

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**Caracterização química e molecular
de espécies das famílias Lamiaceae e
Apiaceae da flora aromática de
Portugal**

Marta Daniela de Sá Mendes

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2007

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal**



**Caracterização química e molecular
de espécies das famílias Lamiaceae e
Apiaceae da flora aromática de
Portugal**

Marta Daniela de Sá Mendes

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2007

Tese orientada por:

Professora Doutora Maria Helena Machado Trindade

O povo julga bem as coisas, porque está na ignorância natural, que é o verdadeiro lugar do homem. A ciência tem duas extremidades que se tocam. A primeira é a pura ignorância natural, na qual se encontram todos os homens ao nascer. A outra extremidade é aquela a que chegam as grandes almas que, tendo percorrido tudo quanto os homens podem saber, acham que nada sabem e voltam a encontrar-se nessa mesma ignorância da qual tinham partido; mas é uma ignorância sábia que se conhece. Os do meio, que saíram dessa ignorância natural e não puderam chegar à outra, têm umas pinceladas dessa ciência suficiente, e armam-se em entendidos. Esses perturbam o mundo e julgam mal de tudo. O povo e os verdadeiramente sábios compõem a ordem do mundo; estes desprezam-na e são desprezados.

Blaise Pascal (1623 - 1662)

Agradecimentos

Aos meus pais por todo o esforço que fizeram para me manter a estudar ao longo destes anos todos, por todo o apoio dado nas alturas mais complicadas e por terem acreditado que eu era capaz de conseguir concluir mais uma etapa do meu longo caminho.

Às minhas irmãs por todo o apoio dado incondicionalmente.

À Dona Júlia Gonçalves e Xisto Gonçalves e Graça Gonçalves por me terem recebido em sua casa e por todo o apoio dado ao longo deste ano.

Aos Professores Doutores Ana Cristina Figueiredo, Maria Helena Machado Trindade e Luís Gaspar Pedro pela orientação deste trabalho, pelas condições materiais colocadas à disposição, por todo o apoio e interesse durante este ano, pela ajuda preciosa durante a elaboração desta tese e revisão da mesma.

Ao Jorge Faria e à Inês Nunes pelo apoio incondicional, boa disposição demonstrada todos os dias, por me aturarem ao longo deste tempo todo e por todos os bons momentos passados no laboratório.

À Rafaela e aos seus pais, Ana Maria e António por todo o apoio dado, pela sua disponibilidade e amizade incondicional.

À Sofia Borges pela ajuda na realização dos PCRs e géis, pela sua amizade e apoio.

À Monya, ao João e à Fragki Styliani por terem destilado grande parte do material vegetal e pela análise dos óleos essenciais.

Aos Professores Doutores Margarida Mendes e Fernando Rosado pela sua disponibilidade e ajuda na análise de *clusters*.

À Professora Doutora Maria Fernanda Oliveira pela sua disponibilidade e ajuda com o software SPSS.

À Sara e à Margarida pelo apoio, amizade, por todas as brincadeiras e boa disposição demonstrada em todos os almoços de fim-de-semana.

À Ana e à Marta, pela boa disposição, pelos bons momentos de convívio e por ajudarem a desanuviar.

A todos aqueles que mesmo não se encontrando aqui mencionados, contribuíram para a realização deste trabalho.

Abreviaturas

°C – Graus Celsius

°C.min⁻¹ – Graus Celsius por minuto

Acetil-CoA - Acetil co-enzima A

AFLP – *Amplified Fragments Length Polimorphisms*

BSA – Bovine Serum Albumin

cDNA – DNA complementar

CGL – Cromatografia gás-líquido

CGL-EM – Cromatografia gás-líquido acoplada com espectrometria de massa

cm - Centímetro

cm.s⁻¹ – centímetros por segundo

CoA - co-enzima A

CTAB – *Cetrimonium bromide*

d.i. - Diâmetro interno

DB1 – Coluna capilar de cromatografia gás-líquido, com fase imobilizada de metilsilicone

DB-17HT – Coluna capilar de cromatografia gás-líquido, com fase imobilizada de fenilmetilsilicone

DIC – Detector de ionização de chama

DMAPP - Dimetilalil pirofosfato

dNTPs – Desoxinucleótidos trifosfatados; engloba dATP, dCTP, dGTP, dTTP

EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*

EST – *Expressed sequence tag*

eV - electrão-volt

FPP - Farnesil pirofosfato

g - grama

g - unidade de medida da força centrífuga relativa

GGPP - Geranilgeranil pirofosfato

GPP - Geranil pirofosfato

h - hora

IPP - Isopentenil pirofosfato

IR - Índice de retenção

ISSRs – *Inter-Simple Sequence Repeat*

kp – kilo pares de bases

m - metro

M – Molar

MEP - Metileritritol fosfato

min - minuto

ml - mililitro

ml.min⁻¹ - Mililitro por minuto
mm - milímetro
mM - milimolar
n.d. – não detectado
N.º – número
nm – nanómetro
PAL - Fenilalanina amónia liase
pb – pares de bases
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PVP – *poly(vinyl pyrrolidone)*
r – Coeficiente de Pearson
RAPDs – *Random Amplified Polymorphic DNA*
RFLPs – *Restriction Fragment Length Polymorphisms*
SSRs – *Simple Sequence Repeat*
TAE – Tris-acetato-EDTA
TAL – Tirosina amónia liase
TE – Tris-EDTA
Tris-HCl – *Tris Hydrochloride*
u - unidade de massa atómica
U – Unidades de enzima
UPGMA – Agrupamento segundo a média
UV - Radiação ultravioleta
v – vestigial
V – Volts
VNTRs – *Variable Number of Tandem Repeats*
vol – volume
µg.ml⁻¹ – micrograma por mililitro
µl - microlitro
µm - micrómetro

Índice

Resumo	- 1 -
Abstract.....	- 2 -
1. Introdução.....	- 3 -
1.1. Lamiaceae	- 3 -
1.1.1. <i>Thymus caespititius</i> Brot.....	- 3 -
1.2. Apiaceae	- 5 -
1.2.1. <i>Crithmum maritimum</i> L.....	- 5 -
1.2.2. <i>Ammi huntii</i> Wats.	- 6 -
1.2.3. <i>Melanoselinum decipiens</i> Hoffm.	- 7 -
1.2.4. <i>Angelica lignescens</i> Reduron & Danton	- 8 -
1.2.5. <i>Chaerophyllum azoricum</i> Trel.	- 9 -
1.3. Metabolismo Secundário	- 10 -
1.3.1. Óleos essenciais.....	- 13 -
1.3.2. Utilização dos óleos essenciais na quimiotaxonomia	- 14 -
1.4. Marcadores Genéticos.....	- 15 -
1.4.1. Marcadores moleculares.....	- 15 -
1.4.2. Utilização dos marcadores moleculares nas plantas aromáticas	- 17 -
1.5. Objectivos	- 18 -
2. Material e Métodos	- 20 -
2.1. Material Vegetal.....	- 20 -
2.2. Extracção dos voláteis.....	- 20 -
2.3. Cromatografia Gás-Líquido	- 20 -
2.4. Cromatografia Gás-Líquido – Espectrometria de massa.....	- 21 -
2.5. Extracção de DNA	- 21 -
2.6. Amplificação por RAPDs	- 22 -
2.7. Análise estatística.....	- 23 -
3. Resultados.....	- 24 -
3.1. <i>Thymus caespititius</i>	- 24 -
3.2. <i>Crithmum maritimum</i>	- 27 -
3.3. <i>Ammi huntii</i>	- 31 -
3.4. <i>Angelica lignescens</i> e <i>Melanoselinum decipiens</i>	- 35 -
3.5. <i>Chaerophyllum azoricum</i>	- 39 -
4. Discussão	- 42 -
4.1. Análise dos óleos essenciais.....	- 42 -

4.2. Análise molecular	- 44 -
5. Conclusão.....	- 46 -
6. Perspectivas futuras	- 47 -
7. Bibliografia	- 48 -
Anexos.....	- 54 -
Anexo A – Origem geográfica das espécies.....	- 54 -
Anexo B – Primers utilizados.....	- 56 -
Anexo C – Polimorfismos detectados pelos RAPDs	- 57 -

Resumo

Nos últimos anos, a análise química e os marcadores moleculares têm sido utilizados na identificação de cultivares e na análise de relações genéticas entre indivíduos e espécies, contribuindo, também, para estudos evolutivos e ecológicos.

Com este trabalho pretendeu-se aprofundar o estudo de algumas plantas aromáticas da flora de Portugal, como *Thymus caespitius*, *Crithmum maritimum*, *Ammi huntii*, *Angelica lignescens*, *Melanoselinum decipiens* e *Chaerophyllum azoricum*, realizando uma abordagem conjunta da composição química e da análise de marcadores moleculares. A análise química dos óleos essenciais de *T. caespitius*, *C. maritimum* e *C. azoricum* permitiu corroborar dados anteriores existentes na bibliografia. Apesar de algumas variações quantitativas observadas na composição química dos óleos essenciais em plantas com localizações geográficas distintas, estas não foram relevantes na separação dos diferentes indivíduos em função do local de colheita.

Nos óleos essenciais de *A. huntii* os componentes maioritários detectados foram o dilapiolo, nos óleos isolados dos indivíduos de São Miguel e a *trans*-isomiristicina nos óleos isolados dos indivíduos de São Jorge e Flores. Nestas amostras foi detectado um elevado polimorfismo químico, levando a considerar a existência de dois quimiotipos, dilapiolo/terpinoleno/*trans*- α -bergamoteno e *trans*-isomiristicina/limoneno/ β -mirceno.

As análises químicas e moleculares permitiram a distinção entre indivíduos de *A. lignescens* dos indivíduos de *M. decipiens*, relevando uma boa separação a nível inter-específico, corroborando a existência de duas espécies distintas, uma endémica das ilhas dos Açores (*A. lignescens*) e outra endémica da ilha da Madeira (*M. decipiens*).

Através da análise molecular observou-se um elevado número de polimorfismos genéticos entre os diferentes indivíduos das diferentes espécies em estudo, superior a 75%, permitindo a distinção dos vários indivíduos e a determinação das relações genéticas entre estes.

Com este trabalho foi possível detectar uma correlação moderada entre a análise química e a análise molecular, em todas as espécies estudadas excepto no *C. maritimum*. Este valor de correlação sugere que a composição química dos óleos essenciais pode ser controlada por um elevado número de genes distribuídos pelo genoma das plantas.

Palavras-chave: Lamiaceae, Apiaceae, RAPDs, Óleos essenciais, Quimiotaxonomia, Similaridade genética.

