



II COLÓQUIO NACIONAL DE PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS

Vila das Caldas do Gerês
Terras de Bouro
28 e 29 de Setembro de 2007

Actas

Caracterização química e micromorfológica de populações Portuguesas de *Thymbra capitata*

Leandra Rodrigues¹, Teresa Vasconcelos¹, Paulo Forte¹, Ana Monteiro¹, Ruben Rocha¹, Generosa Teixeira², Margarida Moldão Martins¹ e Ana Cristina Figueiredo³

¹Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal, anamonteiro@isa.utl.pt

²Centro de Biologia Ambiental, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Avenida Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal, gteixeira@ff.ul.pt

³Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa, DBV, Centro de Biotecnologia Vegetal, C2, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal, acsf@fc.ul.pt

Resumo

Thymbra capitata (L.) Cav. foi uma das primeiras espécies da família *Lamiaceae* a ser utilizada como planta medicinal devido às características do seu óleo essencial. Presentemente, o seu óleo é um dos mais caros, sendo utilizado na indústria farmacêutica, em perfumaria e cosmética e ainda como condimento.

Em Portugal, o habitat desta planta encontra-se em regressão, podendo já ser considerada uma espécie ameaçada. Pode ser encontrada na região de Lisboa, na Serra da Arrábida e no Barrocal Algarvio. Neste trabalho foram realizados estudos micromorfológicos e fitoquímicos em populações destas 3 zonas a fim de compreender a biodiversidade a elas associada.

A caracterização micromorfológica foi feita por microscopia óptica e microscopia electrónica de varrimento. Os tricomas peltados e capitados encontrados, são similares aos tricomas glandulares típicos das *Lamiaceae*, embora com algumas diferenças, nomeadamente no número de células da cabeça dos tricomas peltados, variando o seu número entre 8 e 12.

Os óleos essenciais foram isolados das partes aéreas, folhas e flores, por hidrodestilação e a sua composição química foi determinada por GC e GC-MS. O carvacrol (51-77%) foi o composto maioritário, seguido do timol (9-21%), do *p*-cymeno (5-11%) e do γ -terpineno (2-9%). Os resultados revelam uma grande homogeneidade na composição do óleo essencial entre as populações colhidas em diferentes zonas geográficas.

Palavras-chave: *Lamiaceae*, tricomas secretores, óleos essenciais, GC, GC-MS

Abstract

Title: Chemical and micromorphological characterization of Portuguese populations of *Thymbra capitata*.

Thymbra capitata is a characteristic species of the *Lamiaceae* family, growing wild in the Mediterranean basin, it is now in regression in Portugal. *T. capitata* essential oil have been used since ancient times as a medicine, in cosmetic and perfumery and as a flavouring, being one of the most expensive among the origanum oils.

The micromorphology, distribution and density of *T. capitata* trichomes were studied, using light and scanning electron microscopy. Peltate and capitate trichomes

are similar to those found in other *Lamiaceae*, although a few morphological differences are seen, namely in the peltate broad head cell number: 8-12-celled head.

The composition of the essential oils, isolated from the populations collected, was determined by GC and GC-MS. Carvacrol (51-77%) was the major compound, followed by thymol (9-21%), *p*-cymene (5-11%) and γ -terpinene (2-9%). Our results point to a similar essential oil composition, in plants collected at the same developmental stage, growing on different localities.

Keywords: *Lamiaceae*, glandular trichomes, essential oils, GC, GC-MS

Introdução

Thymbra capitata (L.) Cav. (= *Coridothymus capitatus* (L.) Rchb. f.; = *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans. & Link) é uma planta aromática, devido à presença de óleos essenciais produzidos em tricomas secretores, presentes nas suas estruturas vegetativas e reprodutoras, sendo por isso muito apreciada em culinária e perfumaria. É também utilizada como planta medicinal e na indústria alimentar na conservação de alimentos devido às propriedades antifúngicas e antibacterianas atribuídas aos seus óleos essenciais (Miguel *et al.*, 2005).

