

FIGURA 1. Segmento de secuencia de un marcador de ADN de *Psidium guajava* L.

Nuevas herramientas de biología molecular para el control de calidad de las drogas vegetales

Iris Feria-Romero

Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico de Fitomedicamentos, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F., México

Abstract

Commercialisation of herbal medicinal products is today clearly regulated by governmental and international organizations that consider the quality control as the vertebral column of the technological development of these products. Recently, molecular biology techniques based in genetic characters allow the establishment of new and efficacious parameters for authentication of plant materials. The use of genetic markers for quality control of herbal drugs allow a fast detection of adulterants, particularly from phylogenetic closely related plant materials, and the discrimination of varieties or the detection of virus and other contaminants in herbal drugs. Application of these techniques for quality control of two herbal, guava leaf (*Psidium guajavae folium*) and tepescohuite bark (*Mimosae tenuiflorae cortex*), is described.

Key words

DNA, genetic markers, quality control, herbal drug, guava leaf, tepescohuite bark, *Psidium guajava*, *Mimosa tenuiflora*.

Resumen

La comercialización de los fitomedicamentos se encuentra claramente regulada por instancias gubernamentales y organismos internacionales que consideran al control de calidad como la columna vertebral del desarrollo tecnológico de estos productos. En la actualidad, las técnicas de biología molecular basadas en la identidad genética de las especies vegetales proporcionan nuevos y eficaces parámetros de identificación que están siendo aplicados en el control de calidad de las drogas vegetales. El uso de marcadores genéticos permite la rápida detección de adulterantes particularmente en materiales provenientes de especies con una estrecha cercanía filogenética, así como la discriminación de variedades o la detección de virus en las drogas vegetales u otros contaminantes antes no identificados. Se describe la aplicación de esta técnicas para el control de calidad de la hoja de guayabo (*Psidium guajavae folium*) y corteza de tepescohuite (*Mimosae tenuiflorae cortex*).

Palabras clave

ADN, marcadores genéticos, control de calidad, droga vegetal, hoja de guayabo, corteza de tepescohuite, *Psidium guajava*, *Mimosa tenuiflora*.

Introducción

La información existente sobre plantas que poseen interés medicinal para las instituciones de salud, los organismos reguladores gubernamentales o las empresas farmacéuticas de fitomedicamentos, se publica en forma de monografías de referencia en las farmacopeas de cada país o bien, en libros especializados en la materia para su difusión académica. En las monografías de referencia, se describen los principales requisitos que debe cumplir una droga vegetal en particular, para poder garantizar su eficacia terapéutica y su seguridad en el consumo humano; estos parámetros se inscriben dentro del amplio concepto de control de calidad en la fabricación de los fitomedicamentos. Los requisitos más comunes respecto a la materia prima son ^(1, 2):

- Certeza sobre el origen geográfico/ecológico del material.
- La existencia de rasgos o caracteres botánicos (macro y microscópicos) que garanticen su identidad taxonómica.
- La realización de pruebas de pureza y/o ausencia de contaminantes de diversos tipos.
- Los ensayos químicos para identificar los componentes biológicamente activos o marcadores.

Exigir la realización de este tipo de pruebas como una práctica obligatoria del control de calidad es la característica primordial que diferencia a un fitomedicamento de otros productos a base de plantas, ya que sólo así se garantiza la reproducibilidad en la seguridad y eficacia del extracto vegetal utilizado en la producción de este tipo de medicamentos ⁽³⁾. Sin embargo, a medida que los fitomedicamentos se han ido comercializando cada vez con más éxito económico, el mercado de plantas medicinales en el mundo ha ido sufriendo cambios, debido a la frecuente adulteración de las materias primas, la proliferación de polimorfismos en variedades sometidas a intenso cultivo, las dificultades inherentes al almacenamiento y transporte de grandes volúmenes de materiales vegetales, etc. Estas circunstancias han propiciado la búsqueda de nuevos métodos científicos que faciliten los procedimientos de control de calidad en el manejo industrializado y ampliamente mercantilizado de las plantas medicinales.

