuensis*; 14– *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 15– *C. junos* 'Yuzu'; 16– *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17– *C. tangelo*; 18– *C. meyeri*; 19– *C. bergamia* 'Bergamot'; 20– *C. aurantium* 'Variegated' (EM113); 21– *C. grandis*; 22– *C. hystrix*; 23– *C. hystrix* DC.; 24– *C. aurantifolia* (Christm.&Panz.) Swingle; 25– *C. maxima* (Burm.) Merr.; 26 – *C. medica*; 27– *C. aurantium* (EM124); 28– *C. clementina*; 29– *C. paridisi*; 30– *C. reticulada*; M– marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

Posteriormente, utilizaram-se os conjuntos de *primers* Cita2-F/Cita2-R e Cita3-F/Cita3-R, que foram desenhados, respetivamente, sobre uma sequência de um gene anónimo 1 e de um gene anónimo 2, da planta *C. aurantium*. De acordo, com a Figura 18 nenhuma planta do género *Citrus* amplificou com os referidos *primers*. De salientar que na Figura 18B se obtiveram algumas amplificações, mas não específicas. Deste modo, estes pares de *primers* não foram utilizados em estudos futuros.

Assim, à semelhança dos *primers* anteriores, procedeu-se à otimização de ensaios com os *primers* Cita4-F/Cita4-R e Cita5-F/Cita5-R, que foram desenhados nos genes RGAs4-6 like e RGAs4-8 like, respetivamente, de *C. aurantium*. A Figura 19 apresenta os resultados obtidos para a amplificação por PCR para ambos os casos, verificando-se a obtenção de fragmentos com o tamanho esperado para a maioria das espécies testadas. Contudo, no caso do primer Cita4-F/Cita4-R não se verificou amplificação da amostra de *C. sinensis*, enquanto os *primers* Cita5-F/ Cita5-R não amplificaram as amostras *C. limon*, *C. sinensis* e *C. medica*. Deste modo, estes conjuntos de *primers* também não corresponderam ao resultado pretendido, uma vez que amplificam diversas espécies do género *Citrus*, não permitindo a identificação específica da espécie *C. aurantium*. Contudo, ao amplificarem a maioria das espécies, estes conjuntos, em particular Cita4-F/Cita4-R, podem eventualmente ser úteis na identificação do género *Citrus*. Refira-se

ainda que os fragmentos amplificados com o conjunto Cita4-F/Cita4-R parecem apresentar diferentes tamanhos em espécies distintas, o que pode sugerir a existência de deleções/inserções e variações interespecíficas.

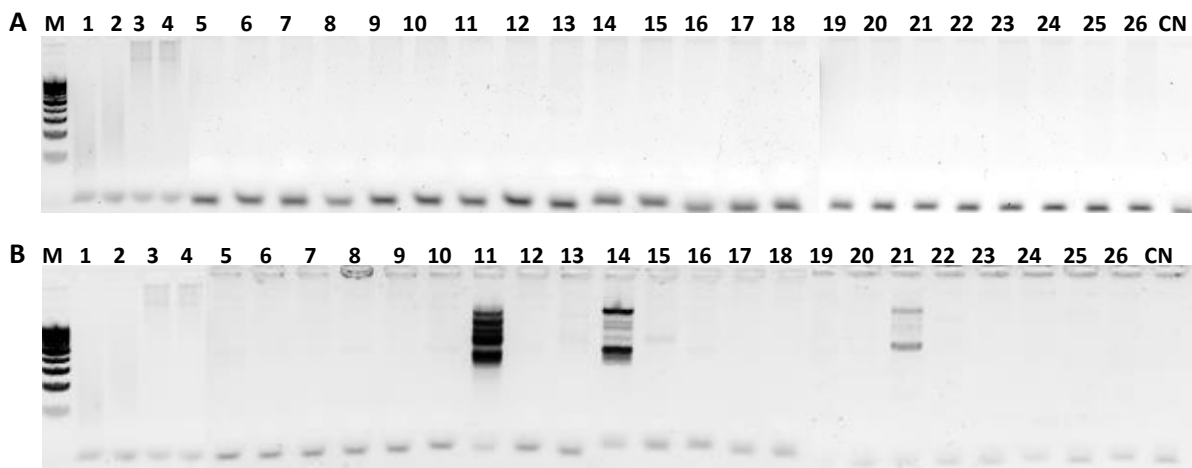


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Citrus*. A- Primers Cita2-F/ Cita2-R e B- Primers Cia3-F/ Cita3-R. Legenda: 1- *C. limon*; 2- *C. sinensis*; 3- *C. aurantium* (EM79); 4- *C. medica*; 5- *C. changensis*, 6- *C. myrtifolia*; 7- *C. aurantium* 'Karna' (EM100); 8- *C. 'Ponderosa'*; 9- *C. limonia* 'Australiam Red'; 10- *C. assamensis*; 11- *M. australasica*; 12- *C. aurantium* (EM105); 13- *C. gabuensis*; 14- *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 15- *C. junos* 'Yuzu'; 16- *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17- *C. tangelo*; 18- *C. meyeri*; 19- *C. bergamia* 'Bergamot'; 20- *C. aurantium* 'Variegated' (EM113); 21- *C. grandis*; 22- *C. hystrix*; 23- *C. hystrix* DC.; 24- *C. aurantifolia* (Christm.&Panz.) Swingle; 25- *C. maxima* (Burm.) Merr.; 26 - *C. medica*; M- marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

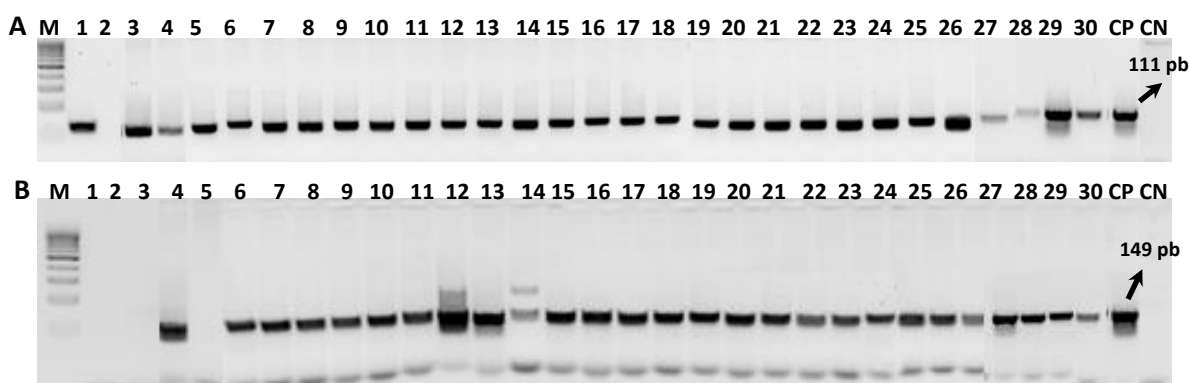


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Citrus*. A- Primers Cita4-F/ Cita4-R e B- Primers Cita4-F/Cita4-R. Legenda: 1- *C. limon*; 2- *C. sinensis*; 3- *C. aurantium* (EM79); 4- *C. medica*; 5- *C. changensis*, 6- *C. myrtifolia*; 7- *C. aurantium* 'Karna' (EM100); 8- *C. 'Ponderosa'*; 9- *C. limonia* 'Australiam Red'; 10- *C. assamensis*; 11- *M. australasica*; 12- *C. aurantium* (EM105); 13- *C. gabuensis*; 14- *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 15- *C. junos* 'Yuzu'; 16- *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17- *C. tangelo*; 18- *C. meyeri*; 19- *C. bergamia* 'Bergamot'; 20- *C. aurantium* 'Variegated' (EM113); 21- *C. grandis*; 22- *C. hystrix*; 23- *C. hystrix* DC.; 24- *C. aurantifolia* (Christm.&Panz.) Swingle; 25- *C. maxima* (Burm.) Merr.; 26 - *C. medica*; M- marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

Na mesma região gene RGAs4-1 like de *C. aurantium*, foram desenhados dois novos conjuntos de *primers*, sendo o *primer forward* (Cita6-F) comum aos dois pares (Cita6-F/ Cita6-R1 e Cita6-F/Cita6-R2), por forma a explorar as diferenças nucleotídicas existentes entre diferentes espécies *Citrus*. Como se pode observar na Figura 20, a aplicação dos *primers* Cita6-F/Cita6-R1 foi aquela que permitiu amplificar um menor número de espécies do género *Citrus*, ou seja, apresentou uma maior seletividade. Este conjunto, permitiu ainda a amplificação de 5 das 6 amostras de *Citrus aurantium*, não amplificando, contudo, uma amostra desta espécie (*C. aurantium* 'Karna', EM100), possivelmente devido a variações intraespecíficas. Quanto aos *primers* Cita6-F/Cita6-R2, estes amplificaram a maioria das espécies do género *Citrus*, tendo-se obtido resultados negativos para 3 amostras de *Citrus aurantium* (EM79, EM105 e EM124). Por este motivo, este conjunto de *primers* não foi utilizado em estudos futuros.

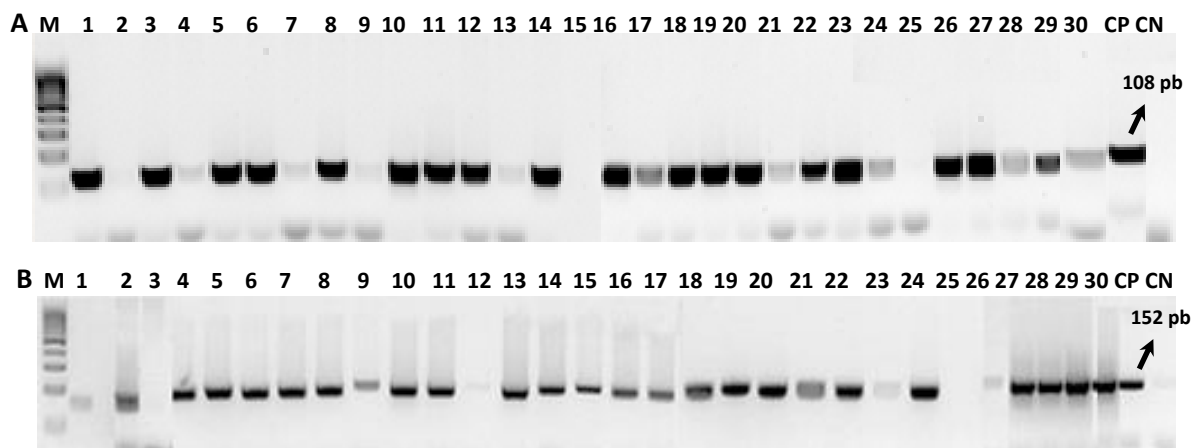


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Citrus*. A- *Primers* Cita6-F/ Cita6-R1 e B- *Primers* Cita6-F/ Cita6-R2. Legenda: 1- *C. limon*; 2- *C. sinensis*; 3- *C. aurantium* (EM79); 4- *C. medica*; 5- *C. changensis*; 6- *C. myrtifolia*; 7- *C. aurantium* 'Karna' (EM100); 8- *C. 'Ponderosa'*; 9- *C. limonia* 'Australiam Red'; 10- *C. assamensis*; 11- *M. australasica*; 12- *C. aurantium* (EM105); 13- *C. gabuensis*; 14- *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 15- *C. junos* 'Yuzu'; 16- *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17- *C. tangelo*; 18- *C. meyeri*; 19- *C. bergamia* 'Bergamot'; 20- *C. aurantium* 'Variegated' (EM113); 21- *C. grandis*; 22- *C. hystrix*; 23- *C. hystrix* DC.; 24- *C. aurantifolia* (Christm.&Panz.) Swingle; 25- *C. maxima* (Burm.) Merr.; 26 - *C. medica*; 27- *C. aurantium* (EM124); 28- *C. clementina*; 29- *C. paridisi*; 30- *C. reticulada*; M- marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

Considerando que a região ITS tem sido descrita por diversos autores como tendo potencial discriminatório em plantas medicinais, na tentativa de conseguir *primers* mais específicos para a deteção específica de *C. aurantium*, desenharam-se os *primers* Cita7-F/Cita7-R na região ITS1 e Cita8-F/Cita8-R na região ITS2 com alvo na referida espécie. Como referido, a região ITS1 possui algumas limitações ao seu uso, como o facto de estar sujeita a uma evolução incompleta, o que pode levar à existência de cópias parálogas

divergentes entre indivíduos e apresentar uma baixa qualidade dos dados de sequenciação e por vezes, de amplificação (Alvarez & Wendel, 2003; China Plant BOL Group et al., 2011; Hollingsworth et al., 2011). Já a região ITS2 é mais curta, o que torna mais fácil a sua sequenciação e a sua amplificação usando um único par de *primers*. Os resultados obtidos com os *primers* Cita7-F/Cita7-R e Cita8-F/Cita8-R apresentam-se na Figura 21, o que mostram que, em ambos os casos, são similares aos obtidos com a utilização de Cita6-F/Cita6-R1, já a maioria das espécies foi amplificada. Tal dever-se-á provavelmente ao facto das espécies de *Citrus* serem compatíveis sexualmente a diferentes níveis, daí que muitos destes citrinos sejam híbridos obtidos por cruzamentos, naturais ou efetuados pelo homem. Atualmente continuam a ser desenvolvidos diversos trabalhos relativos ao estudo da taxonomia dos citrinos, pois a maioria de *Citrus* spp. cultivados são seleções ou híbridos de espécies progenitoras selvagens cujas identidades e contribuições para a domesticação de *Citrus* spp. permanecem controversos (Wu et al., 2014).

