



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 molecular de *Thymus caespititius*

Marta D. Mendes^{1,*}, Helena Trindade¹, Luis G. Pedro¹, Ana C. Figueiredo¹, José G. Barroso¹ e Susana S. Fontinha²

¹Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa, DBV, Centro de Biotecnologia Vegetal, C2, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal.

²Serviço do Parque Natural da Madeira, Caminho do Meio, Quinta do Bom Sucesso, 9050-251 Funchal, Madeira, Portugal.

* marta_dani_mendes@hotmail.com

Resumo

As partes aéreas de indivíduos de *T. caespititius* foram colhidas nas ilhas de São Miguel e do Faial, no arquipélago dos Açores, e na ilha da Madeira, durante a fase de floração, em Julho de 2006. Os óleos essenciais foram obtidos por destilação-extracção durante 3h e analisados por CG e CG-EM. Na análise molecular, utilizaram-se marcadores de RAPDs de forma a avaliar a diversidade genética dos diferentes indivíduos de *T. caespititius*.

Os óleos essenciais apresentaram uma cor amarelada. Os compostos maioritários identificados nas amostras dos Açores foram o carvacrol (44–68% em São Miguel e 47–65% no Faial) e o acetato de carvacrilo (5–23% em São Miguel e 2–5% no Faial). Nas amostras da ilha da Madeira os compostos maioritários identificados foram o α -terpineol (22–33%) e o β -mirceno (6–10%).

Dos 51 primers de RAPDs testados apenas 22 foram seleccionados com base na reprodutibilidade e nos polimorfismos apresentados. A análise molecular baseada no conjunto dos 22 primers não evidencia uma separação evidente dos indivíduos por ilhas. No entanto, os padrões de bandas nos indivíduos SAP4, CT2 e PR1 revelam diferenças em relação aos outros indivíduos de *T. caespititius*.

Uma vez que os RAPDs são marcadores aleatórios presentes ao longo de todo o genoma, não reflectem, necessariamente, características morfológicas ou químicas específicas. Deste modo, a utilização de outro tipo de marcador molecular em combinação com os RAPDs, pode ser útil na tentativa de encontrar os genes responsáveis pela produção dos metabolitos secundários.

Palavras-chave: Lamiaceae, Óleo essencial, Quimiotipos, RAPDs, Marcadores moleculares

Abstract

Title: Chemical and molecular characterization of *Thymus caespititius*

The aerial parts of individuals of *T. caespititius* were collected on the islands of São Miguel and Faial, archipelago of Azores, and on the island of Madeira, during the full flowering period, in July of 2006. The essential oils were isolated by distillation-extraction during 3h and analyzed by GC and GC-MS. In molecular analysis, RAPDs were used to evaluate the genetic diversity of the different individuals of *T. caespititius*.

The essential oils presented a yellow color. The main components identified in the samples from the Azores islands were carvacrol (44-68% in São Miguel and 47-65%

in Faial) and carvacrol acetate (5-23% in São Miguel and 2-5% in Faial). In the samples from the island of Madeira the main components identified were α -terpineol (22-33%) and β -myrcene (6-10%).

Of the 51 RAPD primers tested only 22 were selected based on reproducibility and high polymorphism. The molecular analysis based on all the 22 primers does not show a clear separation, by island, of the individuals. However, a clear banding profile of SAP4, CT2 and PR1 reveal differences from the others *T. caespititus* individuals.

RAPDs are random markers obtained throughout the genome, and do not reflect necessarily any specific morphological or chemical trait. Other molecular markers combined with RAPDs can be useful in the attempt to find the genes responsible for the production of the secondary metabolites.

Keywords: Lamiaceae, Essential oil, Chemotypes, RAPDs, Molecular markers

Introdução

Thymus caespititius Brot (Lamiaceae), vulgarmente conhecido como tormentelo ou erva-úrsula, é uma planta endémica do noroeste da Península Ibérica e dos arquipélagos dos Açores e da Madeira (Pereira et al., 2003). As suas propriedades aromáticas são conhecidas há muito, uma vez que esta espécie é utilizada na culinária regional, sendo também utilizada com fins medicinais, sendo-lhe atribuída actividade antiséptica, desodorizante e desinfectante. Já o seu óleo essencial é utilizado em perfumaria, elixires bucais e medicamentos (Simon et al., 1984).