Dados de herbário, revelaram uma regressão da distribuição deste taxon, nomeadamente devido a colheitas indiscriminadas e destruição do seu habitat natural. Actualmente, esta espécie mantém-se distribuída por 3 zonas principais, Zona de Lisboa, Setúbal e Barrocal Algarvio (Franco, 1984).

Conhecem-se estudos sobre algumas populações portuguesas de *T. capitata*, todos eles respeitando à composição dos óleos essenciais de populações oriundas do Barrocal Algarvio, e às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Salgueiro, 1995; Moldão-Martins *et al.*, 2000; Faleiro *et al.*, 2005; Miguel *et al.*, 2003; Miguel *et al.*, 2005). Alguns estudos têm evidenciado diferenças de composição entre óleos essenciais extraídos de populações oriundas de diferentes habitats (Fleisher *et al.*, 1984; Salgueiro, 1995; Cosentino *et al.*, 1999). Estas variações químicas, podem alterar as propriedades químicas dos óleos, nomeadamente, a sua actividade antimicrobiana e características aromáticas (Cosentino *et al.*, 1999).

O presente estudo teve como objectivo compreender a biodiversidade desta espécie em Portugal, de forma a desenvolver estratégias de preservação, bem como de promoção da espécie como cultura aromática de interesse. A caracterização micromorfológica das estruturas responsáveis pela produção e secreção dos óleos essenciais foi realizada por microscopia óptica e de varrimento. A natureza química dos óleos essenciais foi determinada a fim de identificar possíveis quimiotipos.

Material e métodos

Material vegetal. Este estudo foi baseado em populações de *T. capitata* colhidas no seu habitat natural. Cada amostra foi constituída por folhas e flores de, pelo menos, 15 indivíduos de cada população, escolhidos aleatoriamente, colhidas em plena floração. No total, foram estudadas 8 populações, oriundas do Barrocal Algarvio (amostras A e B), Zona de Setúbal (amostras C a G) e da Zona de Lisboa (amostra H). De forma a acompanhar o rendimento em óleos essenciais ao longo do ciclo da planta, foram colhidas amostras com 4 semanas de intervalo.

Estudos micromorfológicos. Estes estudos foram efectuados recorrendo quer a

material fresco quer a material fixado em glutaraldeído (Hayat, 1981). Para além de cortes transversais foi feito o destaque do tecido epidérmico e, sempre que necessário, o material foi sujeito a clarificação em hipoclorito de sódio (1%).

As observações foram realizadas num microscópio óptico Nikon ECLIPSE E400, equipado com um adaptador Nikon Coolpix MDC. As imagens foram obtidas com uma máquina fotográfica digital Nikon Coolpix 995. Para a microscopia electrónica de varrimento, as amostras, após fixação e levadas a ponto crítico, foram metalizadas num aparelho Jeol JFC-1200 e examinadas a 15kV, usando um microscópio electrónico de varrimento Jeol JSM-5220 LV, equipado com um sistema de aquisição de imagem. As medições e contagens foram realizadas com recurso a software de análise de imagem.

Quantificação e caracterização dos óleos essenciais. Os óleos essenciais foram isolados, de material seco ao ar, por hidrodestilação durante 1h, num aparelho de Clevenger. A caracterização química foi obtida por GC e GC-MS, de acordo com Faleiro *et al.* (2005). Os componentes do óleo essencial foram identificados pelos seus índices de retenção sobre as duas colunas e dos seus espectros de massa, comparados com os valores de amostras de referência obtidas por síntese laboratorial, existentes numa biblioteca desenvolvida no laboratório. A composição percentual dos óleos essenciais foi ainda utilizada na determinação da relação entre as diferentes amostras, pela análise de cluster, usando o programa NTSYS (versão 2.02, Exeter Software, Setauket, New York) (Rohlf, 1998). A correlação foi seleccionada como medida de semelhança e utilizou-se o agrupamento segundo a associação média (UPGMA) na definição dos clusters. A análise de correlação foi realizada de acordo com o descrito por Pestana e Gageiro (2000), considerando a existência de uma associação muito alta entre amostras, se o seu coeficiente de correlação estiver entre 0,9 e 1, alta, se variar entre 0,7 e 0,89, moderada entre 0,4 e 0,69, baixa, entre 0,2 e 0,3 e muito baixa se for inferior a 0,2.