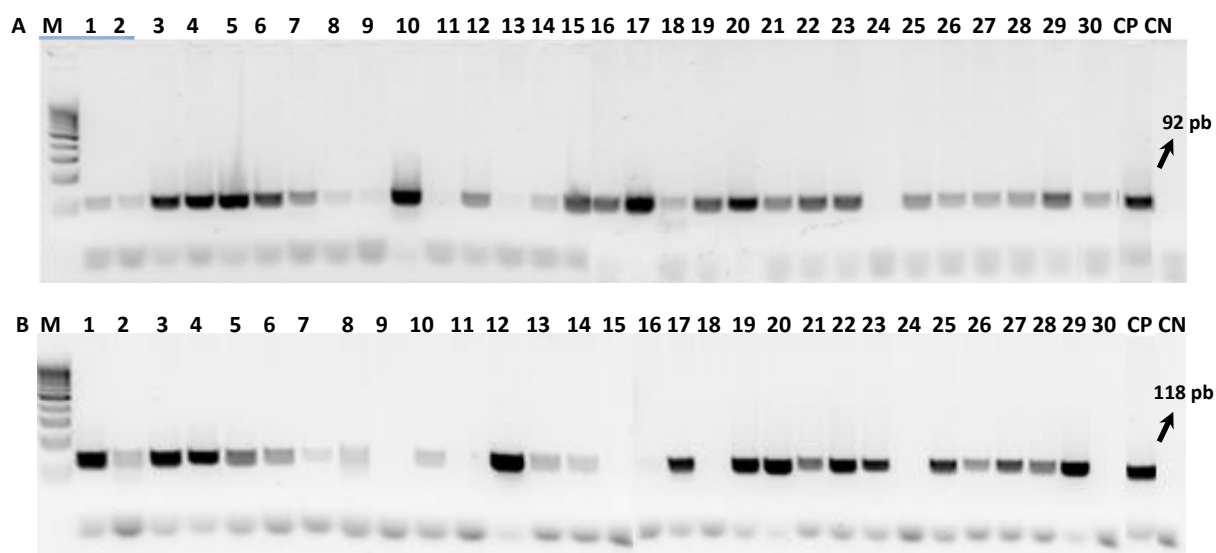


Figura 21: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Citrus* com os *primers* Cita7-F/Cita7-R (A) e Cita8-F/Cita8-R (B). Legenda: 1– *C. limon*; 2– *C. sinensis*; 3– *C. aurantium* (EM79); 4– *C. medica*; 5– *C. changensis*; 6– *C. myrtifolia*; 7– *C. aurantium* 'Karna' (EM100); 8– *C. 'Ponderosa'*; 9– *C. limonia* 'Australiam Red'; 10– *C. assamensis*; 11– *M. australasica*; 12– *C. aurantium* (EM105); 13– *C. gabuensis*; 14– *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 15– *C. junos* 'Yuzu'; 16– *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs' (EM109); 17– *C. tangelo*; 18– *C. meyeri*; 19– *C. bergamia* 'Bergamot'; 20– *C. aurantium* 'Variegated' (EM113); 21– *C. grandis*; 22– *C. hystrix*; 23– *C. hystrix* DC.; 24– *C. aurantifolia* (Christm.&Panz.) Swingle; 25– *C. maxima* (Burm.) Merr.; 26– *C. medica*; 27– *C. aurantium* (EM124); 28– *C. clementina*; 29– *C. paridisi*; 30– *C. reticulada*; M– marcador HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

Desta forma, verifica-se que com estes dois conjuntos de *primers* com alvo em regiões ITS foram obtidas bandas claras, ou inexistência de amplificação, para um número superior de amostras de *C. aurantium* comparativamente aos resultados obtidos com os *primers* Cita6-F/Cita6-R1. Por outro lado, contrariamente a Cita7-F/Cita7-R e Cita8-

F/Cita8-R, os *primers* Cita6-F/Cita6-R1 não amplificaram a espécie *C. sinensis* (laranja doce). Desta forma, considerou-se que o conjunto Cita6-F/Cita6-R1 foi aquele que demonstrou ser mais promissor para a identificação da espécie *C. aurantium*. A Tabela 12 apresentam-se de forma resumida os resultados da amplificação por PCR dos extratos das plantas de referência utilizando os diferentes conjuntos de *primers* com alvo em *C. aurantium*.

Tabela 12: Resultados da amplificação por PCR dos extratos de plantas de referência do género *Citrus* utilizando os diferentes conjuntos de *primers* desenhados.

| Código | Amostra | <i>Primers</i> | | | | | | | | | |
|--------|--|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|-------|-------|
| | | EG | Cita1 | Cita2 | Cita3 | Cita4 | Cita5 | Cita6 | | Cita7 | Cita8 |
| | | | | | | | | R1 | R2 | | |
| EM77 | <i>Citrus limon</i> | + | + | - | - | + | - | + | - | - | - |
| EM78 | <i>Citrus sinensis</i> | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| EM79 | <i>Citrus aurantium</i> | + | + | - | - | + | + | + | - | + | + |
| EM80 | <i>Citrus medica</i> | + | + | - | - | + | - | - | + | + | + |
| EM98 | <i>Citrus ichangensis</i> | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + |
| EM99 | <i>Citrus myrtifolia</i> | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| EM100 | <i>Citrus aurantium 'Karna'</i> | + | + | - | - | + | + | - | + | + | - |
| EM101 | <i>Citrus 'Ponderosa'</i> | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - |
| EM102 | <i>Citrus limonia 'Australiam Red'</i> | + | + | - | - | + | + | - | + | - | - |
| EM103 | <i>Citrus assamensis</i> | + | + | - | - | + | + | + | + | + | - |
| EM104 | <i>Microcitrus australasica</i> | + | + | - | * | + | + | + | + | - | - |
| EM105 | <i>Citrus aurantium</i> | + | - | - | - | + | + | + | - | + | + |
| EM106 | <i>Citropsis gabuensis</i> | + | + | - | - | + | + | - | + | - | - |
| EM107 | <i>Citrus wilsonii 'Ichang Lemon'</i> | + | + | - | * | + | + | + | + | - | - |
| EM108 | <i>Citrus junos 'Yuzu'</i> | + | + | - | - | + | + | - | + | + | - |
| EM109 | <i>Citrus aurantium 'Bouquet de Fleurs'</i> | + | + | - | - | + | + | + | + | + | - |
| EM110 | <i>Citrus tangelo</i> | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + |
| EM111 | <i>Citrus meyeri</i> | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - |
| EM112 | <i>Citrus bergamia 'Bergamot'</i> | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + |
| EM113 | <i>Citrus aurantium 'Variegated'</i> | + | + | - | * | + | + | + | + | + | + |
| EM114 | <i>Citrus grandis</i> | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| EM115 | <i>Citrus hystrix</i> | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + |
| EM116 | <i>Citrus hystrix DC.</i> | + | + | - | - | + | + | + | - | + | + |
| EM117 | <i>Citrus aurantifolia (Christm.&Panz.)Swingle</i> | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - |
| EM118 | <i>Citrus maxima (Burm.)Merr.</i> | + | + | - | - | + | + | - | - | + | + |
| EM119 | <i>Citrus medica L.</i> | + | + | NT | NT | + | + | + | - | + | + |
| EM124 | <i>Citrus aurantium</i> | + | - | NT | NT | + | + | + | + | + | + |
| EM125 | <i>Citrus clementina</i> | + | + | NT | NT | + | + | + | + | + | + |
| EM126 | <i>Citrus paradisi</i> | + | + | NT | NT | + | + | + | + | + | + |
| EM127 | <i>Citrus reticulada</i> | + | + | NT | NT | + | + | + | + | + | - |

*- banda fraca; NT- Não testada

8.1.2.1 Reatividade cruzada

A reatividade cruzada foi apenas testada para o conjunto de *primers* considerados como sendo o mais promissor em termos de identificação específica da espécie *Citrus aurantium* (Cita6-F/Cita-R1). Deste modo, procedeu-se à amplificação por PCR de extratos obtidos de 47 amostras de plantas medicinais potencialmente presentes em infusões e suplementos contendo laranja-amarga. Como se pode observar na Figura 22, a aplicação com os *primers* Cita6-F/Cita-R1 permitiu obter uma banda apenas para a espécie de *C. aurantium* utilizada como controlo positivo, demonstrando assim a sua especificidade.

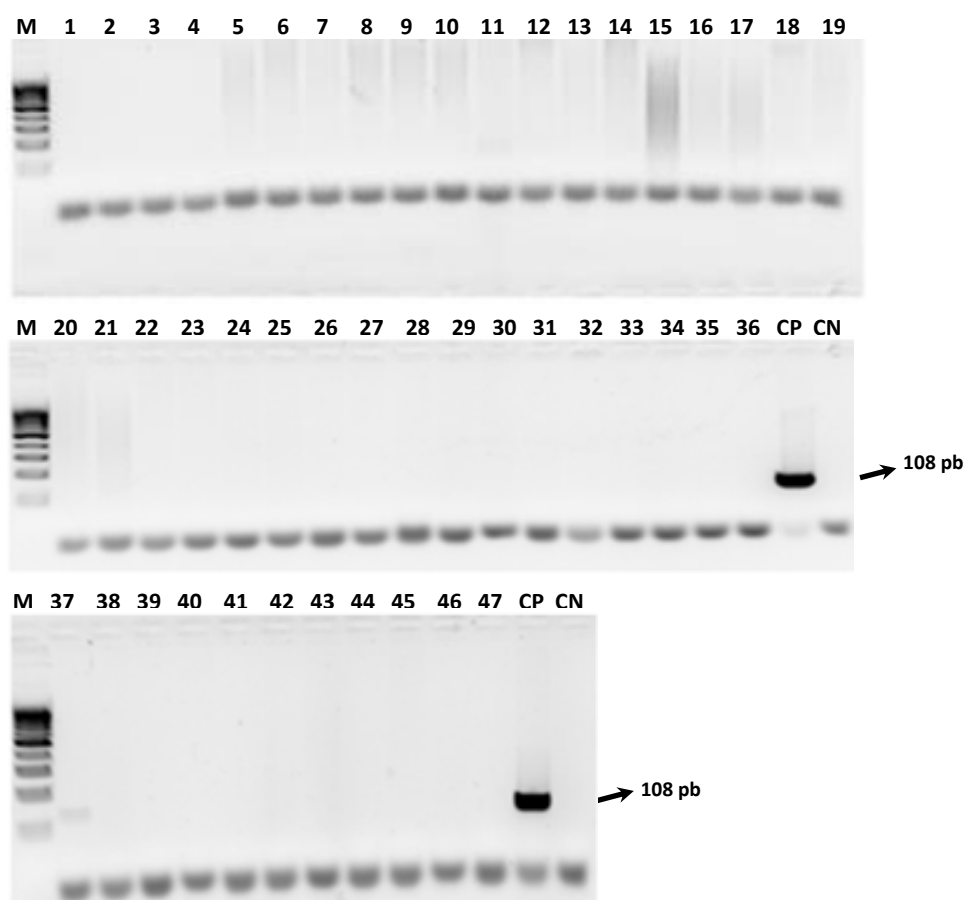


Figura 22: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Citrus* com os *primers* Cita6-F/ Cita6-R1. Legenda: 1– Erva ríncipe; 2– Funcho; 3– Dente-de-leão; 4– Cavalinha); 5– Sálvia; 6– Hortelã-pimenta; 7– Sene; 8– Tília; 9– Uva-ursina; 10– S. Roberto; 11– Passiflora; 12– Pés de cereja; 13– Alecrim; 14– Camomila; 15– Nogueira; 16– Oliveira; 17– *Ephedra californica*; 18– *E. torreyana*; 19– *E. viridis*; 20– *E. aphylla*; 21– *E. fragilis*; 22– *E. gerardiana*; 23– *E. distachya*; 24– *E. tweediana*; 25– *Ephedra* sp. (EM89); 26– *Ephedra* sp. (EM90); 27– *E. fragilis* (EM91); 28– *E. chilensis*; 29– *E. gerardiana* (EM93); 30– *E. distachya* (EM95); 31– *E. fragilis* (EM94); 32– *E. major* (EM97); 33– *E. sinica* (EM120); 34– *E. gerardiana* (EM121); 35– *E. sinica* (EM122); 36– *E. sinica* (EM123); 37– Boldo; 38– Verbena; 39– Espinheiro alvar; 40– Cardo mariano; 41– Oregãos; 42– Manjeriço; 43– Coentros; 44– Açafraão das índias; 45– Lúcia-lima; 46– Eucalipto; 47– Castanheiro-da-índia; CP- controlo positivo; CN- controlo negativo; M– marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

8.1.3 PCR em tempo real com análise por HRM

A amplificação por PCR em tempo real com análise HRM foi inicialmente realizada com as espécies que amplificaram positivamente com os *primers* Cita6-F/Cita6-R, com o intuito de tentar discriminar *C. aurantium* das restantes espécies do género *Citrus*. Contudo, verificou-se a inexistência de separação clara das diferentes espécies em *clusters* distintos, sendo que em alguns casos algumas réplicas da mesma amostra pertenceram a diferentes *clusters*. Tal deve-se potencialmente ao facto de várias destas espécies serem híbridos. Como referido, a taxonomia e filogenia do género *Citrus* é considerada como sendo muito complicada e controversa, devido à compatibilidade sexual com plantas de outros géneros próximos, à frequência elevada de mutações e à sua ampla dispersão global (Nicolosi et al., 2000). Seguidamente procedeu-se à avaliação das diferentes amostras de *C. aurantium* por PCR em tempo real por forma a verificar a possível existência de variações intraespecíficas (Figura 23).

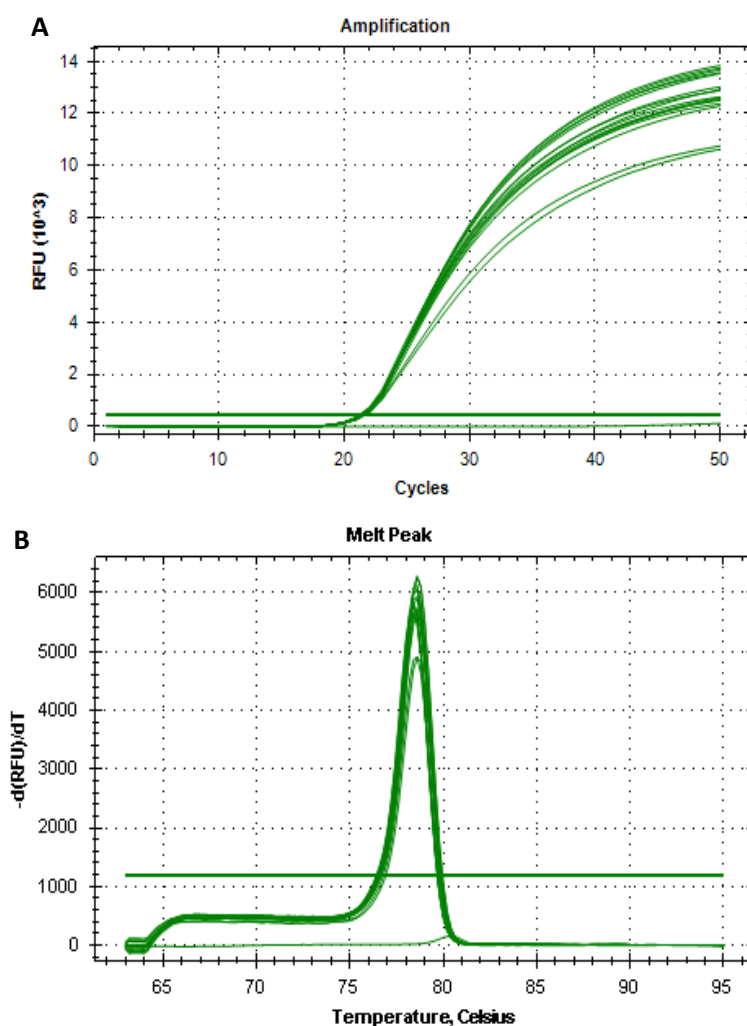


Figura 23: Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real com corante EvaGreen (A) e respetivas curvas de desnaturação (B) de amostras de *Citrus aurantium* e com os *primers* Cita6-F/Cita6-R1.