En la actualidad, algunas de las herramientas de la biología molecular representan una alternativa viable para complementar y sustentar las normas de control de calidad que exige el desarrollo de nuevos fitomedicamentos mediante el conocimiento genéti-

co de las especies. Actualmente existen diferentes sistemas comerciales que permiten la rápida extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de material vegetal fresco y día a día se desarrollan técnicas complementarias más sofisticadas para la obtención del ADN que resuelven circunstancias especiales como son la eliminación de polifenoles, polisacáridos o mucopolisacáridos presentes en el material vegetal y que pueden interferir en su pureza ⁽⁴⁻⁶⁾.

Son tres los espacios en los que se está aplicando el conocimiento genético molecular de las plantas para propósitos de control de calidad:

La identificación del material vegetal

Tradicionalmente, en la identificación del material vegetal, se utilizan tanto los caracteres botánicos morfológicos como los perfiles cromatográficos que caracterizan a una droga vegetal. La información anatómica y morfológica sustenta la identificación taxonómica convencional de la planta, a la cual se suman una serie de descripciones macro y microscópicas de la parte utilizada que proporcionan los caracteres propios (parámetros de identificación) de la droga vegetal. La información microscópica puede proporcionar una información más completa y detallada en comparación con la macroscópica, sobre todo en muestras donde la parte de la planta está dividida. Los especialistas en esta técnica hacen uso de técnicas histológicas con la finalidad de describir las estructuras celulares propias de la especie ⁽⁷⁾. Estos estudios son particularmente necesarios en el caso de plantas que no habían sido antes consideradas drogas vegetales y menos aún para amplia explotación agroindustrial; plantas provenientes de prácticas tradicionales antiguas o bien conocidas en diversas partes del mundo pero que a través de estudios científicos modernos se convierten ahora en materia prima para la elaboración de nuevos medicamentos. Tal es el caso del trabajo realizado por Rivera-Arce et al. ⁽⁸⁾ en hoja de guayabo (*Psidium guajavae folium*), obtenida de *Psidium guajava* L., que proporciona por primera vez los datos anatómicos y morfológicos característicos de esta droga vegetal para su identificación, dando pauta a un primer acercamiento al control de calidad en el desarrollo de un fitomedicamento a partir de esta especie. El caso de *P. guajava* ha servido para fundamentar la aplicación de técnicas de marcadores genéticos en una especie que presenta una amplia distribución geográfica y que, en México, ha sido tradicionalmente sometida a intenso cultivo

por motivos de explotación comercial de su fruto alimenticio, pero de la que se carecía de información sobre las variaciones polimórficas.

En este caso el fraccionamiento del ADN permitió confirmar que en su inmensa mayoría los cultivos comerciales mexicanos de *P. guajava* presentan el mismo patrón genético conservado, no obstante la presencia de variaciones polimórficas que indican que existen variedades híbridas producto de la manipulación agrícola. También se confirma la baja presencia de otras especies del género *Psidium* que como el “guayabito” (*Psidium sartorianum*) son claramente diferentes genéticamente como se observa en la FIGURA 2.

En la identificación genética de una planta se aplican técnicas de fraccionamiento del ADN total para la obtención de patrones genéticos los cuales deberán ser conservados y reproducibles, de otra forma se deduce que la muestra analizada presenta adulteración por otra u otras especies. En este mismo contexto, se han desarrollado oligonucleótidos específicos para la amplificación de regiones intergénicas (como el ARNr de la subunidad 5S ribosómica, ITS1-5.8S-ITS2 ribosómico, *atpF* y *atpA* del ADN plástido o *trnL/trnF* del cloroplasto) aplicando la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR), autenticando el origen genético de la droga vegetal y la presencia de adulterantes. En el diseño de oligonucleótidos se debe cuidar la especificidad y accesibilidad para la identificación de muestras provenientes de material vegetal fresco o seco ⁽⁹⁾. Nuestra investigación ha permitido el establecimiento de patrones genéticos y marcadores específicos que autentican a la especie *P. guajava* y sus selecciones más comerciales en México.