Resultados

As diferentes populações de *T. capitata* apresentam indumento com características semelhantes. A superfície das estruturas vegetativas e reprodutoras apresentam tricomas não glandulares e glandulares. Os tricomas não glandulares incluem 2 tipos: i) unicelulares, com bases alargadas e ápices agudos, encontrando-se em ambas as faces da folha, particularmente na face adaxial (Fig. 1A) e ii) multicelulares, com 2 a 4 células, uniseriados e também com base alargada e ápices agudos, situados nas margens das folhas (Fig. 1B).

Os tricomas glandulares incluem também 2 tipos diferentes: i) Peltados, distribuídos pelas duas faces da folha, sendo mais predominantes na face abaxial, apresentam uma pequena célula basal e uma cabeça circular, com 8 a 12 células secretoras, num arranjo radial, podendo formar 1 a 2 círculos (Fig. 1C), com um diâmetro de 81-91µm na face superior, e de 81-100µm na face inferior. O óleo secretado pelas células glandulares é acumulado num espaço formado pelo destacamento da cutícula, que ocorre de forma horizontal (Fig. 1C). Em folhas adultas a densidade de tricomas peltados é de 2.5 tricomas peltados/mm² na face adaxial, e de 6 tricomas glandulares/mm² na face abaxial. ii) Capitados, tipo I, constituídos por uma célula basal e por uma cabeça de forma redonda, de 18-26µm de diâmetro, a oval, com 32-40µm de comprimento uniformemente distribuídos nas duas epidermes foliares (Fig. 1D). Capitados, tipo II, constituídos por uma a duas células basais de largura 10-20µm e

por uma cabeça alongada, idêntica à célula basal. Estes valores mostraram-se muito idênticos em todas as populações estudadas.

O rendimento em óleo essencial é baixo (0.3-0.7%) no período de dormência (Janeiro a Fevereiro), aumentando significativamente com a aproximação do período reprodutivo (floração), entre Junho e Julho, com um rendimento de 4.3%. Os componentes do óleo essencial identificados, representam, 96-100% e estão listados na Tabela 1. O carvacrol é o componente maioritário de todas as populações (51-77%), seguido do timol (9-21%), *p*-cimeno (5-11%) e do γ -terpineno (2-9%).

Discussão

O indumento apresentado por *T. capitata* é típico da família *Lamiaceae*, sendo formado por tricomas não secretores uni- e pluricelulares e tricomas secretores característicos, classificados em duas categorias, peltados e capitados (Werker *et al.*, 1985). Os tricomas secretores peltados com 8 células são considerados como o arranjo mais comum nesta família (Werker *et al.*, 1985). Em *T. capitata* este número é variável, encontrando-se entre 8 e 12 células. Os tricomas peltados são considerados como sendo os principais responsáveis pela síntese dos óleos essenciais (Fanh, 1988).

A distribuição de tricomas pelas diferentes populações bem como as suas características deixam transparecer uma grande regularidade e homogeneidade. A justificação provável tem a ver com as condições de habitat onde esta espécie se encontra serem muito características, solos calcários, pobres e pedregosos, o que pode levar ao mesmo tipo de resposta, por parte das plantas das diferentes populações.

A densidade de tricomas secretores peltados é o dobro na página abaxial, em relação à página adaxial. Distribuições similares, maior densidade de tricomas peltados na face adaxial, têm sido reportadas para *Lamiaceae* (Antunes & Sevinato-Pinto, 1991; Ascensão *et al.*, 1995), embora não seja um padrão para todas as espécies (Bosabalidis & Skoula, 1998).

