

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE MAYTENUS TRUNCATA REIS

Sandro do Nascimento Silva

Mestrando em Agronomia - Área de Concentração Fitotecnia – UESB, Departamento de Fitotecnia e Zootecnia,
45000-000. Vitória da Conquista – BA,
Email: sandro_uesb@yahoo.com.br

Derval Gomes Pereira

Prof. Adjunto, UESB. Departamento de Química e Exatas. 45200-000, Jequié – BA.
Email: derval@uesb.br

Ana Maria Waldschmidt

Prof. Adjunto, UESB, Departamento de Ciências Biológicas, 45200-000, Jequié - BA
Email: amaria@uesb.br

Ronan Xavier Corrêa

Prof. Adjunto, UESC, Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus – BA.
Email: ronanxc@uesc.br

Resumo - A Espinheira Santa (*Maytenus truncata* Reis) é uma planta utilizada para fins medicinais no tratamento de hiperacidez, ulcerações gástricas, afecções cutâneas como acne, eczemas, constipação e cânceres. Ela possui propriedades analgésicas, anti-séptica e cicatrizante, sendo encontrada nas proximidades do Rio de Contas em Jequié – BA. Devido ao intenso uso pela população e exploração pelos raizeiros, a espécie está desaparecendo da região. Com isso, faz-se estudar a espécie em nível molecular visando subsidiar uma estratégia de proteção da mesma. Objetivando avaliar e adequar uma metodologia como ferramenta a ser utilizada em estudos de biologia molecular testou-se quatro protocolos de extração de DNA, sendo que o protocolo que obteve os melhores resultados nos testes de quantificação do DNA em gel de agarose e espectrofotômetro foi o de Ferreira & Grattapaglia (1998) com modificações no ato da maceração e da centrifugação. O DNA foi isolado íntegro e em ótimo estado apresentando em média um grau de pureza (A260/A280) em espectrofotômetro de 1,78 e uma concentração de 1846 ng/ml.

Palavras-Chave: Espinheira Santa, Biologia Molecular, Protocolo.

OTIMIZATION OF PROTOCOL FOR EXTRACTION OF ADN OF MAYTENUS TRUNCATA REIS

Abstract - Espinheira Santa (*Maytenus truncata* Reis) it is a plant used for medicinal ends in the hiperacidez treatment, gastric ulcerations, cutaneous disease as, eczems, constipation and cancers. She possesses properties analgesic, antiseptic and healing, being found in the proximities of Rio de Contas in Jequié - BA. Due to the intense use for the population and exploration for the erveiros, the species is disappearing of the area. With that, it is made to study the species in molecular level seeking to subsidize a strategy of protection of the same. Aiming at to evaluate and to adapt a methodology as tool to be used in studies of molecular biology was tested four protocols of extraction of DNA, and the protocol that obtained the best results in the tests of quantification of DNA in agarose gel and photometer spectrum was it of Ferreira & Grattapaglia (1998) with modifications in the act of the maceration and of the centrifugation. DNA was isolated I integrate and in great been presenting in it measured a degree of purity (A260/A280) in photometer spectrum of 1,78 and a concentration of 1846 ng/ml.

Key Words: Espinheira Santa, Molecular Biology, Protocol.

INTRODUÇÃO

A Espinheira Santa (*Maytenus truncata* Reis) é uma planta de uso medicinal nativa da Bahia (Brasil) (Silva, 2005), sendo encontrada nas proximidades do Rio de Contas região de Jequié-BA. O gênero *Maytenus* apresenta propriedades tônicas e balsâmicas, cujas folhas são empregadas no tratamento de hiperacidez e ulcerações do estômago, tônico, analgésico, anticéptico e cicatrizante

(Freise, 1999). Algumas pesquisas foram realizadas com o uso dos compostos de plantas deste gênero principalmente com a *Maytenus ilicifolia* em pacientes com vários tipos de câncer, mostrando-se eficaz para este tipo de doença (O'Connell *et al.*, 1978). Estes estudos foram confirmados por Crovetto (1981). Os estudos de toxicologia foram publicados em 1991, e se verificou a segurança do uso planta sem efeitos colaterais (Taylor, 2002).