Abstract

In the past years chemical analyses and molecular markers have been used widely in the identification of cultivars and in the chemical and genetic relationship analyses of individuals and species contributing vastly for the evolutionary and ecological studies.

This study aimed at a deeper research of some aromatic plants of the Portuguese flora, these included *Thymus caespitius*, *Crithmum maritimum*, *Ammi huntii*, *Angelica lignescens*, *Melanoselinum decipiens* and *Chaerophyllum azoricum*, carrying out a joint approach of the chemical composition of essential oils and the analysis of molecular markers. Chemical analyses of the essential oils of *T. caespitius*, *C. maritimum* and *C. azoricum* reinforced the results found in the literature. Although some plants, with distinctive geographic location, present quantitative variations in the chemical composition of the essential oils, these are not relevant for the separation of the individuals by place of harvest.

In the essential oils of *A. huntii* the main components identified were dillapiol in the oils isolated from individuals harvested on São Miguel and *trans*-isomiristicin in the oils isolated from individuals harvested on São Jorge and Flores. In these samples a high chemical polymorphism was detected, allowing to consider the existence of two chemotypes, dillapiol/terpinolene/*trans*- α -bergamotene and *trans*-isomiristicin/limonene/ β -mircene.

Chemical and molecular analyses allowed the distinction between individuals of *A. lignescens* from individuals of *M. decipiens*, revealing a separation in an inter-specific level corroborating the existence of two distinctive species, one endemic from Azores and the other endemic from Madeira.

Molecular analyses of these species showed a high number of genetic polymorphisms (above 75%) amongst the several individuals of different species, allowing the distinction of the various individuals and the determination of the genetic relationships between them.

Through this research a moderate correlation between the chemical and molecular analysis was found in all species except in *C. maritimum*. This value of correlation suggests that the chemical composition of essential oils can be controlled by a large number of genes distributed through the genome of the plants.

Keywords: Lamiaceae, Apiaceae, RAPDs, essential oils, Chemotaxonomy, genetic similarity.

1. Introdução

As plantas produzem uma grande diversidade de metabolitos secundários. Estes compostos exercem uma função na sobrevivência das plantas no ecossistema. Os metabolitos secundários estão envolvidos na resistência a pestes e doenças, na atracção de polinizadores, na interacção com microorganismos simbioses, entre outros. A capacidade de sintetizar os compostos secundários tem vindo a ser seleccionada ao longo dos processos evolutivos das diferentes plantas, dependendo das necessidades específicas de cada uma. As soluções químicas para um problema comum são geralmente diferentes nas diferentes linhagens de plantas.

Ao longo dos anos, o interesse económico nos metabolitos secundários tem aumentado, tendo-se verificado desenvolvimentos na engenharia genética para produção destes compostos. Contudo, os progressos nesta área são limitados, pois há ainda um desconhecimento das vias biossintéticas dos metabolitos secundários e o número de genes conhecidos que codificam as enzimas envolvidas nestas vias é muito limitado.

1.1. Lamiaceae

Thymus caespititius Brot. pertence à família Lamiaceae (Labiatae). Esta família é composta por, aproximadamente, 258 géneros e 6970 espécies (Judd *et al* 2002).

As Lamiaceae são uma família com uma ampla distribuição, são cosmopolitas, mas são mais frequentes nas regiões mediterrâneas, no Médio Oriente e nas montanhas tropicais (Judd *et al* 2002).

Esta família é composta por ervas, arbustos e árvores. Todas estas diferentes plantas pertencem à mesma família pois apresentam caules jovens quadrangulares, grande número de tricomas glandulares ricos em terpenos e flores bilabiadas com 5 pétalas (Judd *et al* 2002).

Na família Lamiaceae existem algumas espécies aromáticas com algum interesse económico, sendo utilizadas para a extracção dos óleos essenciais (*Mentha*, *Lavandula*, *Ocimum*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Satureja*, *Thymus*) que são utilizados depois ao nível aromático e medicinal, em cosméticos e como condimento, entre outros (Judd *et al* 2002).

1.1.1. *Thymus caespititius* Brot.



Fig. 1.1. *Thymus caespititius*. (Pico) (Pereira *et al* 2000).

Thymus caespititius Brot. (fig. 1.1) é vulgarmente designado por erva-úrsula, alecrim-da-serra ou tormentelo (Schäfer 2005). Esta espécie é nativa da Macaronésia e noroeste da Península Ibérica, sendo a única espécie representativa do seu género no Arquipélago dos Açores (Pereira *et al* 2000).

Desenvolve-se nas correntes de lava ásperas, principalmente nas partes mais secas e salientes entre as fendas (Sjögren 2001). É uma das poucas plantas da flora açoriana com uma amplitude altimétrica que vai desde a costa até às mais elevadas altitudes

T. caespititius é um pequeno arbusto com 2-7cm de altura e 30-60cm de comprimento, de caules

lenhosos e floríferos, com pequenas inflorescências dispostas densamente e de coloração branca ou rosada (Press 1994).

O género *Thymus* é um grupo taxonómico complexo de plantas aromáticas utilizadas em diferentes locais do mundo com vários fins. Os tomilhos são utilizados devido às suas propriedades aromáticas, condimentares e medicinais. A sua utilização medicinal deve-se às suas actividades antiséptica, anti-espasmódica, expectorante, antioxidantes, entre outras. Estas actividades devem-se essencialmente aos óleos essenciais ricos em fenóis (Salgueiro 2006).

Ao longo dos anos têm sido realizados vários estudos quanto à composição química dos óleos essenciais de *Thymus caespititius* colhidos em Portugal (tabela 1.1). Estes estudos mostraram a existência de polimorfismos químicos, revelando, segundo Salgueiro (2006), a existência dos quimiotipos carvacrol, timol, α -terpineol, sabineno, carvacrol/ α -terpineol, α -terpineol/T-cadinol e carvacrol/timol.

A constituição genética e as condições ambientais influenciam o rendimento e a composição do óleo essencial produzido pelas plantas de tomilho. O controlo genético das características químicas das plantas de tomilho tem vindo a ser conhecido e a acumulação de monoterpenos pelas plantas é controlada por uma série de *loci* com relações epistáticas entre si (Echeverrigaray *et al* 2001).

Tabela 1.1. Componentes maioritários existentes nos óleos essenciais de *Thymus caespititius*, obtidos a partir de diferentes estudos.

Local de colheita	Componentes maioritários (%)	Material vegetal	Referência
Trás-os-Montes, Minho, Beira Alta, Beira Litoral	<i>p</i> -Cimeno (6-9); α -Terpineol (31-41); T-Cadinol (6-9)	Partes aéreas	Salgueiro <i>et al</i> 1997
Pico (Açores)	Timol (16); Carvacrol (36); Acetato de carvacrilo (8)		
São Jorge (Açores)	Sabineno (0-41); α -Terpineol (v-68); Timol (1-58); Carvacrol (1-52)	Partes aéreas	Pereira <i>et al</i> 2000
Pico, Faial, Graciosa (Açores)	<i>p</i> -Cimeno (3-10); γ -Terpineno (2-8); α -Terpineol (0-37); Timol (0-12); Carvacrol (3-57); Acetato de carvacrilo (0-17); T-Cadinol (2-11)	Partes aéreas	Pereira <i>et al</i> 2003
Trás-os-Montes	<i>p</i> -Cimeno (9); α -Terpineol (32)	Partes aéreas	Miguel <i>et al</i> 2004
Corvo, Flores, São Miguel (Açores)	<i>p</i> -Cimeno (4-19); Carvacrol (41-65); Acetato de carvacrilo (2-24); T-Cadinol (n.d.-15)	Partes aéreas	Santos <i>et al</i> 2005
Terceira (Açores)	<i>p</i> -Cimeno (10-14); Timol (35-51); Acetato de timilo (10-19)		
Madeira	Sabineno (8-16); β -Mirceno (7-10); α -Terpineol (33-37)		

v-vestigial (<0,05%); n.d.- não detectado

As populações naturais de tomilhos são normalmente heterogéneas, compostas por plantas de diferentes quimiotipos. No entanto, não foram observadas correlações entre as características morfológicas e anatómicas das plantas e a sua composição química. Contudo, foram detectadas correlações entre o polimorfismo químico, o polimorfismo sexual e o ambiente (Echeverrigaray *et al* 2001).

1.2. Apiaceae

As Apiaceae (Umbelliferae) são uma família grande, composta por 3000 espécies distribuídas por 300 géneros (Moreno-Dorado *et al* 2000).

Crithmum maritimum, *Ammi huntii* (ambos da tribo Apiae), *Melanoselinum decipiens* (tribo Laserpitieae), *Angelica lignescens* (tribo Angelicaceae) e *Chaerophyllum azoricum* (tribo Scandiacae) pertencem à família Apiaceae e à sub-família Apioideae (Pimenov e Leonov 1993).

As plantas da família Apiaceae apresentam, geralmente, caules ocos nas zonas internodais, com canais secretores contendo óleos essenciais e inflorescências em forma de umbela (Judd *et al* 2002).

A sua distribuição é muito alargada, sendo possível encontrar plantas desta família desde regiões tropicais a regiões temperadas (Judd *et al* 2002).

Muitas das espécies são conhecidas pelos seus constituintes aromáticos. As plantas desta família produzem um elevado número de metabolitos secundários, como os fenilpropanóides, monoterpenos e sesquiterpenos, sendo encontrados ao nível dos óleos essenciais das plantas, juntamente com cumarinas e flavonóides (Moreno-Dorado *et al* 2000).

As Apiaceae têm vindo a ser utilizadas pelo Homem desde as civilizações ancestrais, para alimentação, aromatização, como medicamentos e até como venenos, como é o caso da cicuta (Judd *et al* 2002).

Das espécies com maior interesse agrícola salienta-se *Daucus carota* (cenoura) e *Apium graveolens* (aipo) e um grupo importante de ervas com interesse culinário e medicinal, como *Petroselinum crispum* (salsa), *Angelica officinalis* (angélica), *Anethum graveolens* (aneto, endro ou funcho bastardo), *Pimpinella anisum* (anis) e *Levisticum officinale* (levístico), entre outros (Judd *et al* 2002).

1.2.1. *Crithmum maritimum* L.



Fig. 1.2. *Crithmum maritimum*.

Crithmum maritimum L. (fig. 1.2) é vulgarmente designado por funcho-marítimo ou perrexil-do-mar. É um arbusto lenhoso baixo, com 20-40cm de altura, de folhas carnudas e flores em umbelas de cor amarela (Franco 1971, Schäfer 2005).