A análise dos perfis obtidos nas curvas de desnaturação (Figura 23B) permite observar a formação de um pico de temperatura por volta dos 78°C, para as amostras de *Citrus aurantium* amplificadas por PCR em tempo real com o corante EvaGreen e com os primers Cita6-F/Cita6-R1. Este resultado sugere que os produtos de PCR terão uma composição e tamanho muito semelhantes, como expectável tratando-se de amostras da mesma espécie.

Seguidamente, procedeu-se à análise por HRM utilizando o software específico para esta finalidade, a qual permite através de pequenos incrementos de temperatura, avaliar a taxa de dissociação da cadeia dupla de ADN em cadeia simples, criando perfis de curvas de desnaturação com maior definição que permitem distinguir os diferentes fragmentos de acordo com pequenas diferenças nos ácidos nucleicos (Figura 24).

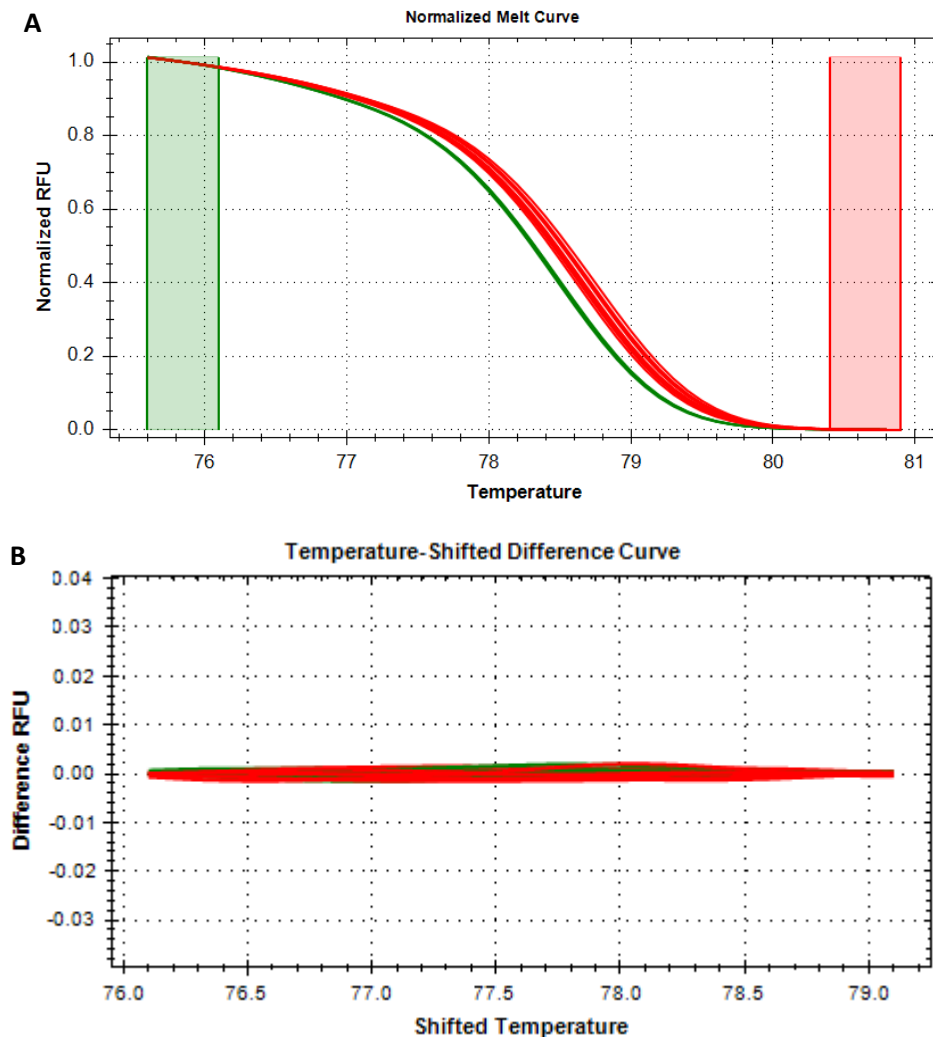


Figura 24: Gráfico das curvas normalizadas (A) e de diferença (B) obtidas por análise HRM das amostras de *Citrus aurantium* com o corante EvaGreen e com os primers Cita6-F/Cita6-R1. Cluster vermelho – EM105, EM113 e EM124; Cluster verde – EM109.

Os resultados obtidos pela análise por HRM, demonstram a existência de diferenças entre as amostras uma vez que estas foram incluídas em 2 grupos distintos, com um grau de confiança acima de 98% e 99,9% para os *clusters* vermelho e verde, respetivamente (Figura 24). Apesar da espécie *C. aurantium* EM109 ter sido incluída no *cluster* verde e as restantes amostras (EM105, EM113 e EM124) no *cluster* vermelho, o que denota a existência de variações intraespecíficas, refira-se que ambos os grupos parecem apresentar uma grande proximidade, pelo que a sua diferenciação poderá eventualmente dever-se a diferenças num único nucleótido. Para confirmação desta hipótese, em trabalhos futuros deveria ser realizada a sequenciação destes fragmentos.

Assim, com base na globalidade dos resultados obtidos para a diferenciação de *Citrus* spp., conclui-se que a utilização dos *primers* selecionados para realização de PCR em tempo real com análise de HRM não permite a identificação específica de *C. aurantium*. Contudo, estes *primers* poderão ser usados para um *screening* inicial, permitindo a diferenciação de algumas espécies de *Citrus*, em particular entre *C. aurantium* e *C. sinensis*, para os quais parece existir alguma confusão a nível da designação comercial vulgarmente utilizada.

8.2 Desenvolvimento de metodologias para diferenciação de *Ephedra* spp.

8.2.1 Avaliação dos extratos de ADN

Relativamente à extração do ADN das plantas do género *Ephedra*, sob a forma de sementes, folhas, ramos ou caules, utilizou-se método NucleoSpin Plant II, protocolo 2. Adicionalmente, adquiriu-se um extrato de ADN (25 µL) referente à espécie *Ephedra sinica* (EM120), sendo este proveniente do Royal Botanic Gardens Kew DNA Bank. Não tendo sido fornecida qualquer informação relativamente à concentração e pureza desta amostra de ADN, procedeu-se à sua avaliação, tal como para as restantes amostras. Os resultados da concentração e pureza do ADN obtidos para as diferentes amostras encontram-se apresentados na Tabela 13. De um modo geral, os extratos encontraram-se dentro dos limites de pureza requeridos. Os valores de concentração de ADN variaram entre 6,3 ng/µL para *E. tweediana* (EM88) e 385,9 ng/µL para *E. gerardiana* (EM93).

A integridade do ADN genómico das plantas foi avaliada através da realização de uma eletroforese em gel de agarose. Os resultados, apresentados na Figura 25, indicaram a presença de ADN integro de elevado peso molecular (~10.000 pb) para a maioria das amostras. Contudo, verifica-se a presença de arrastamentos em algumas amostras, o que indica a presença de ADN degradado. Este facto poderá relacionar-se com o mau

acondicionamento no envio destas amostras. No entanto, de uma forma global, todos os extratos das espécies de referência foram considerados como tendo concentração, qualidade e integridade adequados para posteriormente serem amplificados por PCR.

Tabela 13: Valores das purezas e concentrações médias do ADN extraído das amostras referentes ao género *Ephedra*.

| Código | Amostras | Tipo de amostra | Pureza (A260/A280) | Concentração (ng/μL) |
|--------|----------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|
| EM81 | <i>Ephedra californica</i> | Sementes | 1,9 | 337,7 |
| EM82 | <i>Ephedra torreyana</i> | Sementes | 1,8 | 152,1 |
| EM83 | <i>Ephedra viridis</i> | Sementes | 1,8 | 48,3 |
| EM84 | <i>Ephedra aphylla</i> | Sementes | 1,9 | 224,7 |
| EM85 | <i>Ephedra fragilis</i> | Sementes | 2,0 | 186,8 |
| EM86 | <i>Ephedra gerardiana</i> | Sementes | 1,9 | 103,9 |
| EM87 | <i>Ephedra distachya</i> | Folhas | 1,9 | 133,0 |
| EM88 | <i>Ephedra tweediana</i> | Folhas | 1,5 | 6,3 |
| EM89 | <i>Ephedra sp.</i> | Folhas | 2,0 | 274,3 |
| EM90 | <i>Ephedra sp.</i> | Folhas | 1,7 | 184,9 |
| EM91 | <i>Ephedra fragilis</i> | Ramos | 1,9 | 111,0 |
| EM92 | <i>Ephedra chilensis</i> | Ramos | 2,0 | 346,5 |
| EM93 | <i>Ephedra gerardiana</i> | Ramos | 1,9 | 385,9 |
| EM94 | <i>Ephedra fragilis</i> | Ramos | 2,1 | 323,2 |
| EM95 | <i>Ephedra distachya</i> | Ramos | 1,9 | 288,3 |
| EM96 | <i>Ephedra major</i> | Sementes | 1,6 | 38,1 |
| EM97 | <i>Ephedra major</i> | Ramos | 2,1 | 277,8 |
| EM120 | <i>Ephedra sínica</i> | Extrato de ADN 25 μL | 1,8 | 178,0 |
| EM121 | <i>Ephedra gerardiana</i> | Ramos | 2,0 | 158,8 |
| EM122 | <i>Ephedra sínica</i> | Ramos | 1,9 | 195,7 |
| EM123 | <i>Ephedra sínica</i> | Sementes | 2,1 | 38,7 |
| EM139 | <i>Ephedra equisetina</i> | Caules | 2,0 | 225,4 |

Relativamente à verificação da capacidade de amplificação dos extratos, utilizou-se um conjunto de *primers* universais (EG-F/EG-R) específico para as regiões de ADN universais (18S rRNA) de modo a amplificar todas as espécies eucariotas. A Figura 26 mostra a eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das plantas, usando os *primers* EG-F/EG-R. Os resultados evidenciam que, no total de vinte e duas amostras analisadas, apenas três não amplificaram, nomeadamente *Ephedra sp.* (EM90), *E. fragilis* (EM91) e *E. fragilis* (EM94). Possivelmente, este facto deve-se à má qualidade de armazenamento aquando do envio das amostras, ocorrendo degradação do ADN, uma vez que uma das três amostras de *E. fragilis* amplificou com os *primers* EG-F/EG-R. Todas as restantes amostras amplificaram positivamente, apesar de algumas amostras apresentarem bandas ténues.

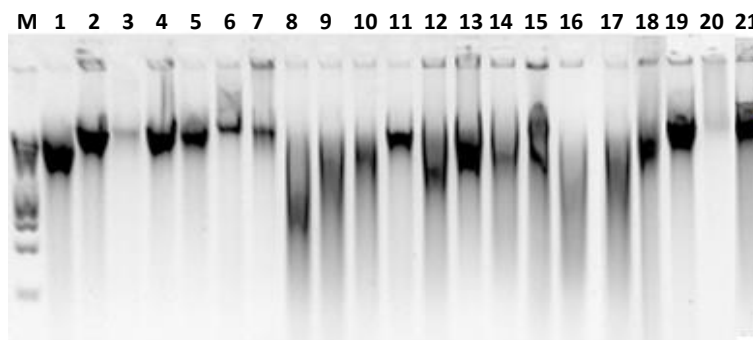


Figura 25: Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico extraído pelo método NucleoSpin Plant II, (protocolo 2) de todas as espécies pertencentes ao género *Ephedra*. Legenda: 1– *E. californica*; 2– *E. torreyana*; 3– *E. viridis*; 4– *E. aphylla*; 5– *E. fragilis*, 6– *E. gerardiana* (EM86); 7– *E. distachya*; 8– *E. tweediana*; 9– *Ephedra* sp. (EM89); 10– *Ephedra* sp. (EM90); 11– *E. fragilis*; 12– *E. chilensis*; 13– *E. gerardiana* (EM93); 14– *E. fragilis*; 15– *E. distachya*; 16– *E. major* (EM96); 17– *E. major* (EM97); 18– *E. gerardiana* (EM121); 19– *E. sinica* (EM122); 20– *E. sinica* (EM123); 21– *E. equisetina*; M– marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

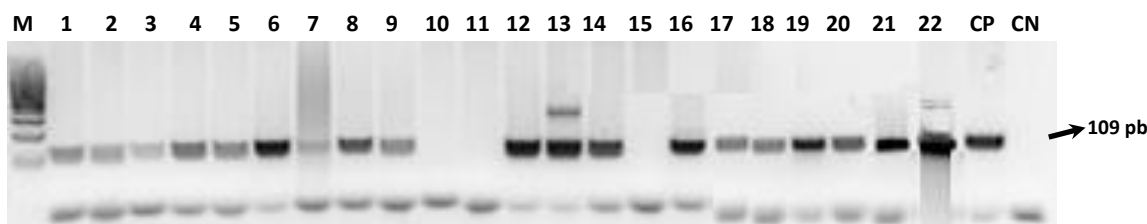


Figura 26: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Ephedra* com os primers EG-F/EG-R. Legenda: 1– *E. californica*; 2– *E. torreyana*; 3– *E. viridis*; 4– *E. aphylla*; 5– *E. fragilis*, 6– *E. gerardiana* (EM86); 7– *E. distachya*; 8– *E. tweediana*; 9– *Ephedra* sp. (EM89); 10– *Ephedra* sp. (EM90); 11– *E. fragilis*; 12– *E. chilensis*; 13– *E. gerardiana* (EM93); 14– *E. fragilis*; 15– *E. distachya*; 16– *E. major* (EM96); 17– *E. major* (EM97); 18– *E. gerardiana* (EM121); 19– *E. sinica* (EM122); 20– *E. sinica* (EM123); 21– *E. equisetina*; M– marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

8.2.2 Desenvolvimento de primers específicos

Para a deteção específica da espécie *Ephedra sinica* foram desenhados *primers* com alvo em dois genes plastidiais (Aromatic aminotransferase 2 mRNA e Mcd1 mRNA) e duas regiões nucleares (ITS1 e ITS2), tendo sido propostos os seguintes conjuntos de *primers*: Eph1-F/Eph1-R, Eph2-F/Eph2-R, Eph3-F/Eph3-R, Eph4-F/Eph4-R. Todos os ensaios de PCR foram otimizados no que respeita ao programa de temperaturas e aos componentes da reação antes de serem aplicados às amostras das plantas de referência, utilizando-se para tal um extrato de *E. sinica*.