A Espinheira Santa é uma planta de grande uso popular e que tem despertado o interesse de um grande número de pesquisadores com objetivo de verificar suas propriedades fitoquímicas e etnofarmacológicas, bem como a farmacologia de seus princípios ativos e de seus extratos, e devido ao intenso uso desta espécie pela população da região, a exploração extrativista e o comércio realizado pelos raizeiros, a população tem diminuído drasticamente. Desta forma são necessários estudos que visa subsidiar estratégias de proteção para a espécie.

São poucos os estudos genéticos com o gênero, mas alguns estudos de variabilidade genética foram realizados com algumas populações de *Maytenus ilicifolia* utilizando métodos isoenzimáticos (Scheffer, 2001) e marcadores moleculares RAPD (“random amplified polymorphic DNA”) (Bittencourt, 2000), porém os protocolos estabelecidos não são eficazes para extração do DNA da *M. truncata* Reis. Para que se possa fazer uso das técnicas de Biologia Molecular, é importante obter uma quantidade de DNA genômico de boa qualidade que possibilite o emprego da técnica desejada (Waldschmidt, 1999). Assim, em virtude de diferentes rotas metabólicas que as plantas possuem, o que dificulta a extração do DNA íntegro com os métodos existentes faz-se necessário à otimização de um método de extração de DNA mais adequado para a *M. truncata* Reis.

Diferentes protocolos de extração de DNA a partir de tecido foliar, como os que utilizam CTAB (Brometo de cetil trimetil amônia) e no SDS (sódio duodecil sulfato) têm sido utilizados e estão bem estabelecidos para diferentes espécies de animais e vegetais (Faleiro, 2003). Segundo Ferreira & Grattapaglia, (1998) o protocolo de extração de folhas mais utilizado é o protocolo CTAB que tem como grande vantagem a não exigência de preparação previa do tecido e a sua adaptação a vários tipos de tecidos.

Este trabalho objetiva otimizar um protocolo de extração de DNA de *M. truncata* Reis que poderá ser utilizado em estudos de Biologia Molecular como RAPD, RFLP, SSR, seqüenciamento e testar a Amplificação do DNA extraído pela técnica de RAPD, para posterior análise de diversidade genética em *M. truncata*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido de julho de 2003 a Julho de 2004 no laboratório de Genética Molecular da UESB e no laboratório Biologia Molecular da UESC. O material genético utilizado foi constituído de folhas de *M. truncata* Reis, as quais foram coletadas ainda jovens oito amostras da planta no Bairro da Cidade Nova em Jequié Estado da Bahia, estas foram envoltas em papel alumínio e conservadas em freezer a -20°C .

Para obtenção do DNA foram testados quatro protocolos:

1. O Recomendado por Doyle & Doyle (1990) para plantas, cujo tampão de extração é constituído por:

PVP - polivinilpirrolidona (2%), NaCl - cloreto de sódio (1,25 M), Tris-HCL - trishidroximetilaminometano (0,1M) pH 8,0, EDTA - ácido etilnodiaminotetracético (10 mM), CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio (2%), 2-Mercaptoetanol (0,2%).

2. O Protocolo de Extração de Folhas de Doyle & Doyle modificado por Corrêa (1995), cujo tampão de extração é constituído por: CTAB (2%), NaCl (1,4 M), EDTA (20mM), Tris- HCl(100mM) pH 8,0, PVP (2%), 2-mercaptoetanol (0,2%).

3. O Protocolo de Extração de Folhas de Ferreira & Grattapaglia (1998) cujo tampão de extração é constituído por: o CTAB (2%), NaCl (1,4 M), EDTA (20mM), Tris- HCl (100mM) pH 8,0, PVP (1%), 2-mercaptoetanol (0,2%).