Esta espécie desenvolve-se em rochas existentes nas zonas junto à costa, em habitats fortemente expostos à brisa marítima salgada (Sjögren 2001).

C. maritimum não é uma espécie endémica de Portugal, sendo possível encontrá-la na costa Atlântica Europeia, Açores, Madeira, Canárias, na costa do mar Mediterrânico e do mar Negro, noroeste de África e oeste da Ásia (Pateira *et al* 1999).

C. maritimum é utilizado na culinária e as suas folhas têm sido utilizadas com fins aromáticos e medicinais como tónico e diurético (Pateira *et al* 1999). O seu óleo essencial é também utilizado na indústria cosmética devido às suas propriedades adelgaçantes (Senatore *et al* 2000). Durante a época dos Descobrimentos esta espécie foi muito utilizada pelos marinheiros devido à sua propriedade anti-escorbútica (Cunsolo *et al* 1993).

Têm sido realizados alguns estudos quanto à composição química do óleo essencial de *C. maritimum* (tabela 1.2). Segundo estes estudos, os compostos característicos dos óleos

essenciais de *C. maritimum* são o α -pineno, o γ -terpineno, o dilapiolo, o metiltimol, o sabineno, o limoneno e o (z)- β -ocimeno.

Tabela 1.2. Componentes maioritários existentes nos óleos essenciais de *Crithmum maritimum*, obtidos a partir de diferentes estudos.

Local de colheita	Componentes maioritários (%)	Material vegetal	Referência
Catania (Sicília)	Limoneno (22); γ -Terpineno (23); Metiltimol (26)	Partes aéreas	Ruberto <i>et al</i> 1991
Costa da Caparica (Portugal)	Sabineno (35); γ -Terpineno (30); Metiltimol (19)	Partes aéreas	Barroso <i>et al</i> 1991
	Sabineno (7-43); γ -Terpineno (26-55); Metiltimol (12-19)	Caules e folhas	Barroso <i>et al</i> 1992
Liguria (Itália)	Sabineno (1-30); γ -Terpineno (41-68); Metiltimol (12-18); 1,8-Cineole (n.d.-16)	Frutos, caules e folhas	Flamini <i>et al</i> 1999
Boca do Inferno, Almogrove, Praia da Ilha do Pessegueiro (Portugal)	Sabineno (9-34); γ -Terpineno (20-43); Metiltimol (12-18)	Inflorescências, folhas e caules	Pateira <i>et al</i> 1999
Viana do Castelo, São Martinho do Porto (Portugal)	Sabineno (7-32); γ -Terpineno (17-44); Metiltimol (10-19); Dilapiolo (n.d.-47)		
Bolu (Turquia)	Sabineno (27); γ -Terpineno (19); Limoneno (24); Terpineno-4-ol (9)	Partes aéreas	Başer <i>et al</i> 2000
Antalya (Turquia)	<i>p</i> -Cimeno (13); β -Felandreno (30); (z)- β -Ocimeno (14); Metiltimol (25)	Partes aéreas	Senatore <i>et al</i> 2000
Mersin (Turquia)	Sabineno (12); β -Felandreno (14); γ -Terpineno (24); Dilapiolo (21)		
Catania (Sicília)	Limoneno (22); γ -Terpineno (23); Metiltimol (26)	Partes aéreas	Ruberto <i>et al</i> 2000
Silifke, Bodrum, Gazipaşa (Turquia)	Sabineno (0,1-21); γ -Terpineno (8-35); <i>p</i> -Cimeno (4-27); Metiltimol (8-30); Terpineno-4-ol (0,4-21)	Caules e folhas	Özcan <i>et al</i> 2001
Ilha de Amorgós (Grécia)	Sabineno (1-33); <i>p</i> -Cimeno (1-16); γ -Terpineno (7-29); Terpineno-4-ol (4-16); Dilapiolo (0-49); Metiltimol (4-41)	Partes aéreas	Katsouri <i>et al</i> 2001
Faial, Graciosa, São Jorge e Pico (Portugal)	<i>p</i> -Cimeno (6-10); γ -Terpineno (81-86)	Partes aéreas	Santos <i>et al</i> 2002

n.d. – não detectado.

1.2.2. *Ammi huntii* Wats.



Fig. 1.3. *Ammi huntii*.

Ammi huntii Wats. (fig. 1.3) foi descrito pela primeira vez por H.C. Watson em 1847. *A. huntii* é uma herbácea que pode atingir 1m de altura, com folhas basais pinatissectadas e flores brancas ou amareladas (Franco 1971).

Esta espécie é endémica das ilhas dos Açores, encontrando-se em locais frescos entre os 400 e os 700m de altitude em todas as ilhas do arquipélago, excepto nas ilhas Graciosa, Faial, Terceira e Santa Maria (Franco 1971, Schäfer 2005). No entanto foi referido recentemente que esta espécie apenas existe na ilha de São Miguel (Bueno *et al* 2006).

Entre 1842 e 1847 Watson descreveu três espécies do género *Ammi* L. originárias das ilhas dos Açores, *Ammi trifoliatum* que se desenvolvia na ilha das Flores, *Ammi seubertianum* do Pico e

São Miguel e *Ammi huntii* de São Miguel (Bueno *et al* 2006). Estes três *taxa* partilham entre si várias características morfológicas, logo a sua posição taxonómica foi matéria de discussão de alguns autores europeus, na segunda metade do século XX. Segundo Franco (1971) e Dias (1996) as três espécies são apenas uma, tendo sido designada erradamente de *A. huntii* pelo primeiro autor, enquanto o segundo designou as plantas de *A. trifoliatum* (Bueno *et al* 2006). Contrariamente, Pinto da Silva e colaboradores (1974) consideraram as espécies como independentes. Outros autores, como Tutin (1968) consideraram apenas duas espécies, *A. huntii* (sendo *A. seubertianum* agrupado a esta espécie) e *A. trifoliatum* (Bueno *et al* 2006). Schäfer (2005) considerou também apenas duas espécies, *A. seubertianum* e *A. trifoliatum* (sendo *A. huntii* agrupado a esta espécie).

A. trifoliatum é a única espécie endémica dos Açores do género *Ammi* L. que está incluída no anexo II da directiva de habitat 92/43/CEE e no anexo I da convenção de Berna, sendo consideradas as outras espécies como sinónimos ou *taxa* duvidosos (Bueno *et al* 2006).

O género *Ammi* tem sido muito investigado devido à sua actividade farmacológica. *Ammi majus* tem sido utilizado ao longo dos séculos no Médio Oriente como uma fonte de agentes activos utilizados no tratamento de leucodermias, como o vitiligo e a psoríase. Já *Ammi visnaga* é utilizado no tratamento da angina de peito, bronquite asmática e como diurético (Antunes *et al* 1997).

A composição química do óleo essencial de *A. huntii* permanece ainda desconhecida, mas a composição química dos extractos desta planta tem vindo a ser identificada. Antunes e colaboradores (1997) identificaram nos extractos das partes aéreas de *A. huntii* isomiristicina e duas cumarinas, o bergapteno e a *O*-prenilumbeliferona. Noutro estudo, com extractos de partes aéreas de *A. huntii*, os mesmos investigadores isolaram e identificaram um novo metabolito, um fenilpropanóide que designaram de isonotoapiol, juntamente com o isoapiol (Antunes *et al* 1997).

Estudos realizados em frutos maduros de *A. visnaga* demonstraram que o óleo essencial desta espécie tinha como componentes maioritários o hidróxi-butil-tolueno (19%), o α -bisabolol (21%) e o nerol (30%) (Günaydin e Beyazit 2004).

1.2.3. *Melanoselinum decipiens* Hoffm.



Fig. 1.4. *Melanoselinum decipiens*.

Melanoselinum decipiens Hoffm. (fig. 1.4) é vulgarmente designado por aipo do gado ou aipo da serra (Cannon 1994). Esta espécie é endémica da ilha da Madeira, localizando-se a baixas altitudes (0-800m) em rochas de ravinas que se encontram à sombra, na zona norte da ilha (Press e Dias 1998).

M. decipiens é um arbusto alto, que pode atingir os 3m, robusto, muito ramificado e com inflorescências rosadas (Cannon 1994).

Esta planta é muito utilizada como forragem para os animais e como ornamental (Cannon 1994, Press e Dias 1998).

Ao longo dos anos têm-se realizado diferentes estudos com *M. decipiens*. A extracção por solvente (etanol) de partes aéreas de *M. decipiens* permitiu a identificação de diferentes lactonas sesquiterpénicas com estrutura estereoquímica diferente das suas análogas existentes na família

Apiaceae (Massanet *et al* 1995, Massanet *et al* 1997). Foechterlen (1996) obteve extractos de diferentes partes das plantas por extracção por solvente (maceração do material vegetal durante 24h com uma mistura 1:1 de essência G e etanol) e em todos os extractos observou que o β -pineno era o composto maioritário, excepto nas sementes em que o composto dominante era o germacreno-D. Através da análise dos óleos essenciais, obtidos a partir de partes aéreas das plantas recolhidas na ilha da Madeira, observou-se que o composto dominante nos óleos era o β -pineno (72%) e que a fracção maioritária no óleo era de hidrocarbonetos monoterpénicos (Silva *et al* 1998). Estudos posteriores revelaram que o óleo essencial obtido a partir de folhas de *M. decipiens* tinha como componentes maioritários o β -pineno (53%) e o β -mirceno (10%) (Pino *et al* 2001). A análise do óleo essencial de uma planta de *M. decipiens* existente em Hamburgo, revelou que o componente maioritário do óleo era o β -pineno (55%). Através desta análise, foi possível ainda isolar um novo hidrocarboneto monoterpénico, o melaneno (Tesso 2005).

1.2.4. *Angelica lignescens* Reduron & Danton



Fig. 1.5. *Angelica lignescens*. *Angelica lignescens* (fig.1.5) é vulgarmente designada por salsa preta ou angélica. É uma planta endémica das ilhas dos Açores, encontrando-se principalmente nas ilhas de São Miguel, Terceira, Faial, Fores e Pico (Press e Dias 1998, Schäfer 2005). *A. lignescens* é uma planta herbácea alta, podendo atingir os 2,5m, com inflorescências até 50cm de largura e as flores das umbelas são, geralmente, branco-amareladas (Sjögren 2001). Esta espécie é, normalmente, encontrada em pequenas ravinas e em locais húmidos e abrigados entre os 500-900m de altitude (Press e Dias 1998, Schäfer 2005). São poucos os locais onde podem ser encontradas populações de *A. lignescens* e estas são compostas por poucos indivíduos (Sjögren 2001). É uma das espécies mais raras da flora açoriana estando ameaçada de extinção, devido ao abate de árvores (Sjögren 2001).