A Figura 27 apresenta os resultados obtidos com os conjuntos de *primers* desenhados sobre genes plastidiais (Eph1-F/Eph1-R e Eph2-F/Eph2-R). No primeiro caso (Eph1-F/Eph1-R), verificou-se a amplificação de várias amostras, tendo-se obtido bandas fortes para as espécies de *E. gerardiana* (EM86, EM93 e EM 121), *E. distachya* (EM87) e

E. sinica (EM122 e EM123). Pretendendo-se propor *primers* específicos para *E. sinica*, estes *primers* não se mostraram adequados. Já para os *primers* Eph2-F/Eph2-R não se obteve amplificação para nenhuma amostra do género *Ephedra*.

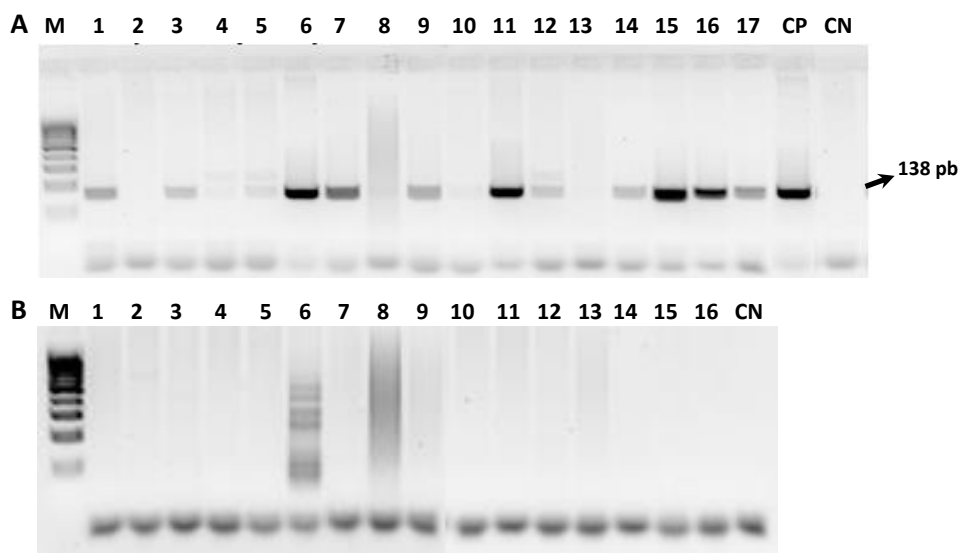


Figura 27: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Ephedra* com os *primers* Eph1-F/Eph1-R (A) e Eph2-F/Eph2-R (B). Legenda: 1– *E. californica*; 2– *E. torreyana*; 3– *E. viridis*; 4– *E. aphylla*; 5– *E. fragilis*; 6– *E. gerardiana* (EM86); 7– *E. distachya*; 8– *E. tweediana*; 9– *Ephedra* sp. (EM89); 10– *E. chilensis*; 11– *E. gerardiana* (EM93); 12– *E. distachya*; 13– *E. major*; 14– *E. sinica* (EM120); 15– *E. gerardiana* (EM121); 16– *E. sinica* (EM122); 17– *E. sinica* (EM123); M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP– Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

Sendo a região ITS referida por muitos autores como tendo potencial para discriminação de plantas medicinais, e estando disponíveis no Genbank sequências desta região para diversas espécies de *Ephedra*, optou-se pelo desenho de novos *primers* que pudessem amplificar de uma forma geral todas as espécies (funcionado como marcadores de género) e que amplificassem especificamente *E. sinica*. Desta forma, procedeu-se ao alinhamento das sequências disponíveis, com base no qual foram desenhados os conjuntos Eph3-F/Eph3-R (Figura 28), com vista à amplificação de um fragmento comum às diferentes espécies, e Eph4-F/Eph4-R, com vista à amplificação de um fragmento específico para a espécie *E. sinica* (Figura 29).



Figura 28: Alinhamento das sequências ITS disponíveis no Genbank para diferentes *Ephedra* spp utilizadas no desenho dos primers Eph3-F/Eph3-R.

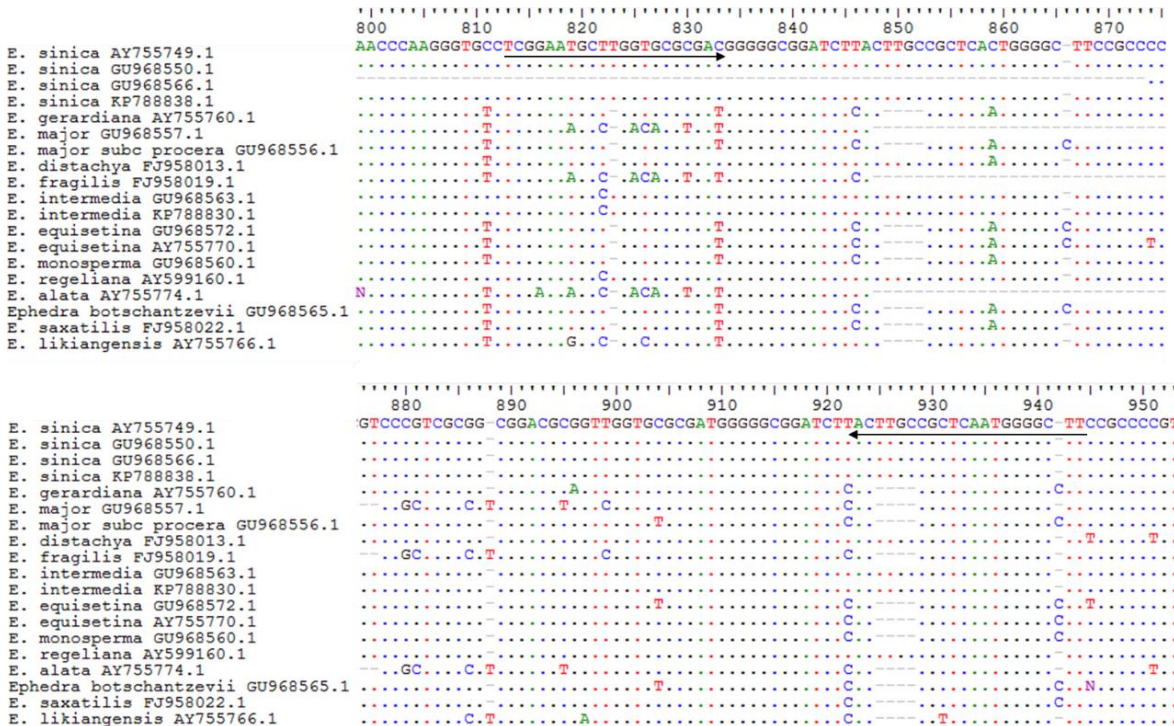


Figura 29: Alinhamento das sequências ITS disponíveis no Genbank para diferentes *Ephedra* spp utilizadas no desenho dos primers Eph4-F/Eph4-R.

A Figura 30 apresenta os resultados obtidos utilizando os *primers* Eph3-F/ Eph3-R, os quais permitiram amplificar todas as amostras das plantas de referência utilizadas. Desta forma, como pretendido, este conjunto de *primers*, poderá ser utilizado para a identificação do género *Ephedra*.

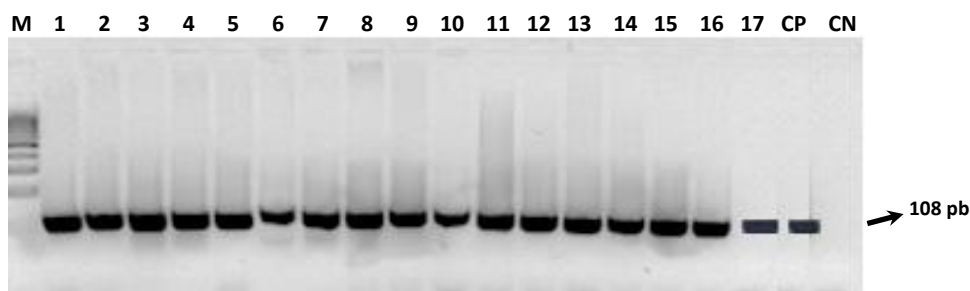


Figura 30: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Ephedra* com os primers Eph3-F/ Eph3-R. Linha 1– E1– *E. californica* (EM81); 2– *E. torreyana* (EM82); 3– *E. viridis* (EM83); 4– *E. aphylla* (EM84); 5– *E. fragilis* (EM85); 6– *E. gerardiana* (EM86); 7– *E. distachya* (EM87); 8– *E. tweediana* (EM88); 9– *Ephedra* sp. (EM89); 10– *E. chilensis* (EM92); 11– *E. gerardiana* (EM93); 12– *E. distachya* (EM95); 13– *E. major* (EM97); 14– *E. equisetina* (EM121); 15– *E. sinica* (EM122); 16– *E. sinica* (EM123); 17– *E. equisetina* (EM139); M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

A Figura 31 apresenta os resultados obtidos pela aplicação dos *primers* Eph4-F/Eph4-R, onde se pode observar a presença de bandas fortes apenas para as amostras *E. distachya* (EM95), *E. sinica* (EM122) e *E. sinica* (EM123). Desta forma, este conjunto demonstrou ser o mais promissor para uma identificação específica da espécie *Ephedra sinica*, tendo sido utilizados nos estudos subsequentes.

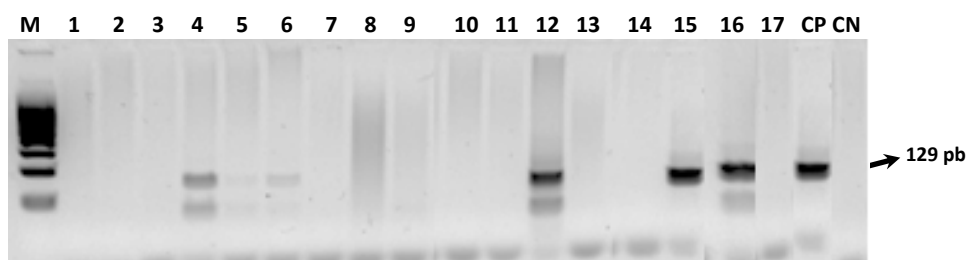


Figura 31: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das espécies do género *Ephedra* com os primers Eph4-F/ Eph4-R. Legenda: 1– *E. californica* (EM81); 2– *E. torreyana* (EM82); 3– *E. viridis* (EM83); 4– *E. aphylla* (EM84); 5– *E. fragilis* (EM85); 6– *E. gerardiana* (EM86); 7– *E. distachya* (EM87); 8– *E. tweediana* (EM88); 9– *Ephedra* sp. (EM89); 10– *E. chilensis* (EM92); 11– *E. gerardiana* (EM93); 12– *E. distachya* (EM95); 13– *E. major* (EM97); 14– *E. equisetina* (EM121); 15– *E. sinica* (EM122); 16– *E. sinica* (EM123); 17– *E. equisetina* (EM139); M – Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN – Controlo negativo.

A compilação dos resultados globais de amplificação por PCR dos extratos das plantas de referências com os diferentes conjuntos de primers testados, é apresentada na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados das amplificações por PCR dos extratos de ADN das amostras do género *Ephedra* usando os *primers* EG-F/EG-R, Eph1-F/Eph1-R, Eph2-F/Eph2-R, Eph3-F/Eph3-R, Eph4-F/Eph4-R.

| Código | Amostra | <i>Primers</i> | | | | |
|--------|----------------------------|----------------|------|------|------|------|
| | | EG | Eph1 | Eph2 | Eph3 | Eph4 |
| EM81 | <i>Ephedra californica</i> | + | + | - | + | - |
| EM82 | <i>Ephedra torreyana</i> | + | - | - | + | - |
| EM83 | <i>Ephedra viridis</i> | + | + | - | + | - |
| EM84 | <i>Ephedra aphylla</i> | + | - | - | + | + |
| EM85 | <i>Ephedra fragilis</i> | + | - | - | + | - |
| EM86 | <i>Ephedra gerardiana</i> | + | + | - | + | - |
| EM87 | <i>Ephedra distachya</i> | + | + | - | + | - |
| EM88 | <i>Ephedra tweediana</i> | + | - | - | + | - |
| EM89 | <i>Ephedra sp.</i> | + | + | - | + | - |
| EM90 | <i>Ephedra sp.</i> | - | NT | NT | NT | NT |
| EM91 | <i>Ephedra fragilis</i> | - | NT | NT | NT | NT |
| EM92 | <i>Ephedra chilensis</i> | + | - | - | + | - |
| EM93 | <i>Ephedra gerardiana</i> | + | + | - | + | - |
| EM94 | <i>Ephedra fragilis</i> | - | NT | NT | NT | NT |
| EM95 | <i>Ephedra distachya</i> | + | - | - | + | + |
| EM96 | <i>Ephedra major</i> | PQ | NT | NT | NT | NT |
| EM97 | <i>Ephedra major</i> | + | - | - | + | - |
| EM120 | <i>Ephedra sinica</i> | + | - | - | NT | NT |
| EM121 | <i>Ephedra gerardiana</i> | + | + | - | + | - |
| EM122 | <i>Ephedra sinica</i> | + | + | - | + | + |
| EM123 | <i>Ephedra sinica</i> | + | + | - | + | + |
| EM139 | <i>Ephedra equisetina</i> | + | NT | NT | + | - |

PQ- pouca quantidade de amostra fornecida, erro na extração; *- banda fraca; NT- Não testada.

8.2.2.1 Reatividade cruzada

Seguidamente, procedeu-se à avaliação da especificidade dos *primers* propostos Eph4-F/Eph4-R, tendo para tal sido testada a reatividade cruzada com extratos de diversas outras plantas medicinais. A Figura 32 apresenta os resultados obtidos evidenciando a ausência de amplificação para todas as 51 amostras testadas, à excepção do controlo positivo. Desta forma, concluiu-se que os *primers* apresentam uma elevada especificidade.