4. O Protocolo de Extração de Folhas de Ferreira & Grattapaglia (1998) modificado para a *M. truncata* cujo tampão de extração é constituído por: o CTAB (2%), NaCl (1,4 M), EDTA (40mM), Tris- HCl (100mM) pH 8,0, PVP (1%), 2-mercaptoetanol (0,2%). Modificações também foram introduzidas no ato da maceração que foi realizada diretamente no tampão e no ato da centrifugação que se utilizou rotação de 12.200 e 13.000 rpm na primeira e segunda centrifugação respectivamente.

Procedimento:

Para a extração do DNA adicionou-se o tampão de extração em microtubos de 2 μl , e em gelo, macerou-se a folha com bastão de vidro até que o tampão ficasse com a cor da mesma, em seguida, incubou-se a amostra em banho-maria a 65°C por 30 minutos, vertendo o microtubo a cada 10 minutos. Em seguida adicionou-se Clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1(v/v) para desproteíntização, Os microtubos foram agitados por suaves inversões durante 5 minutos e centrifugados por 10 minutos a 12.200 rpm em microcentrífuga não refrigerada, adicionou-se ao sobrenadante isopropanol gelado agitando-se os microtubos algumas vezes, as amostras foram centrifugadas a temperatura ambiente por 15 minutos a 13.000 rpm. Retirou-se o isopropanol e o pellet foi lavado duas vezes com álcool etílico a 70% e uma vez com álcool etílico a 90% para a retirada dos sais. Deixou-se o pellet secar dentro dos microtubos por duas horas ou até perder o cheiro de isopropanol. Foram acrescentados 50 μl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) + RNAase a 40 ng/mL aos microtubos com o pellet, e incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos eliminando assim os RNAs. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C . A integridade da pureza das amostras de DNA foi verificada em gel de agarose 1,0% e em espectrofotômetro sob a luz UV (260/280 nm).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram detectadas diferenças nos quatro protocolos utilizados. O protocolo 1 (Doyle & Doyle, 1990), não foi eficiente para a extração do DNA de *M. truncata* Reis

(Figura 1). A partir do protocolo 2 conseguiu extrair uma quantidade de DNA, mas este apresentava-se degradado (Figura 2). O protocolo 3 conseguiu isolar uma quantidade de DNA mas este ainda estava contaminado com proteínas (Figura 3), porém, baseando-se neste protocolo e modificando-o em algumas de suas etapas conseguiu-se obter com êxito o protocolo 4, que isolou uma quantidade considerável de DNA e de boa qualidade (Figura 4).

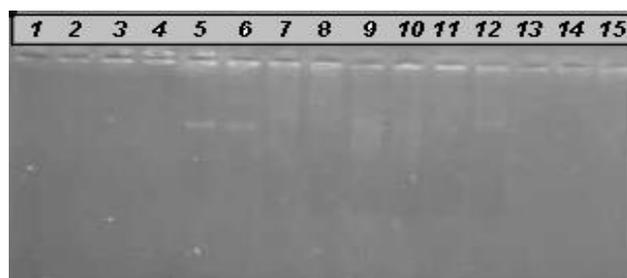


Figura 1 – Análise Eletroforética do DNA genômico de Espinheira Santa, utilizando o protocolo de extração de folhas de Doyle & Doyle (1990). De 1 a 15 – Amostras de *Maytenus truncata*. UESB, 2004.

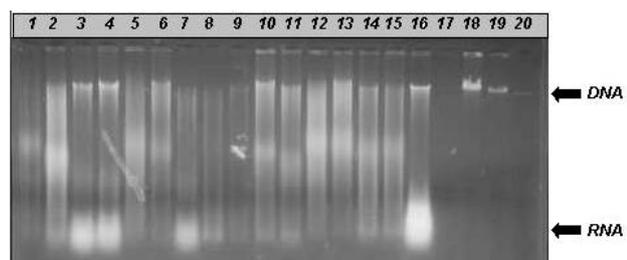


Figura 2 – Análise Eletroforética do DNA genômico de Espinheira Santa utilizando o protocolo de extração de folhas de Doyle & Doyle modificado por Corrêa (1995). De 1 a 17 DNA de *Maytenus truncata*. De 18 a 20 DNA de lambda de 50, 100 e 200 ng/mL respectivamente. UESB, 2004.