Relativamente à composição química do óleo, todas as populações de *T. capitata* estudadas evidenciaram uma elevada quantidade de carvacrol, o que está de acordo com estudos anteriores (Salgueiro, 1995; Faleiro, 2005). Este resultado confirmou que as populações portuguesas de *T. capitata* pertencem ao quimiotipo carvacrol. Embora esta afirmação seja correcta para a maioria dos óleos essenciais de *T. capitata* estudados, existem alguns estudos publicados que reportam o timol, ou ambos os terpenos fenólicos, como principais componentes do óleo essencial (Fleisher *et al.*, 1984; Cosentino *et al.*, 1999). Outro estudo aplicado a *Lamiaceae* ricas em fenóis, na ilha de Creta, revelaram que uma preponderância de timol ou carvacrol no óleo essencial está associada às condições climáticas e habitat em que as plantas crescem (Karousou *et al.*, 2005). A análise de clusters, revelou uma elevada correlação entre as populações estudadas, indicando que as populações portuguesas de *T. capitata* são caracterizadas por uma elevada homogeneidade, dados em acordo com outros autores (Fleisher *et al.*, 1984; Salgueiro, 1995) que consideram esta espécie, como uma das mais quimicamente estáveis do género *Thymus*.

Foi detectada igualmente uma forte correlação entre o rendimento do óleo e a fase do ciclo vegetativo e reprodutivo em que os exemplares se encontram, o que também está de acordo com outros estudos (Hedhili *et al.*, 2002).

Agradecimentos

Ao Programa Agro - Medida 8 - Desenvolvimento Tecnológico e Demonstração – Acção 8.1 – Desenvolvimento Experimental e Demonstração (DE&D) pelo financiamento do Projecto 522 “Conservação de Germoplasma, produção e utilização dos taxa *Mentha pulegium*, *Mentha cervina* e *Thymbra capitata*”.

Referências

- Antunes, T. & Sevinete-Pinto, I. 1991. Glandular trichomes of *Teucrium scorodonia* L. Morphology and histochemistry. *Flora* 185, 65-70.
- Ascensão, L., Marques, N. & Pais, M.S. 1995. Glandular Trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany* 75 619-626.
- Bosabilidis, A.M. & Skoula, M. 1998. A comparative stud of the glandular trichomes on the upper and lower leaf surfaces of *Origanum X intercedens* Rech. J. Essent. oil Res. 10, 277-286.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E & Palmas, F. 1999. In-Vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus oils. *Letters in Applied Microbiology* 29, 130-135.
- Fahn, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* 108: 229-257.
- Faleiro, L., Miguel, G., Gomes, S., Costa, L., Venâncio, F., Teixeira, A., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. & Pedro, L.G. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. J. Agric. Food Chem. 53, 8162-8168.
- Fleisher, A., Fleisher, Z. & Abu-Rukun, S. 1984. Chemovarieties of *Coridothymus capitatus* L. Rchb. Growing in Israel. J. Sci. Food Agric. 35, 495-499.
- Hayat, M. 1981. Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications. 2nd ed. Vol.1, London: Edward Arnold Publishers.
- Hedhili, L., Romdhane, M., Abderrabba, A., Planche, H. & Cherif, I. 2002. Variability in essential oil composition of Tunisian *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. Et Link. *Flavour Fragr. J.* 17, 26-28.
- Karousou, R., Koureas, D.M. & Kokkini, S. 2005. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 200 sites of Crete. *Phytochemistry* 66, 2668-2673.
- Miguel, M.G., Figueiredo, A.C., Costa, M.M., Martins, D., Duarte, J., Barroso, J.M.G & Pedro, L.G. 2003. Effect of the volatile constituents isolated from *Thymus albicans*, *Th. Mastichina*, *Th. carnosus* and *Thymbra capitata* in sunflower oil. *Nahrung/Food*, 47, 397-402.
- Miguel, M.G., Falcato-Simões, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.M.G., Pedro, L.G. & Carvalho, L. 2005. Evaluation of the antioxidant activity of *Thymbra capitata*, *Thymus mastichina* and *Thymus camphoratus* essential oils. *J. of Food Lipids* 12, 181.
- Moldão-Martins, M. et al. (2000). *Thymus capitatus* from southern Portugal. Vegextract. AIR Agro-Industrial Research. European Commission – DGXII – Science, Research and Development.
- Pestana MH, & Gageiro JN (2000). *Análise de Dados para Ciências Sociais. A complementaridade do SPSS.* Edições Sílabo, Lisboa.
- Salgueiro, L. 1995. Os tomilhos Portugueses. Ph.D. Thesis, Faculdade de Farmácia de Coimbra, Portugal.