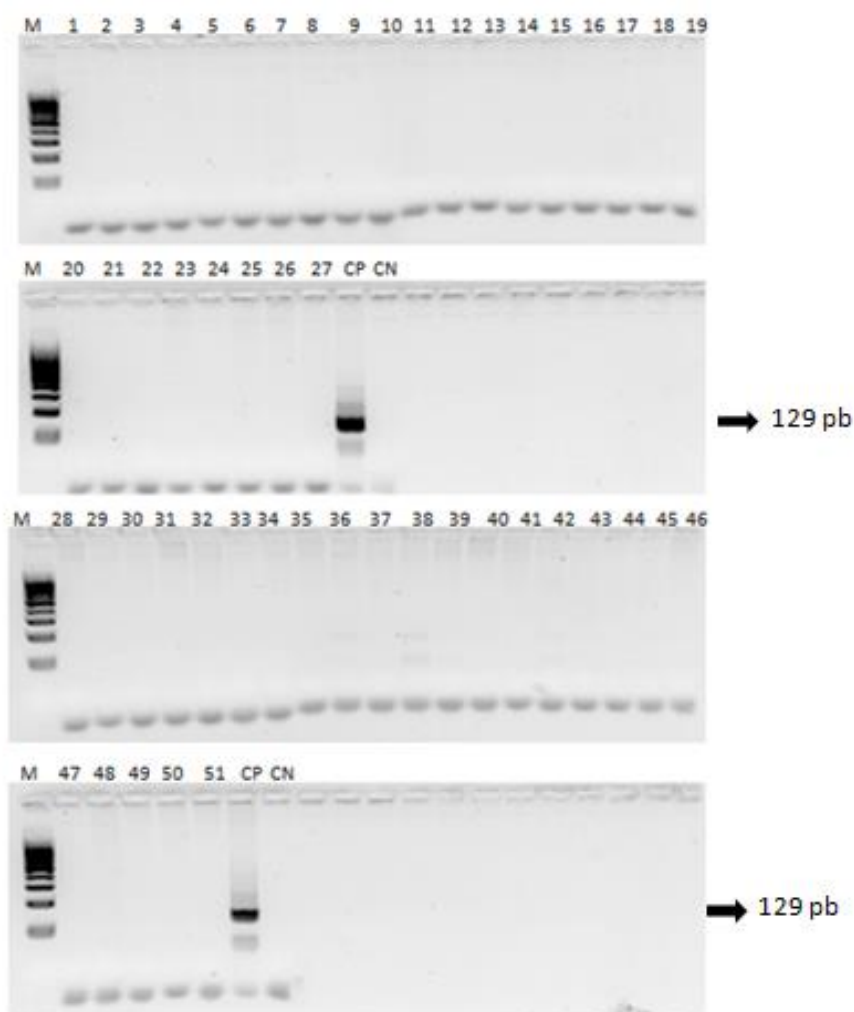


Figura 32: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos para estudo da reatividade cruzada com os primers Eph4-F/ Eph4-R. Legenda: 1- Erva príncipe; 2- Funcho; 3- Dente-de-leão; 4- Cava; 5- Sálvia; 6- Hortelã-pimenta; 7- Sene; 8- Tília; 9- Uva-ursina; 10- Erva de S. Roberto; 11- Passiflora; 12- Verbena; 13- Valeriana; 14- Oregãos; 15- Manjeriço; 16- Coentros; 17- Pés de cereja; 18- Lúcia-lima; 19- Eucalipto; 20- Alecrim; 21- *C. limon*; 22- *C. sinensis*; 23- *C. aurantium*; 24- *C. medica*; 25- *C. limonia*; 26 - *C. paradisi*; 27- *C. changensis*; 28- *C. myrtifolia*; 29- *C. aurantium* 'Karna'; 30- *C. 'Ponderosa'*; 31- *C. limonia* 'Australiam Red'; 32- *C. assamensis*; 33- *M. australasica*; 34- *C. aurantium* (EM105); 35- *C. gabuensis*; 36- *C. wilsonii* 'Ichang Lemon'; 37- *C. junos* 'Yuzu'; 38- *C. aurantium* 'Bouquet de Fleurs'; 39- *C. tangelo*; 40- *C. meyeri*; 41- *C. bergamia* 'Bergamot'; 42- *C. aurantium* 'Variegated'; 43- *C. grandis*; 44- *C. hystrix*; 45- *C. hystrix* DC.; 46- *C. aurantifolia*; 47- *C. maxima*; 48- *C. medica*; 49- *C. aurantium* (EM124); 50- *C. clementina*; 51- *C. paridisi*; M - Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN - Controlo negativo.

8.2.3 PCR em tempo real com análise por HRM

A técnica PCR em tempo real foi utilizada com o objetivo de diferenciar as seguintes espécies, *E. aphylla*, *E. distachya* e *E. sinica* uma vez que todas elas amplificaram na PCR convencional utilizando os *primers* considerados como mais promissores (Eph4-F/Eph4-R). Nesta técnica, utilizou-se o corante Evagreen por forma a

permitir realizar a análise por HRM, sendo a análise de cada espécie efetuada em quadruplicado.

A análise dos perfis das curvas de desnaturação (Figura 33) revela a presença de mais do que um pico, contudo, apresentando um pico principal por volta dos 89°C. Este facto parece indicar que os produtos de PCR poderão ter uma composição com algumas diferenças, sendo, contudo, difícil efetuar a diferenciação das amostras apenas com base na análise de desnaturação convencional.

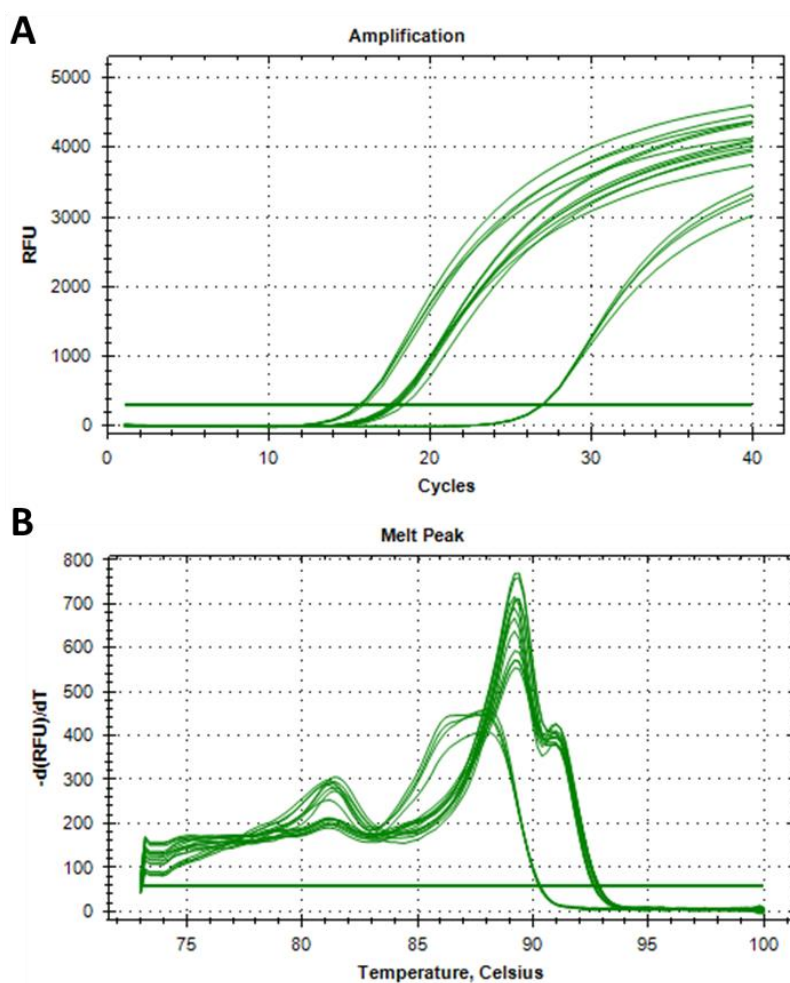


Figura 33: Curvas de amplificação das espécies de *E. aphylla*, *E. distachya* e *E. sinica* com os primers Eph4-F/Eph4-R (A) e respetivas curvas de desnaturação (B) obtidas por PCR em tempo real com o corante EvaGreen.

Seguidamente, procedeu-se à análise por HRM (Figura 34), a qual sugeriu algumas diferenças entre as espécies, incluindo-as em 4 grupos distintos, com um grau de confiança superior a 99%. Nesta análise, a espécie *E. aphylla* (EM84) foi incluída no *cluster* vermelho, a espécie *E. sinica* (EM123) no *cluster* verde, a espécie *E. distachya* (EM95) no *cluster* azul e por último a espécie *E. sinica* (EM122) foi incluída no *cluster* laranja. Apesar de ser expectável que ambas as amostras de *E. sinica* utilizadas fossem

integradas no mesmo *cluster*, tal não se verificou, o que pode indicar a existência de variações intraespecíficas.

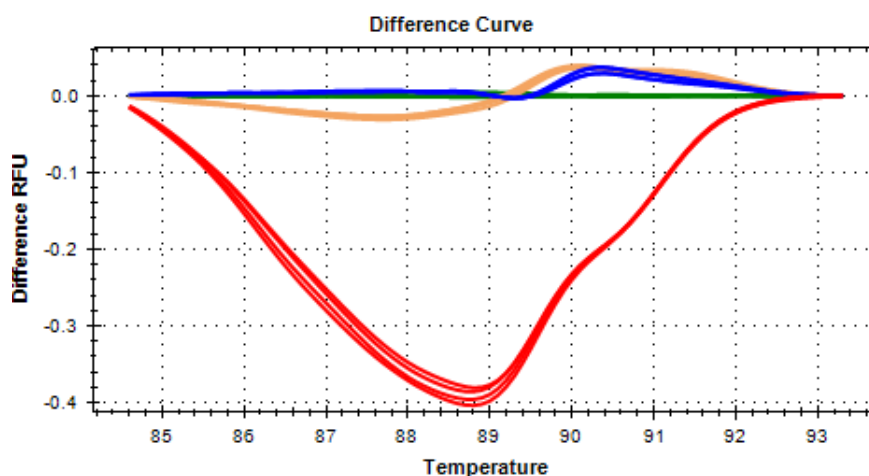


Figura 34: Gráfico da curva de diferença por análise HRM, obtido após amplificação das amostras de *Ephedra* spp. por PCR em tempo real com o corante EvaGreen utilizando os primers Eph4-F/Eph4-R1. Cluster vermelho – *E. aphylla* (EM84); Cluster verde – *E. sinica* (EM123); Cluster azul- *E. distachya* (EM95); Cluster laranja- *E. sinica* (EM122).

8.3 Análise de infusões para emagrecimento

8.3.1 Avaliação dos extratos de ADN

Para a extração do ADN das amostras comerciais de infusões para emagrecimento utilizou-se o método CTAB 1%PVP. Tal como nos ensaios anteriores, procedeu-se à avaliação da concentração, pureza e integridade dos extratos, cujos resultados se apresentam na Tabela 15. Excetuando a amostra EM72, que apresentou uma pureza muito baixa (1,0), indicando uma possível contaminação do seu extrato com proteínas e/ou outros compostos, os restantes extratos apresentaram valores adequados de pureza. A mesma amostra (EM72) apresentou ainda um rendimento de extração muito baixo, apresentando uma concentração de ADN de apenas 2,9 ng/ μ L. As restantes apresentaram rendimentos de ADN satisfatórios, variando entre 40,7 ng/ μ L para a amostra EM74 e 134,3 ng/ μ L para a amostra EM129.

Tabela 15: Valores das purezas e concentrações médias do ADN extraído das amostras de infusões.

| Código | Amostras | Pureza (A260/A280) | Concentração (ng/ μ L) |
|--------|------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| EM72 | Laranjeira Flor | 1,0 | 2,9 |
| EM73 | Laranjeira Flor | 2,1 | 73,9 |
| EM74 | GOTU KOLA + CASCA DE LARANJA | 1,8 | 40,7 |
| EM75 | Detox + Controlo de peso | 1,9 | 116,4 |
| EM76 | Diet Linha | 2,1 | 93,8 |
| EM129 | Mix de plantas naturais | 2,0 | 134,3 |

A Figura 35 mostra os resultados da avaliação da integridade do ADN genómico das infusões, onde se verificou a sua elevada integridade pelo peso molecular (~10.000 pb) obtido para a maioria amostras. Para a amostra EM129 foi visível um arrastamento correspondendo a ADN fragmentado, enquanto na amostra EM72 não foi visível nenhuma banda, o que poderá ser devido à concentração ser muito baixa neste extrato.

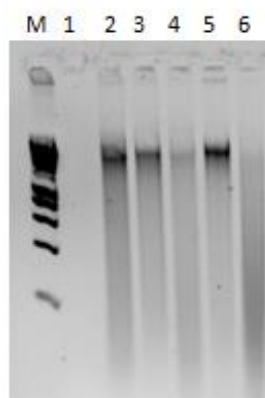


Figura 35: Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico das amostras de infusões extraído pelo método CTAB 1% PVP. Legenda: 1- Laranjeira Flor (EM72); 2- Laranjeira Flor (Salutem) (EM873; 3- gotu kola + casca de laranja (Celeiro dieta) (EM74); 4- Detox + Control de peso (Naturefoods) (EM75); 5- Diet Linha (CelliSlim Juvamine) (EM76), 6- Mix de plantas naturais (PROSONO) (EM129); M- marcador HypperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

Todos os extratos obtidos foram submetidos a amplificação com *primers* universais (EG-F/EG-R), de modo a verificar a sua capacidade de amplificação. A Figura 36 mostra os produtos da PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das infusões de plantas medicinais, podendo-se verificar que todas as amostras apresentaram ADN de qualidade adequada para amplificação.

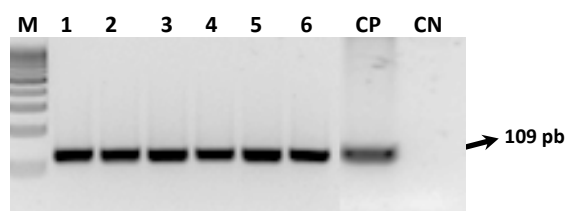


Figura 36: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das infusões com os *primers* EG-F/EG-R. Legenda: 1- Laranjeira Flor (EM72); 2- Laranjeira Flor (EM73); 3- Gotu Kola + Casca de Laranja (EM74); 4- Detox + Controlo de peso (EM75); 5- Diet (EM76), 6- Mix de plantas naturais (EM129); M - Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN - Controlo negativo.