Estudos anteriores revelaram diferenças significativas na composição do óleo essencial entre populações de *Thymus caespititius* colhidas na região noroeste de Portugal Continental e populações colhidas nas ilhas dos Açores (Salgueiro et al., 1997).

Os marcadores moleculares têm sido aplicados com sucesso em várias espécies vegetais, permitindo identificar cultivares, fornecendo informações sobre as relações genéticas entre indivíduos e espécies, contribuindo também para estudos evolutivos e ecológicos (Fracaro et al., 2005). Como tal, é necessário um grande número de marcas polimórficas para estabelecer as relações genéticas e a diversidade genética (Souframanien & Gopalakrishna, 2004). Os RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) provaram ser uma ferramenta muito útil, pois proporcionam uma análise rápida das diferenças genéticas entre genótipos (Fracaro et al., 2005). Esta técnica utiliza primers arbitrários que detectam polimorfismos, não sendo necessária informação prévia da sequência de nucleótidos. Os polimorfismos funcionam como marcas genéticas, podendo ser usadas na construção de mapas genéticos (Williams et al., 1990). No entanto, têm sido relatados alguns problemas quanto à reprodutibilidade da amplificação por RAPDs (Pejic et al., 1998).

Estudos prévios sobre o polimorfismo químico dos óleos essenciais de *T. caespititius* (Pereira et al., 2000), não revelaram qualquer relação entre este e as características edafo-climáticas das ilhas. Seria interessante, em alternativa, tentar perceber se há correlação entre o padrão genético de diversos indivíduos e a diversidade química dos seus óleos essenciais.

Material e métodos

Material vegetal

Foram colhidas amostras da parte vegetativa de 22 indivíduos de *T. caespititius* durante a fase de floração (Julho 2006) no Arquipélago dos Açores, ilhas de São Miguel (16 indivíduos) e Faial (4 indivíduos) e no Arquipélago da Madeira, ilha da Madeira (2 indivíduos), como se pode ver no Quadro 1. O material vegetal para a análise da composição química dos óleos essenciais e extracção de DNA foi armazenado a -20°C e a -80°C, respectivamente.

Extracção dos óleos essenciais

O óleo essencial foi extraído dos diferentes indivíduos por destilação-extracção durante 3h, utilizando um aparelho Likens-Nickerson (Likens & Nickerson, 1964) com *n*-pentano como solvente orgânico.

Análise dos óleos essenciais

A análise em CG e CG-EM dos óleos essenciais dos diferentes indivíduos de *T. caespititius* foi realizada como descrita em Santos et al. (2005).

Extracção de DNA

O DNA dos diferentes indivíduos de *T. caespititius* foi extraído a partir das folhas, segundo o método descrito por Doyle & Doyle (1987) e modificado por Weising et al. (1995) e adaptado para esta espécie: 1.5g de folhas foram maceradas em azoto líquido, após o que foram adicionados 8mL de tampão de extracção (tampão CTAB – 2% CTAB, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl, água; 2% PVP; 1% β-mercaptoetanol) previamente aquecido a 60°C. A mistura foi incubada a 60°C durante 30min, seguida por duas extracções com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Durante o passo da precipitação dos ácidos nucleicos com isopropanol, utilizou-se NaCl (2,5M) para remoção dos polissacáridos. O precipitado obtido foi dissolvido em tampão TE (1mM EDTA pH 8.0, 10mM Tris-HCl). O RNA foi removido por digestão com RNase (10mg/mL) e as restantes impurezas foram extraídas com clorofórmio. O DNA total foi precipitado com acetato de sódio 3M (pH 5.2) e etanol a -20°C durante a noite. O precipitado foi lavado com uma solução de lavagem (76% etanol, 10mM acetato de amónio) e o DNA foi resuspenso em 400μL de tampão TE.

A qualidade e concentração do DNA total foi analisada por espectrofotometria a 260nm e 280nm. As amostras de DNA foram guardadas a 4°C.

Amplificação por RAPDs

Foram utilizados 51 primers de RAPDs, dos quais 22 foram seleccionados por apresentarem uma boa amplificação para todos os indivíduos de *T. caespititius*.