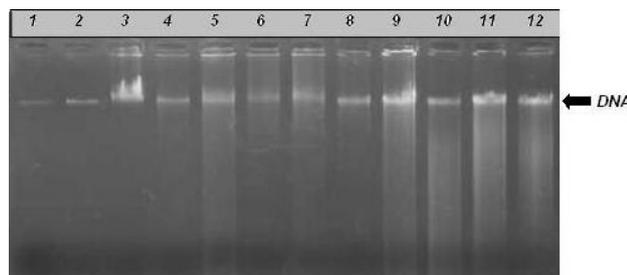


Figura 3 – Análise Eletroforética do DNA genômico de Espinheira Santa, utilizando o protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1998). 1 e 2 DNA marcador Lambda de 100 e 200 ng/mL, de 3 a 12 DNA de *Maytenus truncata*. UESB, 2004.

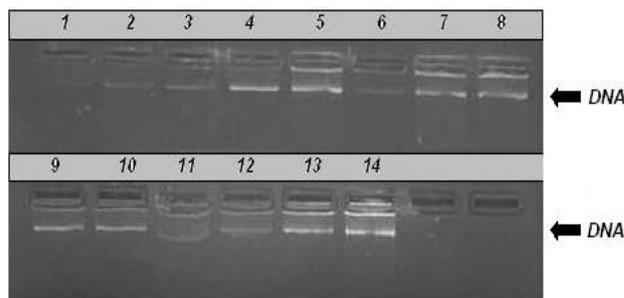


Figura 4 – Análise Eletroforética do DNA genômico de Espinheira Santa, utilizando o protocolo modificado de Ferreira & Grattapaglia (1998). De 1 a 4 marcador Lambda de 10, 20, 50, 200 ng/ml respectivamente, de 5 a 14 - DNA de *Maytenus truncata* Reis. UESB, 2004.

Segundo Machado (1990), O método CTAB tem sido muito utilizado para extração de tecidos frescos e diversos protocolos têm sido desenvolvidos para esse fim. Mas para a extração de DNA de *M. truncata* Reis é recomendável conservar a folha a temperatura de -20°C por no mínimo 24 hs, pois possivelmente a baixa temperatura degenera alguns compostos fenólicos que podem degradar o DNA no momento da extração.

O sucesso deste protocolo é devido ao tampão de extração que foi modificado na concentração de EDTA (40 mM), ao ato da maceração que foi diretamente no microtubo sem utilizar nitrogênio líquido e a centrifugação, pois os protocolos testados recomendam a centrifugação a velocidade máxima de 12.000 rpm por 3 minutos na primeira e segunda centrifugação (Ferreira & Grattapaglia, 1998) e 15.600 rpm por 10 minutos (Doyle & Doyle, 1990).

O teste de qualidade e quantificação do DNA foi realizado em espectrofotômetro. Ele indica se o DNA extraído está em boa qualidade ou contaminado com proteínas.

A média das razões das absorvâncias (A_{260}/A_{280}) dos DNAs obtidos neste protocolo foi de 1,78* satisfazendo os valores recomendado por Sambrook, *et al*, (1989) que é de $\geq 1,8$ indicando um DNA em ótimo estado, com exceção da amostra 2 que obteve uma pequena concentração de DNA (192 ng/uL), e da amostra 5 que obteve uma razão (A_{260}/A_{280}) de 1,2 indicando contaminação por proteínas. A concentração média de DNA foi de 2900 ng/ml

Nos testes realizados de amplificação com RAPD-PCR, revelaram a amplificação do DNA obtido pelo protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1998) modificado de forma eficaz, conforme mostra o padrão de amplificação obtido com o primer OPC01 (Figura 5).