8.3.2 Detecção das espécies *Citrus aurantium* e *Ephedra sinica*

No sentido de identificar a presença das espécies *C. aurantium* e *E. sinica* nas amostras de infusões e verificar a conformidade com a sua rotulagem, efetuaram-se os ensaios de PCR com os *primers* Cita6-F/Cita6-R1 e Eph4-F/Eph4-R, respetivamente, uma vez que estes demonstraram ser os mais promissores para as espécies referidas (Figura

37). No que respeita a *C. aurantium*, com base na informação descrita no rótulo, seria expectável detectar a sua presença em todas as amostras, exceto na infusão EM74 que descrevia a presença de laranja, *C. sinensis*. No entanto, os resultados obtidos (Figura 37A) não apresentam a presença de nenhuma banda para as amostras analisadas, indicando a ausência de *C. aurantium* para as restantes amostras que continham esta planta indicada na lista de ingredientes. No caso das amostras EM72, EM74 e EM129, refira-se que a rotulagem é um pouco dúbia, uma vez que referem a presença de laranjeira (*C. aurantium*), não estando o nome comum e científico da espécie em concordância. Desta forma, poderá eventualmente ter ocorrido um erro na designação científica da planta, estando efetivamente presente laranjeira e não laranja-amarga. No caso da amostra EM75, que descreve a presença de *C. limon* no rótulo, para além de *C. aurantium*, seria ainda mais de esperar a obtenção de um resultado positivo, uma vez que se verificou que os *primers* Cita6-F/Cita6-R1 amplificam ambas as espécies. O resultado negativo sugere, no entanto, a ausência destas espécies. Os resultados obtidos indicam, no geral, alguma confusão nas designações taxonómicas entre laranjeira (*C. sinensis*) e laranja-amarga (*C. aurantium*), pelo que poderão existir trocas de matérias-primas usadas na produção das infusões. Considerando que atualmente os consumidores têm acesso a informação sobre plantas medicinais e sua atividade biológica, será expectável que aqueles que procurem produtos para perda de peso, verifiquem a rotulagem, selecionando

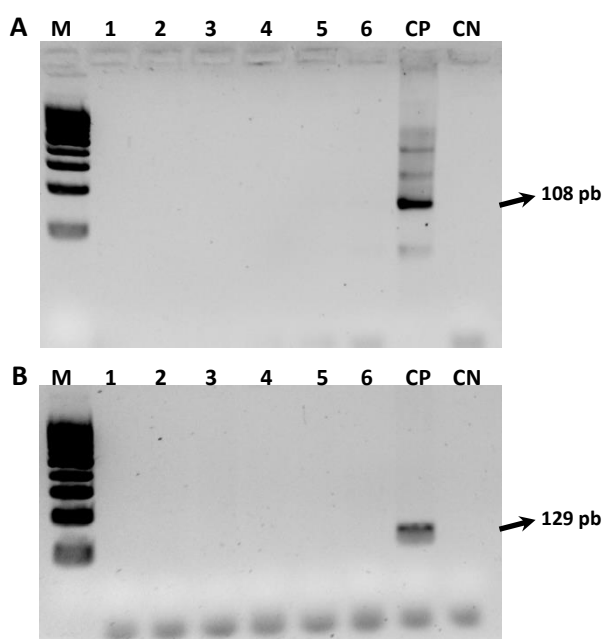


Figura 37: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das infusões. A- *Primers* Cita6-F/Cita6-R1 e B- *Primers* Cita6-F/Cita6-R1. Legenda: 1- Laranjeira Flor (EM72); 2- Laranjeira Flor (EM73); 3- Gotu Kola + Casca de Laranja (EM74); 4- Detox + Control de peso (EM75); 5- Diet (EM76), 6- Mix de plantas naturais (EM129); M- Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN- Controlo negativo.

preferencialmente produtos que contenham laranja-amarga. Dado que a produção de laranja é muito superior à de laranja-amarga, sendo as duas espécies similares, poderá eventualmente ocorrer trocas intencionais, para além da problemática associada à confusão de designações. Desta forma, em estudos futuros, seria desejável o desenvolvimento de metodologias específicas para a deteção de *C. sinensis*, que permitam confirmar a ocorrência de trocas entre estas duas espécies.

Quanto aos resultados com o primer Eph4-F/Eph4-R, não foi obtido qualquer resultado positivo (Figura 37B), o que já seria de esperar, uma vez que não é permitida a utilização de *E. sinica* em infusões comercializadas na UE.

8.4 Análise de suplementos alimentares à base de plantas

8.4.1 Avaliação dos extratos de ADN

Os suplementos alimentares são produtos muito processados e com uma matriz bastante complexa, sendo constituídos por plantas, ou seus extratos, e por uma diversidade de compostos contidos na formulação com finalidades diversas, incluindo ligantes, diluentes, lubrificantes, corantes e estabilizadores, entre outros. No que respeita os PFS comercializados em formas farmacêuticas sólidas (cápsulas e comprimidos), estes incluem frequentemente excipientes tais como sílica, talco, dióxido de titânio e óxido de ferro os quais possuem capacidade para adsorver o ADN, dificultando a sua extração (Costa et al., 2015b). Costa et al. (2015b) refere ainda que, o talco (silicato de magnésio) aparenta ter um efeito de adsorção ao ADN maior do que a sílica. Desta forma, em particular para amostras contendo este tipo de excipientes, a utilização do protocolo de extração como sugerido pelo fabricante poderá resultar em baixos rendimentos de extração, ou, até mesmo, na ineficácia de extração de ADN. De acordo com o estudo realizado por Direito et al. (2012), o qual teve como objetivo a otimização da extração de ADN de bactérias em solos contendo elevados teores de minerais, mimetizando os solos eventualmente presentes em Marte, as amostras de suplementos foram sujeitas a um pré-tratamento com tampão fosfato 1M (pH 8; 15% de etanol). Este tratamento teve como objetivo promover uma competição pelos locais de adsorção e libertar o ADN das plantas medicinais eventualmente adsorvido aos excipientes.

Como referido na seção de Material e Métodos, todos os PFS em estudo foram submetidos a um pré-tratamento com uma solução de tampão fosfato (pH 8; 15% de etanol) e posteriormente extraídos pelo método Nuceospin Plant II (protocolo 2). Após a obtenção dos extratos de ADN, procedeu-se à avaliação da sua concentração, pureza, integridade e capacidade de amplificação. Os valores de pureza foram adequados para algumas amostras, apresentando níveis muito baixos (1,0) ou elevados (2,2) para algumas

amostras (Tabela 16), sugerindo uma eventual contaminação com proteínas e/ou outras substâncias ou com ARN, respetivamente. Relativamente aos resultados rendimentos de ADN, estes variaram entre 2,9 ng/ μ L (EM134) e 576,9 ng/ μ L (EM133). O facto da amostra EM133 apresentar o rendimento de extração mais elevado está de acordo com ausência de excipientes na sua composição excipientes farmacêuticos descritos como tendo capacidade de adsorção de ADN, o que influencia negativamente a extração (Costa et al., 2015b). Pelo mesmo motivo, seria expectável que as amostras EM131, EM132, EM134 e EM138 apresentassem igualmente rendimentos elevados. Tal não se verificou para as amostras EM131, EM134 e EM138, que apresentaram valores de concentração de ADN muito baixos. No caso da amostra EM138, o seu rótulo denotava uma lista de ingredientes incompleta, uma vez que se tratava de um comprimido e não tinha incluído nenhum excipiente farmacêutico na sua formulação. No caso das amostras EM131 e EM134, este resultado poderá ser devido ao facto destes produtos apresentarem uma matriz complexa e serem muito processados, o que pode levar à degradação de ADN. As amostras EM135 e EM136, ambas contendo dióxido de silício, apresentaram baixos valores de concentração de ADN, o que poderá estar relacionado com a sua adsorção a estes excipientes. Já a amostra EM130, apesar de conter óxido de titânio e óxido de ferro, apresentou um rendimento de ADN superior às amostras EM135 e EM136, possivelmente porque estes dois excipientes são frequentemente usados com finalidades corantes, sendo por isso usados em muito baixa quantidade.

Tabela 16: Valores das purezas e concentrações médias do ADN extraído das amostras de suplementos alimentares.

| Código | Amostras | Pureza (A260/A280) | Concentração (ng/μL) |
|---------------|--|-------------------------------|--|
| EM130 | Diet Linha | 2,2 | 57,7 |
| EM131 | Fat Burner Strong | 1,6 | 10,0 |
| EM132 | Comprimidos Brasileiros (termo) | 2,2 | 272,4 |
| EM133 | Comprimidos Brasileiros (drena) | 2,2 | 576,9 |
| EM134 | Cinturina | 1,7 | 2,9 |
| EM135 | Fórmula Brasileira (Detox Super concentrado) | 1,8 | 12,4 |
| EM136 | Fórmula Brasileira (Burn Super concentrado) | 1,8 | 19,3 |
| EM137 | Lipokal | 2,2 | 236,7 |
| EM138 | Comprimido fornecido | 1,0 | 5,9 |
| SA24* | Cápsulas | 2,0 | 10,5 |
| SA27* | Cápsulas | - | -** |

*Resultados obtidos em trabalho anterior. **Não detetável.

A integridade do ADN genómico dos suplementos alimentares foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (Figura 38). A maioria dos extratos não apresentou bandas de elevada massa molecular, não sendo visível a presença de ADN para algumas amostras que apresentaram valores muito baixos de concentração de ADN.

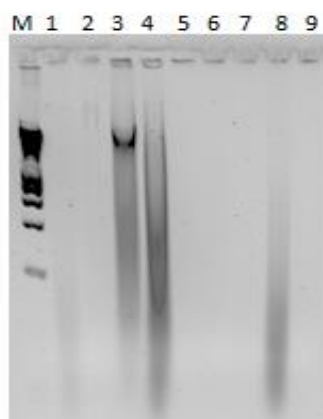


Figura 38: Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico das amostras de PFS extraídas pelo método Nuceospin Plant II (protocolo 2), com pré-tratamento com uma solução de tampão fosfato. Legenda: 1- EM130; 2- EM131; 3- EM132; 4- EM133; 5- EM134; 6- EM135; 7- EM136; 8- EM137; 9- EM138; M- marcador HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

Todos os extratos de PFS testados demonstraram ter boa capacidade de amplificação, uma vez que foram obtidas bandas para todas as amostras na PCR convencional com os *primers* universais EG-F/EG-R (Figura 39). Os resultados obtidos sugerem que o pré-tratamento e método de extração utilizados foram adequados à recuperação/extração de ADN das amostras de PFS, incluindo as que continham excipientes na sua composição. Desta forma, posteriormente, todos foram testados quanto à presença das espécies de *C. aurantium* e *E. sinica*.

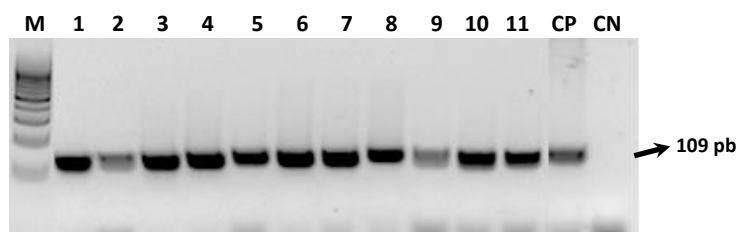


Figura 39: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos suplementos alimentares à base de plantas com os *primers* EG-F/EG-R. Legenda: 1- EM130; 2- EM131; 3- EM132; 4- EM133; 5- EM134; 6- EM135; 7- EM136; 8- EM137; 9- EM138; 10- SA24; 11- SA27; M - Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN -Controlo negativo.

8.4.2 Detecção das espécies *Citrus aurantium* e *Ephedra sinica*

No sentido de identificar a presença das espécies *C. aurantium* e *E. sinica* e confirmar a rotulagem das amostras de PFS, utilizaram-se os *primers* Cita6-F/Cita6-R1 e Eph4-F/Eph4-R, respetivamente. A Figura 40A mostra os resultados obtidos, onde é possível verificar que apenas a amostra EM131 amplificou com os *primers* Cita6-F/Cita6-R1, indicando ausência de *Citrus aurantium* nas outras amostras. Para além da amostra EM131, também as amostras EM132 e EM136 indicavam *C. aurantium* na sua composição. A ausência de amplificação de *C. aurantium* nestas amostras pode dever-se

ao facto de serem usados extratos da planta, e não a planta em si, ou à troca de espécies, potencialmente com laranja em vez de laranja-amarga. Assim, tal como referido para as infusões, seria interessante desenvolver, como estudo futuro, técnicas que permitam detetar especificamente a espécie *C. sinensis*, uma vez que parece existir uma problemática relativa à troca destas duas plantas. No caso da amostra EM136, esta refere conter o extrato do fruto seco. Apesar do ADN estar potencialmente presente nesses extratos, são necessários mais estudos que permitam confirmar que, nestes casos, as técnicas de biologia molecular são igualmente aplicáveis na autenticação das amostras. No caso da amostra SA24, esta foi incluída na amostragem pelo facto de se tratar de um PFS para perda de peso e conter laranja e toranja como ingredientes. Apesar de ser mais comum a presença de laranja-amarga neste tipo de suplemento, os resultados obtidos permitem confirmar a ausência desta espécie. Todas as restantes, encontram-se de acordo com a rotulagem no que respeita a ausência de *C. aurantium*, uma vez que não foi detetada a sua presença.

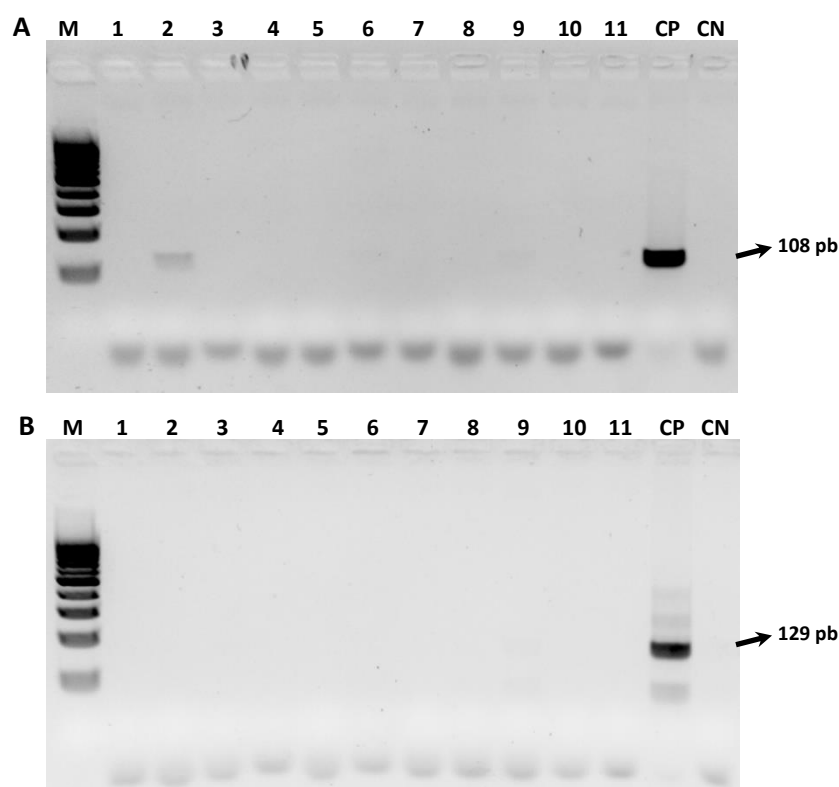


Figura 40: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos suplementos alimentares à base de plantas com os *primers* Cita6-F/Cita6-R1 (A) e Eph4-F/Eph4-R (B). Legenda: 1- EM130; 2- EM131; 3- EM132; 4- EM133; 5- EM134; 6- EM135; 7- EM136; 8- EM137; 9- EM138; 10- SA24; 11- SA27; M - Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha); CP- Controlo positivo; CN -Controlo negativo.