As reacções de PCR ocorreram numa mistura de 25μL, contendo água destilada esterilizada, 10x tampão de reacção da enzima, 50mM MgCl₂, 10mM dNTPs, 10mg/mL BSA, 25μM primer, 5U/μL Taq polimerase (Invitrogen) e 1μL DNA purificado (10μg/μL). Estas reacções de amplificação consistiram num passo inicial de desnaturação a 94°C durante 5min seguido por 40 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 36°C, 2min a 72°C e 5min a 72°C para a extensão final. A amplificação ocorreu num termociclador TGradient (Biometra).

Para cada primer foram realizadas pelo menos duas reacções de amplificação distintas, de modo a avaliar a reprodutibilidade da reacção. Em todas as reacções de

amplificação foi utilizado um indivíduo de *Thymus carnosus* como controlo externo (“outgroup”).

Os fragmentos da amplificação do DNA foram separados por electroforese em gel de agarose a 2% (tampão 1x TAE e 6µL de brometo de etídio) a 65V durante 3h e visualizados sob luz UV. As imagens foram adquiridas utilizando o “GeneFlash” (Syngene Bio Imaging)

Análise de dados

Dos fragmentos obtidos, apenas foram utilizados os que apresentavam uma boa definição, reprodutibilidade e dimensão entre os 300pb e 2.8kp. As bandas foram avaliadas como presentes (1) ou ausentes (0) nos diferentes indivíduos para cada reacção de RAPD. Os géis foram analisados com o software “Genetools” (Syngene).

Resultados

Os óleos essenciais obtidos dos diferentes indivíduos de *T. caespititius* recolhidos durante a fase floral apresentaram uma coloração amarelada e um forte odor.

Nas 22 amostras de óleo, foram identificados 53 dos componentes detectados nos óleos dos indivíduos colhidos nas ilhas dos Açores e 71 nos óleos dos indivíduos colhidos na ilha da Madeira, resultando numa percentagem de identificação superior a 87% em qualquer amostra. A fracção dos monoterpenos é dominante nos óleos de todos os indivíduos (68-91%), sendo que nas amostras relativas às ilhas dos Açores dominam os monoterpenos oxigenados (64-78%), enquanto que nas amostras da ilha da Madeira a fracção de hidrocarbonetos monoterpénicos (28-40%) está presente em valores próximos aos da fracção dos monoterpenos oxigenados (32-45%) (Quadro 2). A fracção sesquiterpénica é muito menor tanto nas amostras dos Açores como nas da Madeira (2-13% e 13-15%, respectivamente). Os componentes não terpénicos estão presentes em percentagens reduzidas, por vezes vestigiais.

Todos os óleos essenciais obtidos de indivíduos colhidos nas ilhas de São Miguel e Faial do arquipélago dos Açores são ricos em carvacrol (44-68%), aparecendo o acetato de carvacrilo (2-23%) e o *p*-cimeno (4-7%) como os outros componentes mais representativos. Os óleos essenciais obtidos de indivíduos colhidos na ilha da Madeira apresentam um elevado teor em α -terpineol (22-33%), sendo o β -mirceno (6-10%) o segundo composto maioritário. Nestes mesmos óleos essenciais o carvacrol surge em percentagens reduzidas (0.3%) e o acetato de carvacrilo nem sequer é detectado. Nos óleos relativos aos Açores, o α -terpineol foi detectado acima dos 5% apenas numa amostra, estando presente em quantidades vestigiais em diversas amostras.

A análise molecular com os 51 primers de RAPDs nos 22 indivíduos de *T. caespititius* revelou que nem todos os primers amplificavam, isto é, ou não produziam qualquer produto de amplificação, ou formavam produtos de amplificação fracos ou ambíguos. Em cerca de 22 primers obtiveram-se produtos de amplificação claros e reprodutíveis, sendo detectados polimorfismos nos diferentes indivíduos *T. caespititius*. Dos primers utilizados para avaliar as relações genéticas dos indivíduos obteve-se 86% de bandas polimórficas, não entrando em conta com o número de bandas adicionadas pela presença do controlo externo, *T. carnosus* (Quadro 3).