Durante algum tempo esta planta foi classificada com *M. decipiens*, uma planta endémica da Madeira, devido a algumas semelhanças morfológicas. Contudo, estas plantas são muito diferentes, partilhando mais características com o género *Angelica* do que com outros géneros (Press e Dias 1998).

A análise química do óleo essencial de *A. lignescens* foi realizada ao mesmo tempo que a análise da composição química do óleo essencial de *M. decipiens* e foram comparadas entre si. O limoneno (82%) revelou ser o componente maioritário no óleo essencial de *A. lignescens*, enquanto que nas plantas de *M. decipiens* o β -pineno (72%) era o componente maioritário do óleo essencial. Este estudo demonstrou uma diferença acentuada entre as duas espécies (Silva *et al* 1998).

Estudos efectuados noutras espécies de *Angelica* revelam uma composição química diferente do óleo essencial de *A. lignescens* (tabela 1.3).

O género *Angelica* é composto por várias espécies. Estas espécies são importantes a nível comercial, pois são utilizadas com diferentes propósitos em todo o mundo. Por exemplo, a maioria das plantas de *Angelica* são utilizadas na medicina tradicional na Ásia oriental (Watanabe *et al*

1998). O óleo essencial das raízes de *A. archangelica* L. (angélica de jardim) é utilizado na cura de várias doenças em muitos países, devido à sua acção anti-espasmódica, carminativa, depurativa, digestiva, diurética, entre outras (Nivinskienė *et al* 2005a). Esta espécie é ainda utilizada como especiaria e na decoração de bolos. *A. keiskei* Koidz é cultivada no Japão para aditivos alimentares (Watanabe *et al* 1998).

Tabela 1.3. Componentes maioritários existentes nos óleos essenciais de diferentes espécies do género *Angelica*.

<i>Angelica</i>	Componentes maioritários (%)	Material vegetal	Referência
<i>A. glauca</i> (Índia)	α -Felandreno (14); β -Pineno (12); <i>trans</i> -Carveol (12)	Parte aérea	Agnihotri <i>et al</i> 2004
<i>A. gigas</i> (Coreia)	Nonano (20); α -Pineno (44)	Rizomas	Kim <i>et al</i> 2006
	α -Pineno (31); 2,4,6-Trimetil heptano (13)	Raízes secas	Seo <i>et al</i> 2007
<i>A. archangelica</i> (Lituânia)	α -Pineno (4-19); δ -3-Careno (3-16); 15-Pentadecanolido (2-15)	Raízes secas	Nivinskienė <i>et al</i> 2003
	β -Felandreno (34-63); α -Pineno (4-13)	Sementes secas	Nivinskienė <i>et al</i> 2005
	α -Pineno (11-20); δ -3-Careno (11-16); β -Felandreno (1-16)	Raízes frescas	Nivinskienė <i>et al</i> 2005a
	β -Felandreno (34-63); α -Pineno (4-16)	Sementes secas	Nivinskienė <i>et al</i> 2007
	α -Pineno (13); β -Mirceno (22); Sabineno (8); Zingibereno (8)	Embriões	

1.2.5. *Chaerophyllum azoricum* Trel.



Fig. 1.6. *Chaerophyllum azoricum*.

O género *Chaerophyllum* é representado por 15 espécies, sendo uma delas endémica das ilhas dos Açores (Pedro *et al* 1999), *Chaerophyllum azoricum* Trel. (fig. 1.6).

C. azoricum é encontrado a mais de 700m de altitude nas ilhas de São Miguel, São Jorge e Flores (Pedro *et al* 1999). Esta planta desenvolve-se apenas em habitats protegidos e húmidos e existe em poucos locais e em pequeno número, estando ameaçada de extinção na flora europeia devido ao aumento da exposição resultante do abate de árvores e arbustos (Sjögren 2001).

Esta espécie é uma herbácea robusta, com os lóbulos das folhas pouco divididos, com serrilhado irregular e as pétalas são brancas ou amareladas (Sjögren 2001).

As diferentes espécies de *Chaerophyllum* são utilizadas como alimento e como aromatizantes, sendo vulgar o consumo dos caules de *C. libanoticum* como alimento na Turquia, enquanto que o *C. macropodum* é utilizado na produção de queijo (Demirci *et al* 2007).

As diferentes espécies de *Chaerophyllum* têm sido utilizadas em estudos fitoquímicos e estas têm revelado a presença de metabolitos secundários, fenilpropanóides, poliacetilenos, para além de lenhanos, entre outros (Demirci *et al* 2007). A composição química dos óleos essenciais de diferentes espécies do género *Chaerophyllum* tem vindo a ser conhecida (tabela 1.4) devido ao

elevado interesse económico destas plantas.

A actividade biológica de algumas espécies de *Chaerophyllum*, como a antimicrobiana, a antioxidante e as propriedades citotóxicas têm vindo a ser investigadas por diferentes grupos (Demirci *et al* 2007).

Tabela 1.4. Componentes maioritários existentes nos óleos essenciais de diferentes espécies de *Chaerophyllum*.

<i>Chaerophyllum</i>	Componentes maioritários (%)	Material vegetal	Referência
<i>C. macrospermum</i>	1,8-Cineole (1-7); Linalol (2-7); δ -3-Careno (4-5); α -Terpineol (2-5); Eugenol (1-9)	Folhas, caules	Kürkçüoğlu <i>et al</i> 2006 Başer <i>et al</i> 2006
	(<i>E</i>)- β -Ocimeno (40)	Partes aéreas	
<i>C. bulbosum</i> ssp. <i>bulbosum</i>	Apiole (37)		Başer <i>et al</i> 2006
<i>C. aksekiense</i>	<i>n</i> -Heptacosano (10)	Frutos	
<i>C. macropodium</i>	<i>p</i> -Cimeno (39)	Frutos	Kürkçüoğlu <i>et al</i> 2006
<i>C. bulbosum</i>	Linalol (18)	Partes aéreas	
<i>C. coloratum</i>	(<i>E</i>)- β -Farneseno (79)	Frutos maduros	
<i>C. byzantinum</i>	Sabineno (30); Terpinoleno (12); <i>p</i> -Cimeno-8-ol (16)	Partes aéreas	
<i>C. libanoticum</i>	Limoneno (16); β -felandreno (18)	Frutos	Demirci <i>et al</i> 2007
<i>C. azoricum</i>	γ -Terpineno (9-31); Terpinoleno (44-62)	Folhas/caules, flores, frutos	Pedro <i>et al</i> 1999

1.3. Metabolismo Secundário

As plantas produzem uma quantidade vasta e diversa de compostos orgânicos, a maioria dos quais não aparentam participar directamente no crescimento e no desenvolvimento das mesmas. Estas substâncias são, tradicionalmente, referidas como metabolitos secundários, sendo também conhecidos por produtos secundários ou produtos naturais (Croteau *et al* 2000). A sua distribuição é restrita a um número reduzido de famílias, um género ou mesmo poucas espécies e a sua concentração varia de planta para planta (Taiz e Zeiger 2002). Pelo contrário, os metabolitos primários como os glúcidos, as proteínas, os aminoácidos, as purinas e pirimidinas dos ácidos nucleicos e as clorofilas são encontrados em todas as plantas e desempenham funções metabólicas essenciais (Croteau *et al* 2000).

Durante muitos anos o significado adaptativo de muitos metabolitos secundários permaneceu desconhecido. Pensava-se que estes compostos eram os produtos finais do metabolismo que não exerciam qualquer função biológica ou desperdícios metabólicos (Taiz e Zeiger 2002). O estudo destas substâncias teve início no final do século XIX, princípio do século XX por químicos orgânicos. O interesse neste tipo de compostos residia na sua importância como fármacos, venenos, fragrâncias e materiais industriais (Taiz e Zeiger 2002).

Recentemente, aos metabolitos secundários têm sido associadas funções ecológicas importantes nas plantas, como protecção contra a herbivoria e contra a infecção por agentes patogénicos, também, na atracção dos polinizadores, animais dispersores de sementes e como agentes de competição planta-planta (Taiz e Zeiger 2002).

Os metabolitos secundários podem ser divididos em três grupos distintos: terpenos, fenóis e alcalóides. Alguns apresentam elevada volatilidade, sendo conhecidos como compostos voláteis ou componentes dos óleos essenciais. Os alcalóides não são encontrados ao nível dos óleos essenciais, mas estes são muito importantes, pois cerca de 12000 alcalóides são encontrados em 20% das plantas e estes compostos exercem papéis ecoquímicos, principalmente, na defesa das plantas (Facchini 2001). A elevada actividade biológica de alguns alcalóides levou à exploração destes compostos como fármacos, estimulantes, narcóticos, e venenos (Facchini 2001).

A fig. 1.7 mostra de uma forma simplificada as vias envolvidas na biossíntese dos metabolitos secundários e a sua interligação com o metabolismo primário (Taiz e Zeiger 2002).

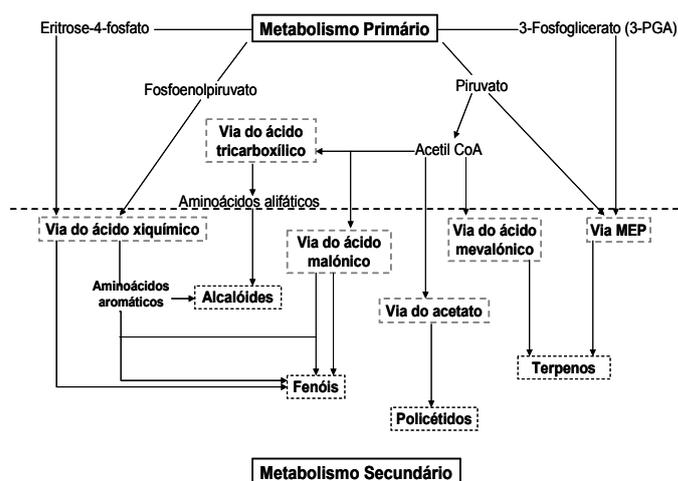


Fig. 1.7. Biossíntese dos metabolitos secundários e a sua relação com o metabolismo primário (adaptado de Taiz e Zeiger 2002).