Quanto à deteção da planta *E. sinica*, não se obteve amplificação com os *primers* Eph4-F/Eph4-R em nenhuma amostra (Figura 40B), o que confirma o cumprimento da legislação quanto à ausência desta espécie em suplementos. Apesar da amostra EM138 indicar a presença de efedrina na sua composição, o ADN da planta *E. sinica* não foi detetado, possivelmente por este produto incluir o composto proveniente de síntese química ou o extrato da planta. Refira-se que esta amostra, cuja composição é ilegal na UE e nos EUA por conter *E. sinica*, foi cedida por um consumidor que não revelou a sua origem.

9 Conclusões

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de metodologias que permitam a verificação de adulterações botânicas em PFS, em particular nos produtos utilizados para perda de peso. Neste tipo de produtos, torna-se importante a avaliação da presença de determinadas espécies, cuja utilização é associada à perda de peso pelos seus efeitos termogénicos, tais como a *E. sinica*, cuja inclusão em PFS é atualmente proibida pela na UE e nos EUA, e a laranja-amarga (*C. aurantium*).

Assim, este trabalho baseou-se na utilização de marcadores moleculares para avaliação de autenticidade de infusões e PFS no que respeita à presença de *E. sinica* ou *C. aurantium*, tendo-se recorrido às técnicas de PCR qualitativa e de PCR em tempo real com análise por HRM. Para a identificação específica das plantas em estudo foram desenhados diversos conjuntos de *primers*. Destes, não se conseguiu obter nenhum que amplificasse especificamente a espécie *Citrus aurantium* ou que permitisse a sua diferenciação das restantes espécies do mesmo género recorrendo à análise de HRM. Contudo, os *primers* Cita6-F/Cita6-R foram aqueles que demonstraram ser mais promissores, amplificando positivamente ADN de *C. aurantium* e outras espécies de *Citrus*, contrariamente ao verificado para algumas outras espécies, tal como a laranja (*C. sinensis*). Apesar de a sua especificidade não ser a idealmente pretendida, a metodologia proposta permite confirmar a ausência de *C. aurantium*. No caso de amostras positivas, ter-se-á que proceder a uma sequenciação de ADN que permita confirmar que o fragmento amplificado corresponde, ou não, a *C. aurantium*. No caso da espécie *Ephedra sinica*, foi proposta a utilização de *primers* específicos para o género (Eph3-F/Eph3-R), o que também pode revelar-se importante uma vez que outras espécies de *Ephedra*, para além de *E. sinica*, estão igualmente descritas como contendo alcaloides na sua composição, ainda que em menor teor que na planta *E. sinica*. Foram ainda propostos *primers* específicos para a deteção de *E. sinica* (Eph4-F/Eph4-R). Apesar de outras duas espécies também terem amplificado na PCR convencional, estas foram classificadas em grupos distintos após aplicação com sucesso de análise por HRM.

As duas metodologias propostas, para a deteção de *C. aurantium* e *E. sinica*, foram aplicadas a amostras de infusões e de PFS para perda de peso. No caso de *E. sinica*, concluiu-se que nenhuma das amostras se encontrava adulterada com esta espécie, o que, estando de acordo com a legislação que proíbe a utilização desta planta em PFS. No que respeita a presença de *C. aurantium*, apesar de diversas infusões conterem a designação desta planta no rótulo, não se verificou a presença de ADN em nenhuma das amostras. Tal poderá indicar uma potencial adulteração, ou confusão no que respeita a designação dos materiais botânicos utilizados. Desta forma, será interessante desenvolver em trabalhos

futuros novas ferramentas que permitam a identificação específica de *C. sinensis* (laranja), que permitam confirmar se nestes casos ocorre uma substituição, intencional ou não, de laranja-amarga por laranja. No que respeita os suplementos, a metodologia de extração utilizada permitiu extrair ADN com sucesso em todas as amostras. Destas, apenas numa de três amostras se confirmou a potencial presença de *C. aurantium*. Nas restantes, confirmou-se a sua ausência de laranja-amarga, pelo que se concluiu estarem de acordo com a rotulagem.

Deste modo, pode-se concluir que, apesar da elevada eficácia das técnicas de biologia molecular aplicadas na avaliação da autenticidade de plantas medicinais e/ou produtos formulados com estas, há ainda um longo caminho a percorrer em algumas situações. No caso de *C. aurantium*, a grande dificuldade deste trabalho relacionou-se com a taxonomia e filogenia das plantas do género *Citrus*, as quais são ainda consideradas como sendo muito controversas devido aos diversos cruzamentos realizados dentro de género e até mesmo com géneros próximos, à elevada frequência de mutações e também à sua ampla dispersão global. No entanto, este estudo contribuiu, com uma primeira abordagem, para o desenvolvimento de ferramentas que permitam a autenticação da espécie *C. aurantium* em PFS. Foi ainda possível desenvolver um método que permite a identificação do género *Ephedra* e, mais especificamente, da espécie *E. sinica* em PFS, permitindo a sua autenticação de forma rápida e efetiva no que respeita a ausência desta planta.

Referências bibliográficas

- Aldeguer, M., López-Andreo, M., A. Gabaldón, J., & Puyet, A. (2014). Detection of mandarin in orange juice by single-nucleotide polymorphism qPCR assay. *Food Chemistry*, 145, 1086-1091.
- Alvarez, I., & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 29(3), 417-434.
- Applequist, W., Miller, J.S. (2013). Selection and authentication of botanical materials for the development of analytical methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 4419-4428.
- Arai, K., Jin, D., Kusu, F., & Takamura, K. (1997). Papers from the seventh international symposium on pharmaceutical and biomedical analysis Determination of p-hydroxymandelic acid enantiomers in urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15(9), 1509-1514.
- Arbo, M. D., Schmitt, G. C., Limberger, M. F., Charao, M. F., Moro, A. M., Ribeiro, G. L., Dallegrave, E., Garcia, S. C., Leal, M. B., & Limberger, R. P. (2009). Subchronic toxicity of *Citrus aurantium* L. (Rutaceae extract and p-synephrine in mice). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 54(2), 114-117.
- Asmussen, C. B. (2006). A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): evidence from plastid DNA phylogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151(1), 15-38.
- Avula, B., Upparapalli, S. K., Navarrete, A., & Khan, I. A. (2005). Simultaneous quantification of adrenergic amines and flavonoids in *Citrus aurantium*, various *Citrus* species, and dietary supplements by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 88, 1593-1606.
- Babaei, S., Talebi, M., & Bahar, M. (2014). Developing an SCAR and ITS reliable multiplex PCR-based assay for safflower adulterant detection in saffron samples. *Food Control*, 35(1), 323-328.
- Bagatela, B. S., Lopes, A. P., Cabral, E. C., Perazzo, F. F., & Ifa, D. R. (2015). High-performance thin-layer chromatography/desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging of the crude extract from the peels of *Citrus aurantium* L. (Rutaceae). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29(16), 1530-1534.
- Barkley, N. A., Roose, M. L., Krueger, R. R., & Federici, C. T. (2006). Assessing genetic diversity and population structure in a *Citrus* germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 1519-1531.
- Boullata, J. I., & Nace, A. M. (2000). Safety Issues with Herbal Medicine. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 20(3), 257-269.
- Brookes, A. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), 177-186.
- Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. (Second ed.).

- Cara, N., Marfil C. F., Lampasona, S. C. G., & Masuelli, R. W. (2014). Comparison of two detection systems to reveal AFLP markers in plants. *Botany*, 92(8), 607-610.
- Chevallier, A. (1996). *The Encyclopedia of Medicinal Plants Dorling Kindersley*. London.
- China Plant, B. G., Li, D.-Z., Gao, L.-M., Li, H.-T., Wang, H., Ge, X.-J., Liu, J.-Q., Chen, Z.-D., Zhou, S.-L., Chen, S.-L., Yang, J.-B., Fu, C.-X., Zeng, C.-X., Yan, H.-F., Zhu, Y.-J., Sun, Y.-S., Chen, S.-Y., Zhao, L., Wang, K., Yang, T., & Duan, G.-W. (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), 19641-19646.
- Citrus aurantium and Synephrine. <http://www.mdidea.com/products/proper/proper09001.html>. Acedido em Maio de 2016.
- Costa, J., Amaral, J. S., Fernandes, T. J. R., Batista, A., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2015b). DNA extraction from plant food supplements: Influence of different pharmaceutical excipients. *Molecular and Cellular Probes*, 29(6), 473-478.
- Costa, J., Campos, B., Amaral, J. S., Nunes, M. E., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2016). HRM analysis targeting ITS1 and matK loci as potential DNA mini-barcodes for the authentication of *Hypericum perforatum* and *Hypericum androsaemum* in herbal infusions. *Food Control*, 61, 105-114.
- Costa, J., Mafra, I., Carrapatoso, I., & Oliveira, M. B. P. P. (2015a). Hazelnut Allergens: Molecular Characterisation, Detection and Clinical Relevance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00-00.
- Debelle, F. D., Vanherweghem, J.-L., & Nortier, J. L. (2008). Aristolochic acid nephropathy: A worldwide problem. *Kidney International*, 74, 158-169.
- Deconinck, E., De Leersnijder, C., Custers, D., Courselle, P., & De Beer, J. O. (2013). A strategy for the identification of plants in illegal pharmaceutical preparations and food supplements using chromatographic fingerprints. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(7), 2341-2352.
- DGAV, Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2014). <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=10436296&cboui=10436296>. Acedido em Junho de 2016.
- Dhanya, K., & Sasikumar, B. (2010). Molecular Marker Based Adulteration Detection in Traded Food and Agricultural Commodities of Plant Origin with Special Reference to Spices. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 4(1), 454-489.
- Diretiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 10 de junho de 2002, relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes aos suplementos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 183/51.
- Diretiva 2004/24/CE Parlamento Europeu e do Conselho, de 31 de Março de 2004, que altera , em relação aos medicamentos tradicionais à base de plantas, a Diretiva 2001/83/CE que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 136/85.

- Dong, T. T. X., Cui, X. M., Song, Z. H., Zhao, K. J., Ji, Z. N., Lo, C. K., & Tsim, K. W. K. (2003). Chemical Assessment of Roots of *Panax notoginseng* in China: Regional and Seasonal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4617-23.
- EFSA. (2007). About EFSA: who we are and what we do. *EFSA Journal*, 5(4), 1024.
- EFSA. (2009). Guidance on Safety assessment of botanicals* and botanical preparations** intended for use as ingredients in food supplements. *EFSA Journal*, 7(9), 1249.
- EFSA. (2012). Compendium of botanicals reported to contain naturally occurring substances of possible concern for human health when used in food and food supplements. *EFSA Journal*, 10(5), 2663.
- EFSA. (2014). Scientific Opinion on a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for the safety assessment of botanicals and botanical preparations. *EFSA Journal*, 12(3), 3593.
- Egan, B., Hodgkins, C., Shepherd, R., Timotijevic, L., & Raats, M. (2011). An overview of consumer attitudes and beliefs about plant food supplements. *Food & Function*, 2(12), 747-752.
- Elvin-Lewis. (2001). Should we be concerned about herbal remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2-3), 141-164.
- Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R., & Smith, T. F. (2006). Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 165-256.
- Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat science*, 79(2), 289-298.
- Feliner, G. N., & Rosselló, J., A. (2007). Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(2), 911-919.
- Ferreira, M. E., & Grattapaglia, D. (1998). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética* (3 ed.). Brasília: EMBRAPA-CENARGEN.
- Fu, P. P., Chiang, H.-M., Xia, Q., Chen, T. A. O., Chen, B. H., Yin, J.-J., Wen, K.-C., Lin, G. E., & Yu, H. (2009). Quality Assurance and Safety of Herbal Dietary Supplements. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 27(2), 91-119.
- Galimberti, A., Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., & Casiraghi, M. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, 50(1), 55-63.
- Gallo, E., Giocaliere, E., Benemei, S., Bilia, A. R., Karioti, A., Pugi, A., di Pirro, M., Menniti-Ippolito, F., Pieraccini, G., Gori, L., Mugelli, A., Firenzuoli, F., & Vannacci, A. (2012). Anything to declare? Possible risks for patients' health resulting from undeclared plants in herbal supplements. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 73(3), 482-483.
- Garcia-Alvarez, A., Egan, B., de Klein, S., Dima, L., Maggi, F. M., Isoniemi, M., Ribas-Barba, L., Raats, M. M., Meissner, E. M., Badea, M., Bruno, F., Salmenhaara, M., Milà-

- Villarroel, R., Knaze, V., Hodgkins, C., Marculescu, A., Uusitalo, L., Restani, P., & Serra-Majem, L. (2014). Usage of Plant Food Supplements across Six European Countries: Findings from the PlantLIBRA Consumer Survey. *PLoS ONE*, 9(3), e92265.
- Garcia-Canas, V., Cifuentes, A., & Gonzalez, R. (2004). Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 425-436.
- Gay, M. L., Niemann, R. A., & Musser, S. M. (2006). An isotopically labeled internal standard liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of ephedrine alkaloids and synephrine in dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5, 285-291.
- GENcompare, <http://www.gencompare.com/qpcr.htm>. Acedido em Outubro de 2015.
- Gene Quantification, <http://hrm.gene-quantification.info/>. Acedido em Outubro de 2015.
- Guo, Y., Tsuruga, A., Yamaguchi, S., Oba, K., Iwai, K., Sekita, S., & Mizukami, H. (2006). Sequence Analysis of Chloroplast chlB Gene of Medicinal Ephedra Species and Its Application to Authentication of Ephedra Herb. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(6), 1207-1211.
- Haller, C. A., & Benowitz, N. L. (2000). Adverse cardiovascular and central nervous system events associated with dietary supplements containing Ephedra alkaloids. *The New England Journal of Medicine*, 343, 1886–1887.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & Waard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Herrmann, M., Durtschi, J. D., Wittwer, C. T., & Voelkerding, K. V. (2007). Expanded Instrument Comparison of Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping. *Clinical Chemistry*, 53(8), 1544-1548.
- Hilu, K. W., & Liang, H. (1997). The matK gene sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany*, 84, 830-839.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 6(5), e19254.
- Ionline, 2005. Suplementos: não há comprimidos milagrosos para emagrecer, <http://ionline.sapo.pt/387221>, Acedido em Junho de 2016.
- Jia, L., & Zhao, Y. (2009). Current Evaluation of the Millennium Phytomedicine- Ginseng (I): Etymology, Pharmacognosy, Phytochemistry, Market and Regulations. *Current medicinal chemistry*, 16(19), 2475-2484.
- Jiang, L., You, R. L., Li, M. X., & Shi, C. (2003). Identification of a sex-associated RAPD marker in *Ginkgo biloba*. *Acta Botanica Sinica*, 45(6), 742-747.
- Kazi, T., Hussain, N., Bremner, P., Slater, A., & Howard, C. (2013). The application of a DNA-based identification technique to over-the-counter herbal medicines. *Fitoterapia*, 87, 27-30.
- Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., & Yetim, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat science*, 82(4), 444-449.