Utilizando as estratégias descritas para a extracção do DNA e condições de amplificação com os primers seleccionados, foi possível obter amplificação em todos os indivíduos em estudo. Na figura 1 vêm exemplificados padrões de amplificação obtidos por primers de RAPDs nos 22 indivíduos de *T. caespititius* e no controlo externo. Como

se pode constatar, diferentes primers deram origem a diferentes padrões de amplificação. Os indivíduos SAP4, CT2 e PR1 por exemplo, apresentaram um padrão de bandas diferente dos outros indivíduos, sugerindo uma menor semelhança com os outros indivíduos de *T. caespitius*. A análise molecular preliminar não evidenciou uma separação entre os indivíduos dos Açores e da Madeira. Como era de prever, o controle externo apresentou padrões de bandas muito diferentes dos restantes indivíduos em estudo.

Discussão

Os indivíduos colhidos no arquipélago dos Açores, apesar de algumas pequenas diferenças relativas a compostos individuais, apresentam perfis químicos idênticos no que se refere a compostos maioritários e a componentes agrupados. No entanto, estudos prévios permitiram verificar a ocorrência de polimorfismo químico noutras ilhas dos Açores, curiosamente mais evidente entre populações de *T. caespitius* dentro da mesma ilha do que entre populações de ilhas diferentes (Pereira et al., 2000, 2003).

A simples observação dos dados da Quadro 2 revela que os indivíduos de *T. caespitius* da ilha da Madeira apresentam um perfil químico diferente dos indivíduos dos Açores. Segundo Salgueiro et al. (1997) a elevada proporção de α -terpineol nos óleos essenciais da Madeira é muito semelhante à observada nas populações de *T. caespitius* de Portugal continental. A presença de α -terpineol como composto maioritário ocorre também em algumas populações de ilhas dos Açores, nomeadamente as designadas por SJ5, SJ6 e SJ10 da ilha de São Jorge (Pereira et al., 2000) e as da ilha da Graciosa (Pereira et al., 2003). Contudo, a percentagem de sabineno e de β -mirceno, dois componentes importantes dos óleos dos indivíduos da ilha da Madeira, é reduzida nos óleos dessas populações, o que provoca um afastamento em termos de agrupamento com base no perfil químico.

A análise molecular preliminar, utilizando todos os primers, não corrobora a separação clara entre os indivíduos da Madeira e dos Açores. Sendo os RAPDs marcadores aleatórios, vão levar à amplificação de sequências presentes ao longo de todo o genoma e como tal podem não reflectir, necessariamente, características morfológicas ou químicas específicas. Assim, os resultados podem não ser concordantes com os dados obtidos através da análise química dos óleos essenciais. No entanto, é necessário explorar mais os dados obtidos, analisando cada um dos agrupamentos obtidos com cada um dos marcadores de RAPDs.

São necessários igualmente mais estudos para tentar compreender quais os genes envolvidos na produção de metabolitos secundários e como é que estes funcionam. Logo, a combinação de outro tipo de marcador molecular, como por exemplo os ISSRs, com os RAPDs pode ser uma via alternativa a explorar.

Referências

- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.
- Fracaro, F., Zacaria, J. & Echeverrigaray, S. 2005. RAPD based genetic relationships between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 409-417.
- Likens, S.T. & Nickerson, G.B. 1964. Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Am. Soc. Brewing Chem. Proc.* 5-13.

- Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G, Motto M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor Appl Genet* 97, 1248-1255.
- Pereira, S.I., Santos, P.A.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Salgueiro, L.R., Deans, S.G. & Scheffer, J.J.C. 2003. Chemical polymorphism of the essential oils from populations of *Thymus caespititius* grown on the islands Pico, Faial and Graciosa (Azores). *Phytochem. Anal.* 14, 228-231.
- Pereira, S.I., Santos, P.A.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Salgueiro, L.R., Deans, S.G. & Scheffer, J.J.C. 2000. Chemical polymorphism of the essential oils from populations of *Thymus caespititius* grown on the island S. Jorge (Azores). *Phytochemistry*, 55, 241-246.
- Rohlf, J.F. 1992. NTSYS-pc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics. New York.
- Salgueiro, L.R., Vila, R., Tomi, F., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Cañigüeral, S., Casanova, J., Cunha, A.P. & Adzet, T. 1997. Variability of essential oils of *Thymus caespititius* from Portugal. *Phytochemistry* 45, 307-311.
- Santos, P.A.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Salgueiro, L.R., Fontinha, S.S., Deans, S.G. & Scheffer, J.J.C. 2005. Chemical polymorphism of populations of *Thymus caespititius* grown on the islands Corvo, Flores, São Miguel and Terceira (Azores) and on Madeira, assessed by analysis of their essential oils. *Plant Science* 169, 1112-1117.
- Simon, J.E., Chadwick, A.F. & Craker, L.E. 1984. An Indexed Bibliography 1971-1980 – The scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone. Elsevier Science Publishers. Amesterdão. p: 92-93.
- Souframanien J, Gopalakrishna T. 2004. A comparative analysis of diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 109, 1687-1693.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. & Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press. Boca Raton, USA.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18 (22), 6531-6535.