FIGURA 2. Marcadores moleculares de ADN para la autenticación de *Psidium guajava*.

M: Marcador de ADN. P y C: Controles. 1 al 4: ADN de hoja fresca. 5 al 6: ADN de hoja seca. Lane 7: ADN de *Psidium sartorianum*. 8: ADN de *Feijoa sellowiana*.

En un segundo caso, con el propósito de identificar los posibles adulterantes que suelen presentarse en los embarques de corteza de la corteza de tepescohuite (*Mimosae tenuiflorae cortex*), obtenida de *Mimosa tenuiflora* (Will.) Poir. Se aplicaron las técnicas de fraccionamiento del ADN en las diversas muestras colectadas bajo la denominación popular de tepescohuite. Se demostró que el patrón genético de la verdadera *M. tenuiflora* es claramente identificable de sus numerosos adulterantes, cortezas que resultaron pertenecientes a otras especies botánicas (FIGURA 3). De forma complementaria, se pudo discriminar también entre dos variantes polimórficas de *Mimosa* que popularmente se denominan “tepescohuite macho” y “tepescohuite hembra” por la presencia o ausencia de espinas en la corteza del árbol.

La acumulación del principio activo

La adecuada acumulación de principios activos en la droga vegetal se atribuye a la cosecha de la planta en un estado fenológico óptimo, dentro de una misma zona ecológica y, si fuera el caso, a la misma variedad y época del año. Técnicamente la determinación de la concentración de los principios activos se ha realizado casi siempre mediante la aplicación de técnicas cromatográficas. La evolución de esta técnica ha ido a la par con el desarrollo de procedimientos analíticos rápidos que permiten una eficaz determinación de las concentraciones de compuestos activos en una muestra de materia prima. Tal es el caso, por ejemplo, de la descripción de este fenómeno por Yan *et al* ⁽¹⁰⁾, quienes emplearon la cromatografía de gases para la detección de compuestos volátiles presentes en el fruto

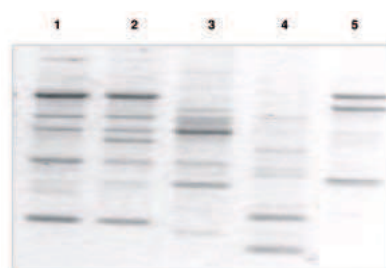


FIGURA 3. Patrón genético de dos variedades *Mimosa tenuiflora* y sus adulterantes.

1: Primera variedad. 2: Segunda variedad. 3 al 5: Adulterantes.

de *Gardenia jasminoides* Ellis, a lo largo del ciclo estacional, viéndose modificados en cada estación del año y dependiendo de la región geográfica en que se cultiva la planta.

En este caso, la identificación de marcadores moleculares que correlacionan la acumulación del principio activo con el material vegetal idóneo, son una herramienta de apoyo muy útil en el control de calidad y en la producción de fitomedicamentos. En un trabajo realizado en nuestro laboratorio, se lograron identificar marcadores genéticos asociados a la acumulación de quercetina (principio activo predominante) en individuos de *P. guajava* provenientes de diferentes zonas geográficas, correlacionando la mayor acumulación de este principio activo en cada individuo durante el año con las variaciones polimórficas de las muestras analizadas ⁽¹¹⁾. Así se encontró una variación polimórfica con individuos particularmente ricos en principio activo, lo que abre las posibilidades de contar con una variedad especialmente idónea para la elaboración del fitomedicamento.