Werker, E., Ravid, U. & Putievsky, E. 1985. Structure of glandular hairs and identification of the main components of there secreted material in some species of the *Labiatae*. Isr J Bot. 34, 31–45.

Quadros e figuras

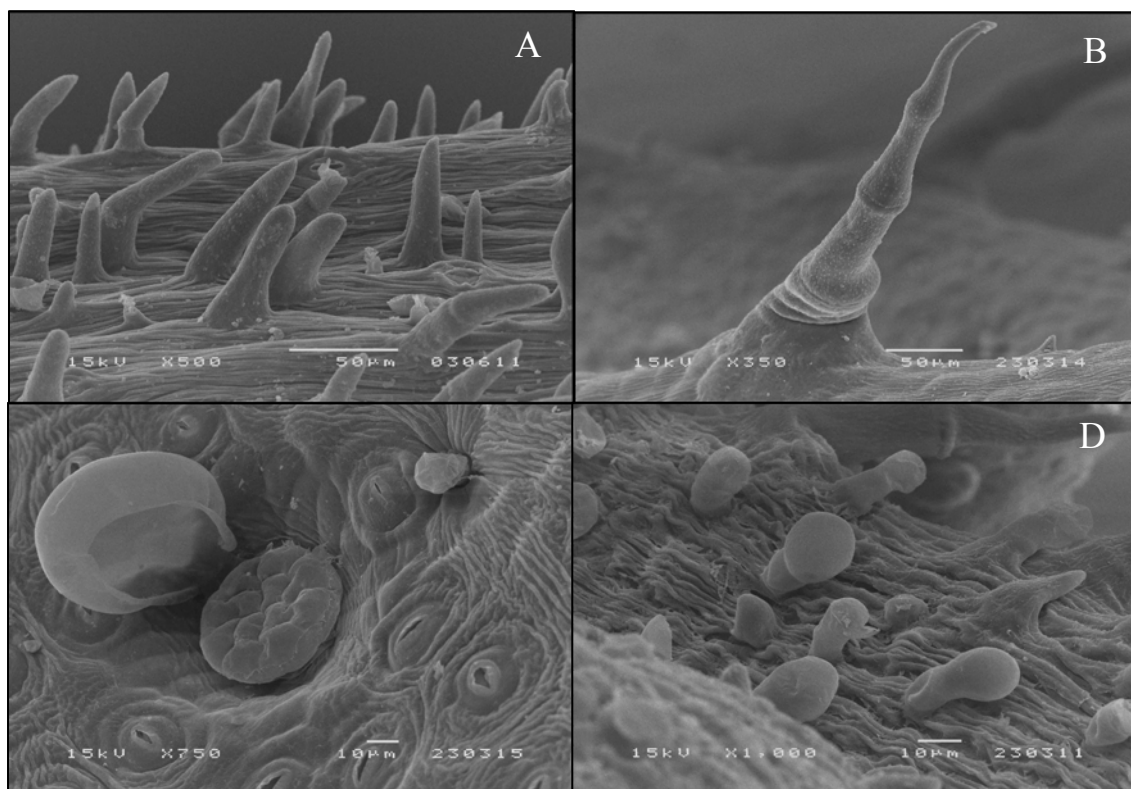


Figura 1. Superfícies foliares de *Thymbra capitata* onde se podem ver tricomas glandulares e não glandulares. (A) Tricomas não glandulares unicelulares distribuídos pela superfície foliar. (B) Tricomas não glandulares multicelulares situados nas margens das folhas. (C) Tricomas glandulares peltados, com 12 células secretoras, exibindo uma simetria radial, com ruptura horizontal da cutícula. (D) Diferentes morfologias da cabeça secretora dos tricomas glandulares capitados, tipo I e II