Terpenos

Os terpenos são provavelmente a classe mais variada estruturalmente de todos os produtos naturais das plantas. O nome deriva da terebintina (“terpentin” em Alemão), o primeiro composto desta classe a ser isolado (Croteau *et al* 2000). Os terpenos são sintetizados a partir do metabolismo primário através de uma das duas vias, a via do ácido mevalónico ou a via do metileritritol fosfato (Taiz e Zeiger 2002). Através destas vias é formada uma molécula de isopentenil pirofosfato, IPP, ou o seu isómero dimetialil pirofosfato (DMAPP).

O IPP é a molécula activa, composta por cinco carbonos e unidade estrutural de todos os terpenos. O IPP e o DMAPP condensam-se originando geranyl pirofosfato (GPP), o precursor em C10 dos monoterpenos. O GPP pode ligar-se a outra molécula de IPP, dando origem a um composto em C15, o farnesil pirofosfato (FPP), precursor dos sesquiterpenos. A adição de uma nova molécula de IPP origina um composto em C20, o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), precursor dos diterpenos. Finalmente, a dimerização do FPP e do GGPP origina triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40), respectivamente (Fig. 1.8) (Taiz e Zeiger 2002).

Alguns terpenos exercem funções ao nível do crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo considerados metabolitos primários em vez de metabolitos secundários (Taiz e Zeiger 2002). Como por exemplo as giberelinas, um grupo importante de fitohormonas, são diterpenos, os esteróides são derivados de triterpenos e são componentes essenciais nas membranas celulares e os carotenóides são tetraterpenos que funcionam como pigmentos acessórios na fotossíntese e protegem os tecidos fotossintéticos da foto-oxidação (Taiz e Zeiger 2002).

Os terpenos são compostos tóxicos e dissuasores para os mamíferos e insectos que se

alimentam das plantas, que aparentam ter um importante papel defensivo. As saponinas são triterpenos glicosilados, cuja toxicidade se deve à capacidade de formar complexos com os esteróides. Deste modo, as saponinas podem interferir com a assimilação dos esteróides no sistema digestivo (Taiz e Zeiger 2002).

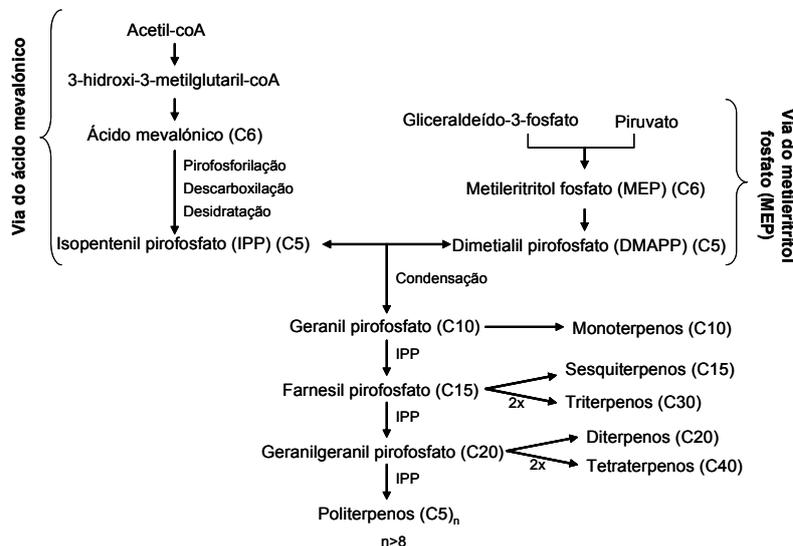


Figura 1.8. Biossíntese dos terpenos. A unidade básica composta por cinco carbonos é sintetizada por duas diferentes vias. O IPP e o DMAPP são combinados originando terpenos em C10, C15, entre outros (adaptado de Taiz e Zeiger 2002).

Fenóis

As plantas produzem uma grande variedade de compostos secundários que contêm um grupo fenólico, um grupo hidroxilo funcional no anel aromático (Taiz e Zeiger 2002). Estas substâncias são classificadas como compostos fenólicos e são um grupo químico heterogêneo de 10.000 compostos.

Os fenóis podem ser biossintetizados por várias vias metabólicas, estando envolvidas duas vias, a do ácido xiquímico e a do ácido malónico (Taiz e Zeiger 2002). A via do ácido xiquímico está envolvida na biossíntese da maioria dos compostos fenólicos das plantas, enquanto que a via do ácido malónico é menos importante nas plantas superiores, sendo responsável pela biossíntese de compostos fenólicos nas bactérias e fungos (Taiz e Zeiger 2002).

A via do ácido xiquímico (fig. 1.9) converte o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4 fosfato, resultantes da glicólise e da via da pentose fosfato, respectivamente, em aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano (Taiz e Zeiger 2002). A classe mais abundante de compostos fenólicos das plantas resulta da fenilalanina, esta é convertida em ácido cinâmico pela enzima fenilalanina amónia liase (PAL). O ácido cinâmico é por sua vez convertido em ácido *p*-cumárico. Este último também pode ser produzido directamente a partir da tirosina, pela acção da enzima tirosina amónia liase (TAL) (Peters e Croteau 2004). O ácido *trans*-cinâmico, o ácido *p*-cumárico e os seus derivados são compostos fenólicos simples, designados de fenilpropanóides, pois contêm um anel benzénico e uma cadeia lateral de três carbonos (Taiz e Zeiger 2002).

Os flavonóides são uma das maiores classes de fenóis das plantas. Estão presentes na maioria dos tecidos, geralmente nos vacúolos (Croteau *et al* 2000). Os flavonóides são biossintetizados a partir do ácido *p*-cumárico, este é hidroxilado formando 4-cumarato e,

posteriormente, este composto liga-se ao CoA formando 4-cumaril-CoA. Este último serve de substrato à chalcona sintase, enzima chave na produção de flavonóides, isoflavonóides e taninos (Peters e Croteau 2004).

Muitos compostos fenólicos simples têm funções importantes nas plantas, como a defesa contra insectos, herbívoros e fungos. As furanocoumarinas são fototóxicas, estas são activadas pela luz na gama dos UV-A (300-400nm). Estes compostos quando activados inserem-se no DNA, ligam-se às bases pirimidínicas, impedindo a transcrição, conduzindo, assim, à morte celular (Taiz e Zeiger 2002). Os flavonóides são compostos fenólicos que contêm uma variada gama de substâncias coloridas. As antocianinas são o grupo mais vasto de flavonóides pigmentados e são responsáveis pelo vermelho, rosa, azul e púrpura observados nas plantas. As antocianinas são vitais na atracção de animais para a polinização e dispersão de sementes (Taiz e Zeiger 2002). As flavonas e os flavonóis são outros dois grupos de flavonóides encontrados nas flores. Estes compostos absorvem a luz a comprimentos de onda mais baixos que as antocianinas, logo não são visíveis ao olho humano, mas são visíveis para os animais. Estas duas classes de flavonóides protegem as células da radiação UV-B excessiva (Taiz e Zeiger 2002).

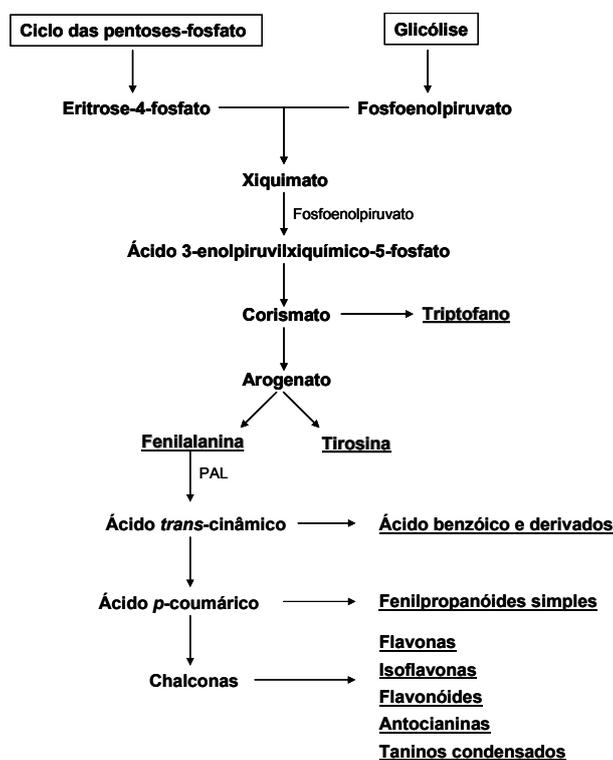


Fig. 1.9. Biossíntese dos compostos fenólicos. Nas plantas superiores a maioria dos fenóis são derivados da fenilalanina, que é produzida pela via do ácido xiquímico. Por esta via são ainda sintetizados outros aminoácidos aromáticos, como a tirosina e o triptofano (adaptado Taiz e Zeiger 2002).

1.3.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais, também conhecidos por essências, são misturas complexas de substâncias voláteis biossintetizadas por organismos vivos. Os óleos são utilizados na alimentação, nas fragrâncias, nos cosméticos e na indústria farmacêutica (Başer 1995).

Os constituintes dos óleos essenciais podem existir sob a forma de hidrocarbonetos, álcoois,

aldeídos, cetonas, ésteres, aminas, entre outros. Apesar da complexidade da composição química dos óleos essenciais, os terpenos são os constituintes maioritários, nomeadamente os mono-, sesqui- e diterpenos. Os restantes compostos dividem-se em fenilpropanóides, ácidos gordos e ésteres derivados destes ácidos gordos (Başer 1995). Nas plantas, os óleos essenciais podem ser encontrados em canais secretores, idioblastos, tricomas secretores, bolsas e osmóforos. Em muitos casos encontram-se glicosilados, ocorrendo a separação por hidrólise da ligação glicosídica. Podem estar também associados a gomas (oleogomoresina) ou resinas (oleoresinas) e a libertação do óleo essencial destas combinações naturais pode ocorrer por destilação (Başer 1995).

1.3.2. Utilização dos óleos essenciais na quimiotaxonomia

A utilização dos metabolitos secundários na taxonomia das plantas tem vindo a ser reconhecida (Vieira *et al* 2001), podendo também ser utilizados em estudos evolutivos (Hsiao e Lin 1995).

A utilização dos metabolitos secundários como marcadores intra-específicos necessita ter em conta vários factores, como o estágio de desenvolvimento dos órgãos (ontogenia foliar, floral e do fruto), condições ambientais, localização geográfica e factores genéticos, entre outros. Todos estes factores podem influenciar a composição química dos óleos (Vieira *et al* 2001, Figueiredo *et al* 2006). São vários os exemplos na bibliografia que ilustram a utilização dos metabolitos secundários na caracterização e taxonomia das plantas.