Quadros e figuras

Quadro 1. Origem geográfica dos 22 indivíduos de *Thymus caespititius* em estudo, recolhidos nas ilhas de S. Miguel, Faial e Madeira

Ilha	Local de colheita	Altitude	Siglas de indivíduos
São Miguel	Serra da Devassa	700m	SD1 e SD2
		740m	SD3 e SD4
	Cumeeiras	440m	CU1 e CU2
	Monte Escuro	750m	ME1 e ME2
		600m	SAP1 e SAP2
	Serra da Água de Pau	640m	SAP3
		770m	SAP4
	Miradouro Lagoa Fogo	660m	MLF1, MLF2 e MLF3
Faial	Pico da Barrosa	900m	PB1
Faial	Cabeço dos Trinta	700m	CT1 e CT2
	Parque Capelo	340m	PCa1 e PCa2
Madeira	Bica da Cana	1600m	BC1
	Pico Ruivo	1800m	PR1

Quadro 2. Valores percentuais mínimos e máximos dos componentes maioritários ($\geq 5\%$ em pelo menos uma das amostras) dos óleos essenciais isolados da parte vegetativa dos 22 indivíduos de *T. caespititius* colhidos em fase floral nas ilhas de São Miguel, Faial e Madeira.

Componentes	I. R.	S. Miguel		Faial		Madeira	
		min	máx	min	máx	min	máx
Sabineno	958	0.1	0.2	0.1	0.1	2.5	8.7
β -Mirceno	975	v	0.2	v	v	6.0	10.2
<i>p</i> -Cymeno	1003	3.9	7.2	4.6	6.6	2.9	4.1
γ -Terpineno	1035	2.0	4.6	1.3	3.4	4.5	5.4
α -Terpineol	1159	v	1.9	0.6	12.5	21.7	33.3
Carvacrol	1286	44.4	68.3	46.6	64.8	0.3	0.3
Acetato de carvacrilo	1348	5.4	23.1	2.1	5.0		
Componentes agrupados							
Hidrocarbonetos monoterpénicos		10.6	16.8	11.1	16.2	27.9	39.6
Monoterpenos oxigenados		65.2	77.9	63.7	69.7	31.6	44.5
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos		0.3	4.9	3.1	5.7	5.9	6.3
Sesquiterpenos oxigenados		1.4	5.9	5.0	7.9	7.4	9.0

v - vestigial (<0,05%); I.R. – índice de retenção relativo a uma série de *n*-alcanos (C₈-C₂₂) numa coluna DB-1