Las pruebas de pureza

La contaminación microbiológica de la droga vegetal por prácticas inadecuadas en la cosecha y post-cosecha, se detecta por medio de técnicas microbiológicas rutinarias que ya han sido aplicadas en el control de las drogas vegetales y en otras áreas relacionadas con el consumo humano de productos vegetales. Sin embargo, recientemente se ha establecido que la contaminación vírica también puede alterar significativamente la composición química del material vegetal. El origen y las consecuencias de esta contaminación están actualmente en estudio. Se ha sugerido que los virus presentes en las plantas pueden actuar como inductores de mecanismos que faciliten la acumulación de principios activos o, por el contrario, como bloqueadores de rutas metabólicas primarias o secundarias, provocando la disminución de los metabolitos secundarios. También se presume que los virus produzcan inmunosupresión en la planta, facilitando la penetración de otros factores infecciosos.

De una manera u otra, la detección de virus se realiza, generalmente, por pruebas inmunológicas empleando anticuerpos que detectan los antígenos del virus, siendo esta prueba muy común en plantas con interés agronómico (tomate, tabaco, papaya, etc.). En este campo, la utilización de la técnica de amplificación por el mecanismo del círculo rodante (RCA, *Rolling Circle Amplification*), específica para detec-

tar el ADN circular de los virus, sería de gran utilidad para establecer su presencia en el material vegetal ⁽¹²⁾. El ADN vírico se discrimina del plasmídico por oligonucleótidos específicos y por la comparación con material vegetal sano. Estudios en esta dirección muestran que la aplicación de las técnicas moleculares para la mejor interpretación del metabolismo de las plantas esta aun en plena exploración.

Dirección de contacto

Iris Feria-Romero

Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico de Fitomedicamentos. Edificio CORSE, 2º piso. Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Avenida Cuauhtémoc esquina Avenida Central. Colonia Doctores. México D.F. 06720, México.

e-mail: irisferi@yahoo.com.mx

Referencias bibliográficas

1. Farmacopea herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. FEUM Extrafarmacopea Herbolaria. México: Secretaría de Salud, 2001.
2. WHO. WHO monographs on selected medicinal plants. Vol 1 y 2. Geneva: World Health Organization, 1999.
3. Cañigeral S, Vila R. La Fitoterapia Racional. En: Vanaclocha B. y Cañigeral S. (eds.), Fitoterapia. Vademécum de prescripción. 4ª Ed., pp. 15-27. Barcelona: Masson, 2003.
4. Friar E. Isolation of DNA from plants with large amounts of secondary metabolites. *Methods in enzymology* 2005; 395: 3-14.
5. Wulff E, Torres S, González V. Protocol for DNA extraction from potato tubers. *Plant Molecular Biology Reporter* 2002; 20: 187a-187e.
6. Tel-Zur N, Abbo S, Myslabodski D, Mizrahi Y. Modified CTAB procedure for DNA isolation from Epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter* 1999; 17: 249-254.
7. Ruzin S. Infiltrating and Embedding Tissues. En: Ruzin S. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press. New York, pp. 61-85, 1999.
8. Rivera-Arce E, Gatusso M, Lozoya X. Anatomical identity parameters of the crude drug *Psidium guajavae* folium. *Pharmaceutical Biology* 2003; 42(7): 516-521.
9. Feria I, López M, Serrano H, Orozco S y Lozoya X. Aplicación de la biología molecular en el control de calidad de los fitomedicamentos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2006. En prensa.
10. Yan S, Xin W, Luo G, Wang Y, Cheng Y. Chemical fingerprinting of *Gardenia jasminoides* fruit using direct sample introduction and gas chromatography with mass spectrometry detection. *Journal AOAC International* 2006; 89(1): 40-45.
11. Feria-Romero I, Astudillo-de la Vega H, Chavez-Soto M, Rivera-Arce E, López M, Serrano H, Lozoya X. Molecular RAPD markers associated to quercetin accumulation in *Psidium guajava* L. individuals. *Planta Medica*. En revisión.
12. Rector A, Tachezy R, Van Ranst M. A sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification. *Journal of virology* 2004; 78(10): 4993 - 4998.