Em *Ocimum gratissimum* a análise dos óleos essenciais permitiu a identificação de três quimiotipos distintos (eugenol, timol e geraniol). Neste estudo foi demonstrada uma associação entre os metabolitos secundários e as características morfológicas (Vieira *et al* 2001). Estudos posteriores com várias espécies do género *Ocimum*, revelaram que a separação em cinco grupos, baseada na composição química dos óleos essenciais, não correspondia às diferentes espécies. Os grupos formados tendo por base as características morfológicas não apresentaram correspondência com os grupos formados a partir da composição química dos óleos; estes últimos podem ser detectados em diferentes espécies (Vieira e Simon 2006).

Com base na composição química dos óleos essenciais foi possível separar em grupos distintos diferentes espécies de *Hypericum*, embora estas tenham apresentado entre si um elevado índice de correlação (Nogueira *et al* 2008).

Em *Thymus caespitius*, foi detectado um elevado polimorfismo químico, que possibilitou a distinção de diferentes populações em função dos seus quimiotipos (carvacrol, timol e α -terpineol), bem como uma elevada correlação entre os perfis químicos das populações e a sua localização geográfica (Pereira *et al* 2003, Santos *et al* 2005).

Existem também na bibliografia exemplos com flavonóides, e Fico e colaboradores 2003 referem no género *Aconitum* a existência de quatro perfis de flavonóides distintos. Cada perfil foi associado a uma espécie e os diferentes grupos formados a partir dos RAPDs e da análise química correspondem às espécies de *Aconitum* estudadas.

Os perfis dos óleos essenciais de indivíduos de *Salvia fruticosa* separaram as plantas em três grupos, correspondendo aos três locais em estudo. As populações de Kavoussi e Kapsa apresentaram alguma proximidade, enquanto que a população de Vrysses ficou mais afastada das outras (Skoula *et al* 1999).

A variação dos óleos essenciais de folhas foi utilizada para descrever a diversidade intra-específica e as variações dos padrões geográficos de populações de *Chamelaucium uncinatum* (Egerton-Warburton *et al* 1998).

1.4. Marcadores Genéticos

Os marcadores genéticos são localizações específicas num cromossoma que servem de pontos de referência para a análise do genoma. Os marcadores genéticos podem ser de dois tipos: marcadores morfológicos ou moleculares (Kumar 1999).

As características morfológicas que são controladas por um único *locus* podem ser utilizadas como marcadores genéticos desde que a sua expressão seja reprodutível em diferentes ambientes (Kumar 1999). Para além do ambiente, a expressão dos marcadores morfológicos é também alterada por interacções epistáticas (interacções genéticas) e pleiotrópicas (expressão diferencial de um gene).

1.4.1. Marcadores moleculares

Os marcadores de DNA são fragmentos específicos de DNA que podem ser identificados ao longo do genoma. Por detectarem variações genéticas, os marcadores moleculares podem fornecer informações úteis a diferentes níveis: estrutura da população, relações filogenéticas, padrões de biogeografia histórica e análises de ascendência e parentesco (Féral 2002).

Os marcadores moleculares têm sido utilizados em várias aplicações, como a construção de mapas genéticos de *linkage*, análise de mapeamento comparativo, conhecimento da variação natural, identificação de genes economicamente importantes e na selecção assistida por marcadores (Kumar 1999)

O grande desafio para os investigadores é a selecção dos marcadores para um determinado trabalho. Os marcadores moleculares têm que possuir algumas propriedades, como elevado polimorfismo, hereditariedade co-dominante, larga distribuição no genoma, fácil acesso, baixo custo, elevada reprodutibilidade, entre outras. Até agora não existe nenhum marcador molecular que possua todas estas propriedades (Semagn *et al* 2006).

Os marcadores moleculares, principalmente os marcadores de DNA, existem em maior número e apresentam várias vantagens face aos marcadores morfológicos. Existem várias classes de marcadores moleculares (tabela 1.5.), entre os quais se salientam três classes: as isoenzimas, os polimorfismos baseados na hibridização (RFLPs, *Restriction Fragment Length Polymorphisms* e VNTRs, *Variable Number of Tandem Repeats*) e os polimorfismos baseados no PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como os RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), os ISSRs (*Inter-Simple Sequence Repeat*) e os AFLPs (*Amplified Fragments Length Polimorphisms*) (Bussell *et al* 2005).

RAPDs

Os RAPDs foram descritos pela primeira vez por Williams e colaboradores em 1990. Estes investigadores utilizaram pequenos *primers* com sequências aleatórias de nucleótidos (10 nucleótidos) e observaram que estes eram capazes de amplificar segmentos de DNA genómico de

várias espécies e gerar polimorfismos. No mesmo ano, outro grupo de investigadores também utilizou *primers* aleatórios no genoma e detectou polimorfismos, mas estes designaram a técnica por AP-PCR (Welsh e McClelland 1990).

Tabela 1.5. Comparação entre os diferentes tipos de marcadores moleculares, as suas características, vantagens e desvantagens

Marcadores Moleculares	Características	Vantagens	Desvantagens
Isoenzimas	<ul style="list-style-type: none"> - Diferentes formas moleculares de uma mesma enzima. - Diferenças de aminoácidos na cadeia polipeptídica das diferentes formas alélicas de uma enzima reflectem mudanças na sequência de DNA. 	<ul style="list-style-type: none"> - Marcador co-dominante (capaz de diferenciar indivíduos homocigóticos dos heterocigóticos). - Tecnologia de custo acessível. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nem todas as alterações no DNA são visíveis a nível proteico.
RFLPs	<ul style="list-style-type: none"> - Utilização de enzimas de restrição que cortam o genoma em locais específicos. Formação de fragmentos de diferentes tamanhos 	<ul style="list-style-type: none"> - Permite a análise de variações no DNA. - Marcador co-dominante. - Reprodutibilidade elevada. 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessidade de hibridação com sondas radioactivas. - Pesquisa de polimorfismos apenas em regiões codificantes. - Detecção de poucos polimorfismos. - Tecnologia dispendiosa. - Difícil execução.
VNTRs	<ul style="list-style-type: none"> - Variação formada a partir das mudanças do número de cópias das repetições. 	<ul style="list-style-type: none"> - Detecção de um grande número de alelos por <i>locus</i>. - Marcador co-dominante, mas menos que os RFLPs. 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessário o conhecimento prévio do genoma.
ISSRs	<ul style="list-style-type: none"> - Os polimorfismos derivam dos SSRs por ancoragem terminal de um <i>primer</i>, dando-se amplificação de dois SSRs do mesmo tipo. - Marcador dominante. 	<ul style="list-style-type: none"> - Rápida detecção de <i>loci</i> polimórficos em todo o genoma. - Elevada reprodutibilidade. - Baixo custo. - Fácil execução. 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada taxa de mutação.
RAPDs	<ul style="list-style-type: none"> - Marcadores que utilizam uma sequência aleatória de 10nucleótidos. - Marcador dominante. 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado número de polimorfismos detectados. - Baixo custo. - Fácil execução. 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa reprodutibilidade. - Presença de alguns artefactos.
AFLPs	<ul style="list-style-type: none"> - Marcadores baseados na amplificação de fragmentos de restrição, por PCR. - Marcador dominante. 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado número de polimorfismos detectados em todo o genoma. - Fácil execução. 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessário uma boa qualidade de DNA de modo a assegurar a digestão pelas enzimas de restrição. - Necessário o conhecimento prévio do genoma. - Custos iniciais elevados.

Os RAPDs são marcadores baseados no PCR. A variação genética e divergências dentro e entre *taxa* é analisada pela presença ou ausência de uma banda, que é resultante de alterações na sequência de DNA num determinado *locus* (Liu e Cordes 2004). Os polimorfismos detectados com este tipo de marcadores pode ocorrer devido a deleções na sequência de ligação do *primer* ao DNA (impedindo deste modo a amplificação do fragmento) e inserções ou deleções entre duas sequências de emparelhamento adjacentes (levando à amplificação de fragmentos de diferentes tamanhos) (Lacerda *et al* 2002).

Entre as vantagens mais frequentemente citadas para esta técnica destacam-se a simplicidade, rapidez, baixo custo, necessidade de pequenas quantidades de material para a análise e não necessitar de informação prévia sobre o genoma dos indivíduos (Lacerda *et al* 2002). A análise de RAPDs necessita de uma pequena quantidade de DNA, o que torna esta técnica muito atraente para o estudo genético de plantas, pois é difícil obter DNA em grande quantidade e de boa qualidade para as amplificações em muitas espécies. Da mesma forma, torna a técnica interessante para o estudo de espécies raras ou ameaçadas, nas quais pode ser complicado obter amostras de tecido em quantidade suficiente para a extração de DNA (Lacerda *et al* 2002). Os RAPDs detectam um elevado número de polimorfismos em todo o genoma, mesmo em zonas não codificantes, permitindo assim estabelecer relações entre indivíduos e populações de uma determinada espécie (Lacerda *et al* 2002).

Os RAPDs são marcadores dominantes com hereditariedade Mendeliana (presença/ausência de bandas), resultando na incapacidade de distinção entre indivíduos homozigóticos dominantes e heterozigóticos, pois não é determinado se as bandas correspondem a diferentes *loci* ou a alelos de um *locus* (Liu e Cordes 2004). Outra limitação associada a esta técnica é a baixa reprodutibilidade, mesmo quando as condições de amplificação são mantidas (Lacerda *et al* 2002).

1.4.2. Utilização dos marcadores moleculares nas plantas aromáticas

Só muito recentemente, as características morfológicas e a composição química dos óleos essenciais foram correlacionadas com os marcadores moleculares. Tradicionalmente, a identificação de espécies era baseada em características fenotípicas muitas vezes influenciadas pelo ambiente, tornando difícil a sua classificação (Masi *et al* 2006).

O genoma das plantas tem aproximadamente 20000-60000 genes e muito provavelmente 15-25% desses genes codificam enzimas para o metabolismo secundário. Mas, o genoma de uma espécie específica codifica apenas uma pequena fração das enzimas necessárias para a síntese de todos os metabolitos secundários existentes no reino das plantas (Pichersky e Gang 2000).

As vias biossintéticas dos metabolitos secundários não são totalmente conhecidas e o número de genes conhecidos que codificam as enzimas envolvidas nestas vias é muito limitado. Com o avanço crescente da investigação nesta área, pensa-se que num futuro próximo o genoma de muitas plantas será revelado, permitindo progressos significativos na genómica funcional (Verpoorte *et al* 2000).