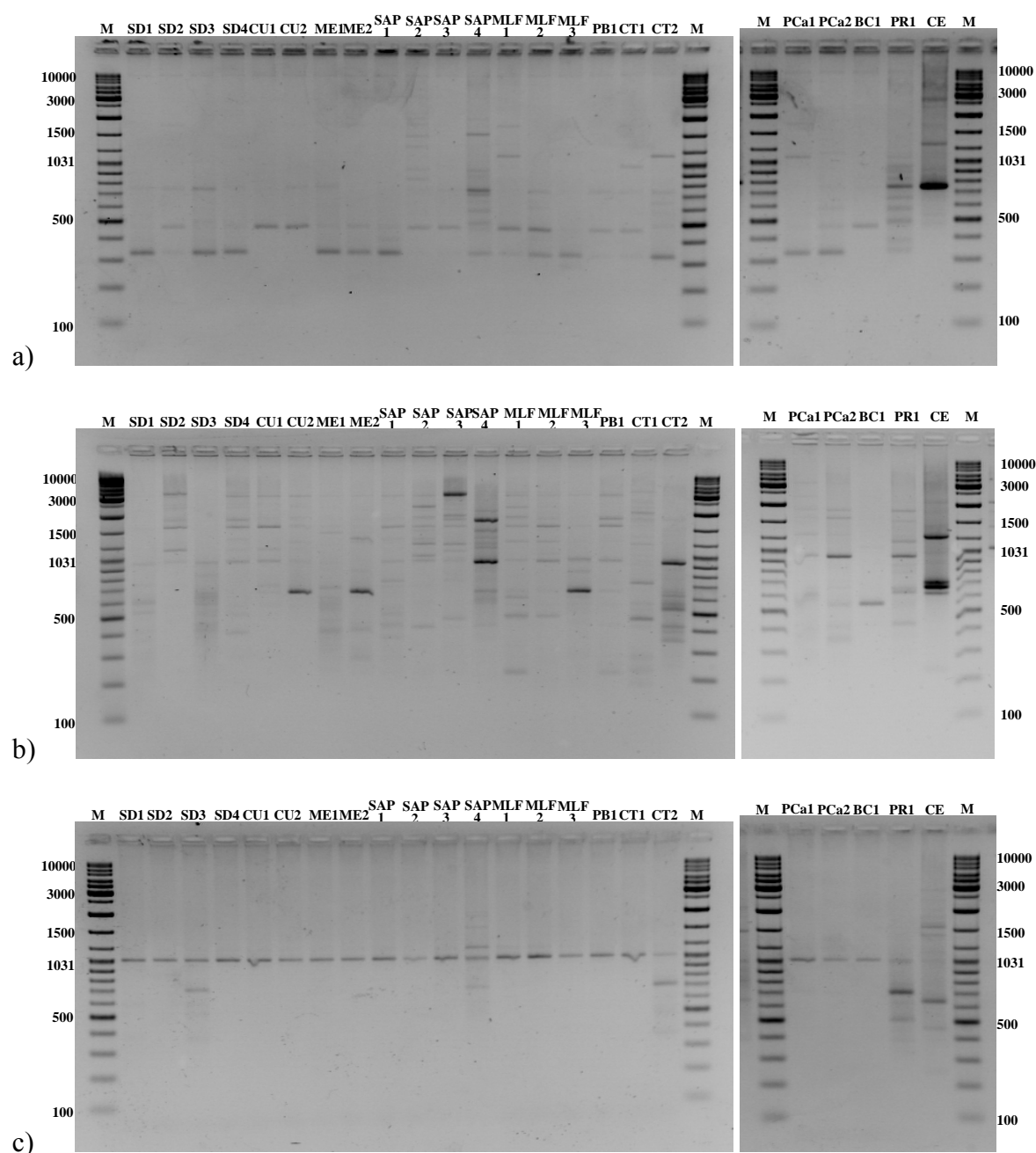


Figura 1. Géis com produtos de amplificação do DNA dos diferentes indivíduos de *T. caespititius* e controlo externo, por primers de RAPD; a) A05, b) A10, c) D05.

Quadro 3. Sequência de primers de RAPDs e número de bandas polimórficas obtidas em cada reacção de amplificação em *T. caespititius*

Primer	Sequência	N.º Bandas total	N.º Bandas Polimórficas sem CE	N.º Bandas Polimórficas com CE
A01	CAGGCCCTTC	13	9	9
A02	TGCCGAGCTG	16	14	16
A03	AGTCAGCCAC	16	16	16
A05	AGGGGTCTTG	18	16	18
A09	GGGTAACGCC	11	8	9
A10	GTGATCGCAG	32	32	32
A11	CAATCGCCGT	13	9	12
A13	CAGCACCCAC	18	13	17
A15	TTCCGAACCC	19	15	19
A16	AGCCAGCGAA	14	11	14
A18	AGGTGACCGT	13	8	13
A20	GTTGCGATCC	13	12	13
B01	GTTTCGCTCC	30	28	30
B05	TGCGCCCTTC	14	11	14
B07	GGTGACGCAG	20	17	20
B10	CTGCTGGGAC	29	27	29
B12	CCTTGACGCA	19	16	18
D03	GTCGCCGTCA	42	41	42
D05	TGAGCGGACA	8	5	8
E02	GGTGCGGGAA	11	7	11
E18	GGA CTGCAGA	26	25	26
E20	AACGGTGACC	32	27	32
Total Bandas		427	367	418

CE – controlo externo, *Thymus carnosus*