Constatou-se também a simplicidade e rapidez do método obtido, diminuindo assim consideravelmente o tempo da extração e a quantidade de reagentes utilizados.

* Média das Razões (A_{260}/A_{280}) obtidas em espectrofotômetro dos DNAs das folhas de *Maytenus truncata* Reis

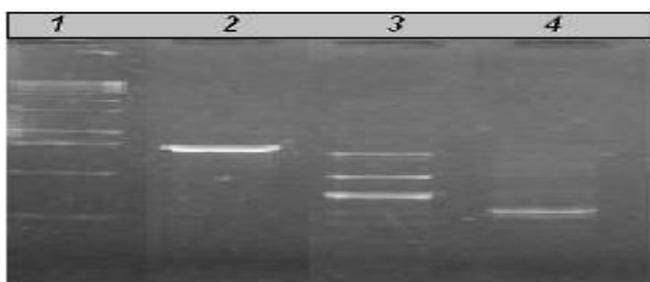


Figura 5 – Eletroforese dos produtos obtidos pela amplificação do DNA de *Maytenus truncata* Reis utilizando o primer OPC 01. 1- DNA Padrão 1 Kb. 2, 3, 4 RAPD-PCR de *Maytenus truncata*. UESB, 2004.

O DNA obtido neste protocolo será utilizado em trabalho que objetiva estudar a variabilidade genética desta espécie na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

CONCLUSÕES

Entre os quatro protocolos testados neste trabalho o que apresentou melhor resultado foi o de Ferreira; Grattapaglia (1998), modificado para se adaptar a *Maytenus truncata* Reis, obtendo em média uma razão (A260/A280) de 1,78 e uma concentração média de 2900 ng/ml. Assim, o DNA obtido por este protocolo foi isolado puro e em ótimo estado, podendo ser utilizado em qualquer técnicas de Biologia Molecular.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, aos Professores Derval, Ana Maria, Ronan e a Sônia do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz, pela ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BITTENCOURT, J.V.M. (2000). **Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, MSc diss.

CORREA, R. X. (1995). **Mapeamento genético da soja (*Glicine max(L) Merrill*) utilizando marcadores moleculares RAPD.** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. MSc diss.

CROVETTO, P.M. (1981). Las plantas utilizadas en medicina popular en el noroeste de Corrientes, **Miscelanea.** 69. Tucuman, Argentin.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15.

FALEIRO, F. G. ET AL. (2003). Operacionalização da Extração de DNA de Espécies Nativas do Cerrado Visando Análises Moleculares. **II Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, Anais. Porto Seguro. CD ROM.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. (1998). **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética.** Brasília. 121-121p.

FREISE, F.W. (1999). Plantas medicinais brasileiras. **Boletim de Agricultura**, São Paulo. 5: 35.

MACHADO, M. A. (1990). Isolation of DNA from Fresh Tissue: **Focus**, 12. (1). p. 13.

O'CONNELL, M.J. ET AL. (1978) Phase II trial of Maytansine in Patients with Advanced Colorectal Carcinoma. **Cancer Treatment Reports.** 62: 1237-1238.

SCHEFFER, M.C. (2001). **Sistema de Cruzamento e Variação Genética entre Populações e Progênes de Espinheira-Santa.** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. MSc diss.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F; MANIATIS, T. (1989). **Molecular Cloning: a laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SILVA, J.L.; SILVA, R.P.; JORGE, R.M.; SILVA, F. G.D.; VIEIRA FILHO, S. A; FONSECA, A. P. N. D.; TAGLIATI, C.A. (2005). Avaliação da atividade antiulcerogênica da *Maytenus truncata* Reiss (Celastraceae): **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** 15: (1), p. 30-35.

TAYLOR, L. **Herbal Secrets of the Rainforest**, 2° ed. Sege Press, Disponível em: <http://www.rain-tree.com>. Acesso em 25/11/2002-15.

WALDSCHMIDT, A. M. (1999). **Análises Genética e Morfométrica de populações de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae).** Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. DSc diss.