Nos últimos anos, os marcadores moleculares baseados no DNA têm sido utilizados na identificação de cultivares e na análise das relações genéticas entre indivíduos e espécies, contribuindo, também, para estudos evolutivos e ecológicos (Fracaro *et al* 2005). Os marcadores de DNA são considerados a melhor ferramenta para determinar relações genéticas e diversidade, uma vez que existem em número ilimitado, demonstram elevado polimorfismo, são independentes das interações ambientais e têm elevada hereditariedade (Singh *et al* 2004).

Os RAPDs provaram ser uma ferramenta muito útil, pois fornecem uma rápida e conveniente análise das diferenças genéticas entre genótipos. Uma vez que utilizam *primers* arbitrários fornecem um grande número de marcadores *multilocus* e podem ser utilizados em quase todos os organismos, sem necessitar de informações prévias, genéticas ou moleculares (Fracaro *et al* 2005).

Fracaro e colaboradores (2005) conseguiram separar populações de *Cunila* em três grupos,

através da análise por RAPDs. Cada grupo era composto por populações de espécies diferentes, *Cunila galiodes*, *Cunila microcephala* e *Cunila incisa*. Os mesmos autores concluíram que as populações de *Cunila galiodes* com os quimiotipos citral e menteno estão mais correlacionados entre si e que as populações com o quimiotipo ocimeno representam um grupo diferente.

Em *Juniperus* sp. a comparação da análise de diferentes genótipos utilizando ISSR, RAPDs, dados de sequências de ITS e análise de terpenóides voláteis, revelou haver uma maior concordância entre os dados moleculares de que com os terpenóides. Os terpenóides são mais úteis a um nível intra-específicos e não a nível taxonómico, como foram utilizados neste trabalho (Adams *et al* 2003).

Keskitalo e colaboradores (1998) estudaram as diferenças genéticas e morfológicas em *Tanacetum vulgare* (Apiaceae) de origem Finlandesa. Os diferentes genótipos eram distinguidos tanto a nível morfológico como a nível molecular, por RAPDs. Através destes conseguiu-se separar os genótipos em dois grupos, um grupo de plantas nativas da Finlândia e o outro grupo de plantas introduzidas no país através da agricultura. Num estudo posterior com a mesma espécie, foi demonstrado que existia uma elevada correlação entre a componente molecular e a análise química dos compostos voláteis. A analogia entre as diferenças químicas e moleculares destes indivíduos sugere que as diferentes composições de terpenos resultam de uma activação diferencial das enzimas específicas, podendo estar correlacionadas com a variação do padrão dos RAPDs (Keskitalo *et al* 2001).

Em *Salvia fruticosa*, o padrão de relação observado entre os perfis químicos aparenta corresponder bem aos perfis moleculares obtidos por RAPDs, sugerindo que pode haver uma base genética nos perfis químicos observados (Skoula *et al* 1999)

Foi observado um baixo nível de variação genética em *Bacopa monnieri*, uma planta medicinal Indiana, através da análise do padrão de RAPDs. Esta variação pode ser atribuída à relação da fase sexual com a fase vegetativa da reprodução e à semelhança do ambiente nos diferentes locais de colheita (Darokar *et al* 2001).

Em *Ocimum gratissimum* L., observou-se uma clara separação dos três quimiotipos (eugenol, geraniol e timol), através da análise dos compostos secundários, flavonóides e RAPDs. Estes resultados mostraram que os óleos essenciais e os flavonóides, desta espécie, podem diferenciar os indivíduos de forma semelhante aos marcadores moleculares (Viera *et al* 2001).

Uma vez que os RAPDs são marcadores aleatórios presentes ao longo de todo o genoma, não reflectem, necessariamente, características morfológicas ou químicas específicas. A correlação entre os marcadores moleculares e os óleos essenciais indicam que os marcadores moleculares podem estar associados aos constituintes dos óleos (Viera *et al* 2001).

1.5. Objectivos

Desde a antiguidade que as plantas aromáticas e medicinais têm sido utilizadas com diferentes fins pelo Homem. Desde o final do século XIX início do século XX que os compostos secundários têm vindo a ser estudados, a estes foram atribuídas funções de defesa, atracção de animais polinizadores e dispersores de sementes. Ainda há muito por descobrir sobre estes compostos, nomeadamente as vias biossintéticas, a sua regulação genética, entre outros. Nem todas as plantas aromáticas têm sido investigadas em larga escala, por isso existe uma grande lacuna

nesta área.

A utilização de indivíduos em vez de populações permite obter uma análise mais refinada dos dados, uma vez que a base genética é única em cada amostra e não há misturas de DNA.

Com este trabalho pretendeu-se aprofundar o estudo de algumas plantas aromáticas da flora de Portugal, realizando uma abordagem conjunta da composição química e da análise de marcadores moleculares, do endemismo Ibérico e Macaronésico, *Thymus caespitius*, dos endemismos Açorianos *Ammi huntii*, *Angelica lignescens*, *Chaerophyllum azoricum* e do endemismo Madeirense *Melanoselinum decipiens*, além de *Crithmum maritimum*. Para o efeito procedeu-se à:

- Análise da composição química dos óleos essenciais de indivíduos pertencentes às diferentes espécies por cromatografia gás-líquido e espectrometria de massa;
- Análise molecular por RAPDs dos mesmos indivíduos
- Comparação entre a análise química e a análise molecular e possível correlação entre estas.

2. Material e Métodos

2.1. Material Vegetal

Neste trabalho foram analisadas seis espécies, uma pertencente às Lamiaceae e cinco às Apiaceae (tabela 2.1). O anexo A. refere, de forma detalhada, os locais de colheita e abreviaturas utilizadas para cada um dos indivíduos destas espécies. O material vegetal (partes aéreas) utilizado na análise da composição química dos óleos essenciais e extracção de DNA foi armazenado a -20°C e a -80°C, respectivamente.

Tabela 2.1. Relação das espécies estudadas, locais e anos de colheita e número de indivíduos analisados.

Espécies estudadas	Família	Local de colheita	Ano de colheita	Nº de indivíduos
<i>Thymus caespitius</i> Brot.	Lamiaceae	Arquipélago dos Açores e da Madeira	Julho 2006	16
<i>Ammi huntii</i> Wats.	Apiaceae	Arquipélago dos Açores	Julho 2004, 2005, 2006	14
<i>Chaerophyllum azoricum</i> Trel.		Arquipélago dos Açores	Julho 2004, 2007	7
<i>Crithmum maritimum</i> L.		Arquipélago dos Açores	Julho 2004, 2005, 2006	43
<i>Angelica lignescens</i> ¹ Reduron & Danton		Arquipélago dos Açores	Julho 2004, 2005, 2006	14
<i>Melanoselinum decipiens</i> Hoffm.		Arquipélago da Madeira	Julho 2005, 2006	3

2.2. Extracção dos voláteis

Os voláteis foram extraídos dos diferentes indivíduos por destilação-extracção durante 3h, com uma velocidade de destilação de 3ml.min⁻¹, utilizando um aparelho do tipo Likens-Nickerson (Lickens & Nickerson 1964) com *n*-pentano destilado, como solvente orgânico. A componente volátil foi concentrada à temperatura ambiente num evaporador rotativo, sendo, posteriormente, concentrada num volume menor sob fluxo de azoto. As amostras de óleo foram armazenadas a -20°C até análise.

2.3. Cromatografia Gás-Líquido

Os voláteis foram analisados por Cromatografia Gás-Líquido (CGL), num cromatógrafo Perkin Elmer 8700 equipado com dois detectores de ionização de chama (DIC), um sistema de tratamento de dados e um injector, no qual foram instaladas duas colunas de polaridade diferente com as seguintes características:

- DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada em metilsilicone (30m x 0,25mm d.i., espessura de filme 0,25µm; J & W Scientific Inc.);
- DB-17HT de fase imobilizada em fenilmetilsilicone (30m x 0,25mm d.i., espessura

¹ A análise química e molecular para os diferentes indivíduos de *Angelica lignescens* e *Melanoselinum decipiens* foi realizada em conjunto.

de filme de 0.15 μ m; J & W Scientific Inc.);

A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, com incrementos de 3°C.min⁻¹, e subsequentemente a 15°C.min⁻¹ até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida durante 10min.

As temperaturas do injectador e dos detectores foram programadas para 280°C e 290°C, respectivamente. Foram injectados volumes de amostras na ordem dos 0,05 μ l. O hidrogénio foi utilizado como gás de arrastamento, ajustado para uma velocidade linear de 30cm.s⁻¹ e utilizada uma relação de repartição de fluxo 1:50.

A composição percentual dos óleos foi determinada pela integração das áreas dos picos sem utilização de factores de correcção. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de duas injeções.

2.4. Cromatografia Gás-Líquido – Espectrometria de massa

Nas análises de Cromatografia Gás-Líquido/Espectrometria de Massa (CGL/EM) utilizou-se um cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL, equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30m x 0,25mm d.i., espessura de filme 0,25 μ m; J & W Scientific Inc.) ligado a um espectrómetro de massa Perkin Elmer Turbomass (versão do software 4.1).

A temperatura do forno foi programada como descrito em 2.3. O injectador foi programado para uma temperatura de 300°C, a linha de transferência para 280°C e a câmara de ionização para os 220°C. Foi utilizado o hélio como gás de arrastamento, ajustado para uma velocidade linear de 30cm.s⁻¹. As amostras foram injectadas com uma repartição de fluxo de 1:40, foi utilizada uma energia de ionização de 70eV, a corrente de ionização de 60 μ A e uma gama de massas, 40-300u. O tempo de varrimento foi de 1s, sendo injectados volumes da ordem de 0,1 μ l.

A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção e espectros de massa, com os padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida no laboratório.