- Kitani, Y., Zhu, S., Omote, T., Tanaka, K., Batkhuu, J., & Sanchir, C. (2009). Molecular analysis and chemical evaluation of Ephedra plants in Mongolia. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(7), 1235-1243.
- Kress, W., Wurdack, K., Zimmer, E., Weigt, L., & Janzen, D. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), 8369-8374.
- Krypuy, M., Newnham, G., Thomas, D., Conron, M., & Dobrovic, A. (2006). High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 6(1), 295.
- Kulkarni, K.M., Leena, S.P, Vineeta, V.K., & Vilasrao, J.K. (2014). Fingerprinting Techniques in Herbal Standardization. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 4(2),1049-1062.
- Kumar, N.S., & Gurusubramanian, G. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Science Vision*, 11, 116-124.
- Kumar, P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R., & Pandey, B. K. (2009). Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2(4), 141-162.
- Kusu, F., Matsumoto, K., Arai, K., & Takamura, K. (1996). Determination of synephrine enantiomers in food and conjugated synephrine in urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical Biochemistry*, 235(2), 191-194.
- Leung, A. Y., & Foster., S. (1996). *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics*. (Third ed.). New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Levin, R. E. (2005). The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review. *Food Biotechnology*, 18,1, 97-133.
- Liang, G., Xiong, G., Guo, Q., He, Q., & Li, X. (2007). AFLP analysis and the taxonomy of Citrus. *Acta Horticulturae*, 760, 137-142.
- Liang, W., Yu, J., Li, J. I. N., Wu, H., & Wu, X.-B. (2011). Development of a species-specific AFLP-based SCAR marker for authentication of black muntjac (*Muntiacus crinifrons*). *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 162-165.
- Liu, B., & Wendel, J. F. I. (2001). Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, 1, 205-208.
- Loh, J. P., Kiew, R., Kee, A., Gan, L. H., & Gan, Y.-Y. (1999). Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Provides Molecular Markers for the Identification of *Caladium bicolor* Cultivars. *Annals of Botany*, 84(2), 155-161.
- Mafra, I., Ferreira, I.M.PL.V.O., Oliveira, M.B.P.P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227(3), 649-665.
- Marieschi, M., Torelli, A., Bianchi, A., & Bruni, R. (2011). Development of a SCAR marker for the identification of *Olea europaea* L.: A newly detected adulterant in commercial Mediterranean oregano. *Food Chemistry*, 126(2), 705-709.

- Mathon, C., Duret, M., Kohler, M., Edder, P., Bieri, S., & Christen, P. (2013). Multi-targeted screening of botanicals in food supplements by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *138*(1), 709-717.
- Mattoli, L., Cangi, F., Maidecchi, A., Ghiara, C., Tubaro, M., & Traldi, P. (2005). A Rapid Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry Method for Evaluation of Synephrine in Citrus aurantium L. Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(26), 9860-9866.
- Mepherston, M., & Simon, M. (2006). PCR: The Basics. (Second ed.). Cornwall : Taylor & Francis.
- Miller, L. G., Hume, A., Harris, F. I. M., Jackson, E. A., Kanmaz, T. J., Cauffield, J. S., Chin, T. W. F., & Knell, M. (2001). Adulteration: Its Various Meanings. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, *21*(6), 770-771.
- Mir, S. M., Devi, C. S., & Mohanasrinivasan, V. (2010). Methods of genomic fingerprinting of foods - a molecular perspective. *Journal of Pharmacy Research*, *3*(8), 2023-2030.
- Mohamad, N. A., El Sheika, A. F., Mustafa, S., & Mokhtar, N. F. K. (2013). Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review. *Food Research International*, *50*(1), 330-338.
- Morgante, M., Hanafey, M., & Powell, W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, *30*(2), 194-200.
- Mower, J. P., Touzet, P., Gummow, J. S., Delph, L. F., & Palmer, J. D. (2007). Extensive variation in synonymous substitution rates in mitochondrial genes of seed plants. *BMC Evolutionary Biology*, *7*, 135-135.
- New Hope, The state of supplement sales in 2014. <http://newhope.com/supplements/state-supplement-sales-2014>. Acedido em Junho de 2016.
- Newmaster, S., Grguric, M., Shanmughanandhan, D., Ramalingam, S., & Ragupathy, S. (2013). DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. *BMC Medicine*, *11*(1), 222.
- Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., Malfa, S. L., Ciotinella, G., & Tribulato, E. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *National Academy of Sciences of United States of America*, *100*, 1155-1166.
- Niemann, R. A., & Gay, M. L. (2003). Determination of ephedrine alkaloids and synephrine in dietary supplements by column-switching cation exchange-high-performance liquid chromatography with scanning-wavelength ultraviolet and fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 5630-5638.
- Pang, X. M., Hu, C. G., & Deng, X. X. (2006). Phylogenetic relationships within Citrus and its related genera as inferred from AFLP markers. *Genetic Resources Crop Evolution*, *54*, 429-436.
- Pellati, F., & Benvenuti, S. (2007). Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of phenethylamine alkaloids in Citrus aurantium. *Journal of Chromatography*, *1161*, 71-88.

- Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification. *Springer*, 12, 330.
- Petroczi, A., Taylor, G., & Naughton, D. P. (2011). Mission impossible? Regulatory and enforcement issues to ensure safety of dietary supplements. *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), 393-402.
- Phillips, R., & Vasil, J. (2001). PCR-based marker systems. In *DNA-Based Markers in Plants. (Second ed.)*, 6.
- Rapaka, R. S., & Coates, P. M. (2006). Dietary Supplements and Related Products: A Brief Summary. *Life Sciences*, 78(18), 2026-2032.
- Rassmann, K., Schötterer, C., & Tautz, D. (1991). Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12, 113-118.
- Real-Time PCR: the TaqMan® Method, http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realti_meper.htm. Acedido em Outubro de 2015.
- Reed, G. H., & Wittwer, C. T. (2004). Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. *Clinical Chemistry*, 50(10), 1748-1754.
- Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 31/1.
- Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 139/1.
- Regulamento (CE) n.º 1170/2009 da Comissão de 30 de Novembro de 2009 que altera a Diretiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho e o Regulamento (CE) n.º 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere às listas de vitaminas, minerais e respetivas formas em que podem ser adicionados aos alimentos, incluindo suplementos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 314/36.
- Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 327/23.
- Regulamento (CE) n.º 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Janeiro de 1997 relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 43/1.
- Robarts, D. W. H., & Wolfe, A. D. (2014). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology(1). *Applications in Plant Sciences*, 2(7), apps.1400017.
- Rocha, T., Amaral, J. S., & Oliveira, M.B.P.P. (2016). Adulteration of dietary supplements by the illegal addition of synthetic drugs: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 43-62.

- Rodriguez-Lazaro, D., & Hernandez, M. (2013). Real-time PCR in Food Science: Introduction. *Current Issues in Molecular Biology*, 15(2), 25-38.
- Rojas, M., González, I., García, T., Hernández, P. E., & Martín, R. (2012). Authentication of meat and commercial meat products from common pigeon (*Columba livia*) woodpigeon (*Columba palumbus*) and stock pigeon (*Columba oenas*) using a TaqMan® real-time PCR assay. *Food Control*, 23(2), 369-376.
- Rossato, L. G., Costa, V. M., Limberger, R. P., Bastos, M. d. L., & Remião, F. (2011). Synephrine: From trace concentrations to massive consumption in weight-loss. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), 8-16.
- Santana, J., Sharpless, K. E., & Nelson, B. C. (2008). Determination of p-synephrine and m-synephrine positional isomers in bitter orange-containing supplements by LC/UV and LC/MS/MS. *Food Chemistr*, 109, 675-682.
- Sanzini, E., Badea, M., Santos, A. D., Restani, P., & Sievers, H. (2011). Quality control of plant food supplements. *Food & Function*, 2(12), 740-746.
- Schaneberg, B., & Khan, I. (2004). Quantitative and qualitative HPLC analysis of thermogenic weight loss products. *Pharmazie*, 59, 819-823.
- Schaneberg, B. T., Crockett, S., Bedir, E., & Khan, I. A. (2003). The role of chemical fingerprinting: application to Ephedra. *Phytochemistry*, 62(6), 911-918.
- Shaw, P.-C., Wong, K.-L., Chan, A., Wong, W.-C., & But, P. (2009). Patent applications for using DNA technologies to authenticate medicinal herbal material. *Chinese Medicine*, 4(1), 21.
- Silano, V., Coppens, P., Larranaga-Guetaria, A., Minghetti, P., & Roth-Ehrang, R. (2011). Regulations applicable to plant food supplements and related products in the European Union. *Food & Function*, 2(12), 710-719.
- Slezak, T., Francis, P. S., Anastos, N., & Barnett, N. W. (2007). Determination of synephrine in weight-loss products using high performance liquid chromatography with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 593(1), 98-102.
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6-20.
- Soares, T., & Simón, A. (1992). Segurança do uso de plantas medicinais. *Boletim do CIM*, 4, 3-4.
- Spooner, D., Van Treuren, R., & Vicente, M. (2005). *Overview of Molecular Technologies* (Vol. 10). IPGRI Technical Bulletin: Rome: International Plant Genetic Resource Institute.
- Sucher, N. J., & Carles, M. C. (2008). Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants. *Planta Medica*, 74(6), 603-23.
- Talebi, M., Mokhtari, N., Rahimmalek, M., & Sahhaf, S. (2012). Molecular characterization of *Carthamus tinctorius* and *C. oxyacanthus* germplasm using sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers. *Plant Omics Journal*, 5(2), 136-142.
- Talon, M., & Gmitter Jr, F. G. (2008). Citrus Genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008, 528361.

- Techen, N., Khan, I. A., Pan, Z., & Scheffler, B. E. (2006). The use of polymerase chain reaction (PCR) for the identification of ephedra DNA in dietary supplements. *Planta medica*, 72(3), 241-247.
- Techen, N., Parveen, I., Pan, Z., & Khan, I. A. (2014). DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Current Opinion in Biotechnology*, 25(0), 103-110.
- Terpe, K. (2013). Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(24), 10243-10254.
- Trindade, H. (2010). Molecular biology of aromatic plants and spices. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 272-281.
- Vaclavik, L., Krynitsky, A.J., Rader, J.I. (2014). 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*, 810, 45-60.
- Vargas-Murga, L., Garcia-Alvarez, A., Roman-Vinas, B., Ngo, J., Ribas-Barba, L., van den Berg, S. J. P. L., Williamson, G., & Serra-Majem, L. (2011). Plant food supplement (PFS) market structure in EC Member States, methods and techniques for the assessment of individual PFS intake. *Food & Function*, 2(12), 731-739.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. v. d., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414.
- Wallace, L. J., Boilard, S. M. A. L., Eagle, S. H. C., Spall, J. L., Shokralla, S., & Hajibabaei, M. (2012). DNA barcodes for everyday life: Routine authentication of Natural Health Products. *Food Research International*, 49(1), 446-452.
- Wang, L., Xing, S.-Y., Yang, K.-Q., Wang, Z.-H., Guo, Y.-Y., & Shu, H.-R. (2006). Genetic relationships of ornamental cultivars of Ginkgo biloba analyzed by AFLP techniques. *Acta genetica Sinica*, 33(11), 1020-1026.
- WIKIBOOKS, Structural Biochemistry/Polymerase Chain Reaction/How PCR is Performed.
https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Polymerase_Chain_Reaction/How_PCR_is_Performed. Acedido em Junho de 2016.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531-6535.
- Wu, G. A., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., Murat, F., Perrier, X., Ruiz, M., Scalabrin, S., Terol, J., Takita, M. A., Labadie, K., Poulain, J., Couloux, A., Jabbari, K., Cattonaro, F., Del Fabbro, C., Pinosio, S., Zuccolo, A., Chapman, J., Grimwood, J., Tadeo, F. R., Estornell, L. H., Munoz-Sanz, J. V., Ibanez, V., Herrero-Ortega, A., Aleza, P., Perez-Perez, J., Ramon, D., Brunel, D., Luro, F., Chen, C., Farmerie, W. G., Desany, B., Kodira, C., Mohiuddin, M., Harkins, T., Fredrikson, K., Burns, P., Lomsadze, A., Borodovsky, M., Reforgiato, G., Freitas-Astua, J., Quetier, F., Navarro, L., Roose, M., Wincker, P., Schmutz, J., Morgante, M., Machado, M. A., Talon, M., Jaillon, O., Ollitrault, P., Gmitter, F., & Rokhsar, D. (2014). Sequencing of diverse mandarin,

pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature Biotechnology*, 32(7), 656-662.

Xu, H., Fabricant, D., Piersen, C., Bolton, J., Pezzuto, J., & Fong, H. (2002). A preliminary RAPD-PCR analysis of Cimicifuga species and other botanicals used for women's health. *Phytomedicine*, 9, 757-762.

Yip, P., Chau, C., Mak, C., & Kwan, H. (2007). DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. *Chinese Medicine*, 2(1), 9.

Zabeu, M. (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *European Patent Application*.

Zhang, Y., Shaw, P., Sze, C., Wang, Z., & Tong, Y. (2007). Molecular authentication of Chinese herbal materials. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15, 1-9.

Zuo, Y., Chen, Z., Kondo, K., Funamoto, T., Wen, J., & Zhou, S. (2011). DNA barcoding of Panax species. *Planta Medica*, 77, 182-187.