Tabela 1. Composição dos óleos essenciais isolados por hidrodestilação das partes aéreas de *Thymbra capitata* colhidas, durante a fase de floração, em diferentes regiões de Portugal¹

Componentes	RI	<i>Thymbra capitata</i>							
		Algarve		Setúbal					
		A	B	C	D	E	F	G	H
α -Tujeno	924	1.2	1.0	1.0	0.5	0.6	0.7	0.3	0.1
α -Pineno	930	1.3	2.1	1.0	0.7	0.6	0.7	0.2	0.2
Canfeno	938	0.7	2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1
Sabineno	958	v	v	v	v	v	v	v	v
1-Octano-3-ol	961	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	v
β -Pineno	963	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	v
Mirceno	975	1	1.1	1.5	v	1.3	1.4	0.6	v
α -Felandreno	995	0.7	0.7	0.5	v	0.2	0.3	v	v
δ -3-Careno	1000	0.3	0.3	0.2	v	0.1	0.1	v	v
α -Terpineno	1002	1.7	1.2	1.4	0.2	1.3	1.4	0.3	0.1
p-Cimeno	1003	8.7	10.1	9.2	11.1	8.7	9.7	5	2.2
β -Felandreno	1005	0.5	0.6	0.4	v	0.2	0.2	v	v
Limoneno	1009	0.8	0.8	0.5	v	0.2	0.4	0.1	v
<i>trans</i> - β -Ocimeno	1027	v	0.1	v	v	v	0.1	0.1	v
γ-Terpineno	1035	9.1	5.5	7.4	7.7	6.8	7.2	2.3	1.4
<i>trans</i> -Sabineno hidratado	1037	v	v	0.1	v	0.2	0.2	0.1	v
2,5-Dimetilestireno	1059	v	v	v	v	v	v	v	v
Terpinoleno	1064	v	v	v	v	v	v	v	v
<i>cis</i> -Sabineno hidratado	1066	v	v	v	v	v	v	v	v
Linalol	1074	0.1	0.2	0.1	v	0.1	0.1	v	v
<i>trans</i> -p-2-Menteno-1-ol	1095	v	v	v	v	0.2	v	v	v
Mentona	1120	v	v	v	v	v	v	v	v
Isomentona	1126	v	0.8	v	v	0.1	0.2	0.2	v
Borneol	1134	0.3	0.8	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3	v
Terpineno-4-ol	1148	0.3	3.6	0.5	v	0.4	0.6	0.4	v
Pulegona	1210	v	v	v	v	0.3	1	0.8	v
Timol	1275	11.7	10.4	11.9	12.3	8.2	9.4	21.4	15.3
Carvacrol	1286	58.4	51.7	59.3	61.2	65.6	61.1	62.4	76.6
Eugenol	1327	v	v	v	v	v	v	0.4	v
Carvacrol acetato	1348	v	v	1.6	v	0.1	v	0.2	v
β -Cariofileno	1414	1.3	1.9	2.2	4.4	2.6	2.1	2.4	3.5
Aromadendreno	1454	v	0.1	0.3	v	0.1	v	v	v
α -Humuleno	1447	v	v	v	v	v	v	v	v
Viridifloreno	1487	0.4	v	v	v	v	v	v	v
Espatulenol	1551	v	0.2	v	v	0.2	0.1	v	v
Óxido de β -Cariofileno	1561	0.5	0.8	0.5	1.2	0.6	0.5	1.9	v
% identificação		99.2	96.4	100.0	100.0	99.1	98.1	99.7	99.5

¹A - Paderne. B - Tavira. C - Moinhos Vivos, Palmela. D - Albarquel, Arrábida. E - Serra d'Arrábida. F - Palmela. G - Azeitão. H - Alcoitão.