2.5. Extracção de DNA

O DNA dos diferentes indivíduos das diferentes espécies foi extraído a partir das folhas, segundo o método descrito por Doyle e Doyle (1987) e modificado por Weising e colaboradores (1995) e adaptado para estas espécies:

- Macerou-se cerca de 1,5g de folhas em azoto líquido e adicionou-se a 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;
- Adicionou-se igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e agitou-se por inversão durante 5min, de seguida centrifugou-se a mistura a 5000g durante 10min numa centrífuga (Sigma 2K15), à temperatura ambiente. Transferiu-se a fase aquosa para novo tubo de centrífuga e efectuou-se nova extracção semelhante à anterior;
- Transferiu-se a fase aquosa, sendo adicionado NaCl 5M na proporção de 0,5 do

volume de fase aquosa, para remoção de polissacáridos e 0,6 do volume total de isopropanol a -20°C , para a precipitação dos ácidos nucleicos. Agitou-se ligeiramente por inversão dos tubos para formação de “novelos” de DNA;

- Incubação durante 1h a -20°C ;
- Após o período de incubação, centrifugou-se a mistura a 2500g durante 10min a 4°C ;
- Descartou-se o sobrenadante e ao precipitado obtido adicionou-se 1ml de tampão TE (1mM EDTA pH 8,0, 10mM Tris-HCl). Após a solubilização do sedimento adicionou-se $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de RNase A para remoção do RNA e incubou-se a mistura durante 1h a 37°C ;
- Passado o período de incubação, adicionou-se igual volume de cloróformio e agitou-se por inversão durante 5min. Centrifugou-se a solução a 10000g durante 5min à temperatura ambiente;
- Transferiu-se a fase aquosa e adicionou-se 0,1vol de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2,5vol de etanol puro a -20°C para a precipitação do DNA total. Agitou-se suavemente por imersão para formação de “novelos” de DNA. Deixou-se a precipitação a decorrer durante a noite a -20°C ;
- Após o período de precipitação do DNA, centrifugou-se a mistura a 10000g durante 20min a 4°C . Descartou-se o sobrenadante e procedeu-se à lavagem do sedimento com 1ml de solução de lavagem (76% etanol e 10mM acetato de amónio), agitou-se ligeiramente e transferiu-se a mistura para um microtubo;
- Centrifugou-se a mistura a 5000g durante 10min a 4°C e posteriormente descartou-se o sobrenadante e secou-se o sedimento ao ar durante 45min;
- O DNA foi ressuspenso em 300-600 μl de tampão TE e deixou-se solubilizar a 4°C durante a noite.

A qualidade e concentração do DNA total foi analisada por um espectrofotómetro (SmartSpec 3000, Bio Rad) a 260nm e 280nm. As amostras de DNA foram guardadas a 4°C .

2.6. Amplificação por RAPDs

As reacções de PCR ocorreram numa mistura de 25 μl , composta por água destilada esterilizada, 1x tampão de reacção da enzima, 3mM MgCl_2 , 200 μM dNTPs, 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ BSA, 1 μM primer, 1U Taq polimerase (Invitrogen) e 10ng DNA purificado (10ng $\cdot\mu\text{l}^{-1}$).

A amplificação do DNA deu-se num termociclador TGradient (Biometra). As 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 para a extensão final 5min a 72°C .

Para as espécies em estudo utilizaram-se 51 primers de RAPDs (anexo B), dos quais foram seleccionados 18 para o *T. caespititius*, 22 para o *C. maritimum*, 16 para o *A. huntii*, 16 para o *M. decipiens* e *A. lignescens* e 23 para o *C. azoricum*, por apresentarem uma boa amplificação para todos os indivíduos das diferentes espécies.

Foram realizadas pelo menos, duas reacções de amplificação distintas para cada primer, de modo a avaliar a reprodutibilidade da reacção. Em todas as reacções de amplificação utilizou-se um indivíduo como controlo externo (“outgroup”), o *Thymus carnosus* para o *T. caespititius*, o *A. huntii* para o *C. maritimum* e para o *C. azoricum*, o *C. azoricum* para o *A. huntii*, para o *M.*

decipiens e *A. lignescens*. O controlo externo é um indivíduo que apresenta alguma relação filogenética com os indivíduos em estudo, no entanto esta relação é menor do que a observada entre os indivíduos em estudo (“ingroup”). O “outgroup” é utilizado para formar a base do dendrograma (“outgroup rooting”) e vai permitir inferir as relações entre os indivíduos.

Os fragmentos de amplificação do DNA foram separados por electroforese em gel de agarose 2% (1x tampão TAE e 0,004% brometo de etídio) juntamente com o marcador Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas), a 70V durante 3h e visualizados sob luz UV. Nos poços do gel de agarose colocou-se 14µl de DNA das amostras e 3µl de marcador. As imagens foram adquiridas utilizando o sistema de aquisição “GeneFlash” (Syngene).

2.7. Análise estatística

A composição percentual dos óleos essenciais foi utilizada na determinação da relação entre os diferentes indivíduos, pela análise de *cluster*, usando o programa NTSYS (Rohlf, 1992). A correlação de Pearson foi seleccionada como medida de semelhança e utilizou-se o agrupamento segundo a associação média (UPGMA) na definição de *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 as amostras, se o seu coeficiente de correlação estiver entre 0,9 e 1,0 alta, se variar entre 0,7 e 0,89, moderada entre 0,4 e 0,69, baixa entre 0,2 e 0,39 e muito baixa se for inferior a 0,2.

Os géis foram analisados com o software “Genetools” (Syngene) e as dimensões dos fragmentos foram inferidos por comparação com o marcador.

Dos fragmentos obtidos, apenas foram utilizados os que apresentavam uma boa definição, reprodutibilidade e dimensão entre os 300pb e os 2,8kb. As bandas foram avaliadas como presentes (1) ou ausentes (0) nos diferentes indivíduos para cada reacção de RAPD.

A semelhança genética entre pares foi estimada, com base na matriz binária gerada, de acordo com o coeficiente Dice (Sneath e Sokal 1973). A similaridade do coeficiente Dice é definida segundo a fórmula $S_{ij}=2a/(2a+b+c)$, onde S_{ij} corresponde à similaridade entre indivíduos i e j , a é o número de bandas em comum, b é o número de bandas presentes em i e ausentes em j , c é o número de bandas presentes em j e ausentes em i . ou seja, a similaridade é definida como o dobro das bandas em comum sobre o número total de bandas amplificadas nos dois indivíduos. Esta abordagem parece ser a mais apropriada para características genéticas, pois só considera os indivíduos geneticamente semelhantes somente quando possuem uma banda em comum, a ausência de uma banda em comum não significa uma semelhança em termos genéticos.

Os dendrogramas foram construídos a partir da análise de *clusters* baseada na associação média (UPGMA) do software NTSYS (Rohlf 1992).

A correlação entre a análise química e a análise molecular foi determinada a partir do coeficiente de Pearson (r) do software SPSS 15.0 for Windows. Este coeficiente é uma medida de associação linear entre duas variáveis, podendo ter valores entre -1,0 e 1,0. O valor -1 representa uma correlação negativa (inversa) perfeita, 0,0 corresponde a uma ausência de correlação e 1,0 representa uma correlação perfeita positiva.

3. Resultados

3.1. *Thymus caespitius*

Os óleos essenciais isolados dos diferentes indivíduos de *T. caespitius* colhidos durante a fase de floração apresentaram uma coloração amarela e um odor bastante forte. Em estudos prévios, foi determinado o rendimento dos óleos essenciais de populações de *T. caespitius* e este foi de 0,1-1,2% (v/w) (Santos *et al* 2005).

No total dos 18 óleos analisados, foram identificados 79 componentes nos 18 óleos isolados dos indivíduos colhidos nas ilhas dos Açores e da Madeira, resultando numa percentagem de identificação superior a 87% em qualquer amostra. Os componentes maioritários identificados, e a sua variação em termos da percentagem relativa máxima e mínima nos óleos isolados dos vários indivíduos colhidos por ilha, encontram-se na tabela 3.1, onde os componentes estão listados em função da sua ordem de eluição na coluna DB-1.

A fracção monoterpénica (tabela *Thymus caespitius* em Cd) foi dominante em todos os óleos analisados (80-91%), sendo a percentagem relativa da fracção sesquiterpénica muito mais baixa (2-13%). Nos óleos isolados dos diferentes indivíduos, os monoterpenos oxigenados foram detectados em maior percentagem relativa (45-78%) que os hidrocarbonetos monoterpénicos (11-27%). Os componentes não terpénicos estavam presentes em percentagens reduzidas, por vezes vestigiais, em todos os óleos obtidos.

Ainda que com percentagens relativas variáveis (45-68%), o carvacrol foi o componente dominante de todos os óleos isolados dos indivíduos colhidos em São Miguel e no Faial. Verificou-se, contudo, variação no segundo componente dominante. Enquanto que o acetato de carvacrilo (5-24%) foi detectado nos óleos isolados dos indivíduos de São Miguel, nos óleos isolados dos indivíduos colhidos no Faial foi detectado o α -terpineol (13%) no óleo do indivíduo FaPCa1, o *p*-cimeno (5%) e o acetato de carvacrilo (2-5%) no óleo do indivíduo FaCT, o *p*-cimeno (5%) e o NIThcaespB (4%) no óleo do indivíduo FaPCa2. No óleo essencial isolado do indivíduo recolhido na ilha da Madeira, os componentes maioritários detectados foram o α -terpineol (33%), seguido pelo β -mirceno (6%), o *p*-cimeno (4%) e o γ -terpineno (5%). Nesta amostra de óleo, a percentagem relativa de carvacrol foi muito baixa (0,3%) e o acetato de carvacrilo não foi detectado.

Os indivíduos colhidos nos Açores e o indivíduo colhido na ilha da Madeira apresentaram perfis químicos diferentes, do tipo carvacrol, nos óleos isolados dos indivíduos colhidos em São Miguel e no Faial e do tipo α -terpineol no óleo isolado do indivíduos recolhido na ilha da Madeira.

Foram detectados quatro componentes nos óleos essenciais de todos os indivíduos em estudo, cuja identificação não foi ainda possível (fig. 3.1). De todos estes componentes o NIThcaespB foi o que apresentou maior percentagem relativa (2-4%).

Tabela 3.1. Composição percentual dos componentes dominantes ($\geq 1,5\%$ em pelo menos uma das amostras) dos óleos essenciais isolados das partes aéreas dos diferentes indivíduos de *T. caespitius*, colhidos, durante a fase de floração, em diferentes locais nas ilhas de São Miguel e Faial (Açores) e ilha da Madeira. Os valores representam o intervalo máximo (Máx) e mínimo (Min) de variação para cada componente.

Componentes	I. R.	São Miguel		Faial		Madeira
		Min	Máx	Min	Máx	
α -Tujeno	924	1,6	2,7	1,8	2,0	1,3
Sabineno	958	0,1	0,3	0,1	0,2	2,0
1-Octeno-3-ol	961	0,1	0,3	0,1	0,2	2,0
β-Mirceno	975	v	0,1	v	v	6,0
<i>p</i>-Cimeno	1003	3,9	7,2	4,6	6,6	4,1
Limoneno	1009	0,2	0,5	0,2	0,7	2,4
γ-Terpineno	1035	2,0	4,6	1,3	3,4	4,5
Borneol	1134	v	0,5	v	0,3	3,3
Terpineno-4-ol	1148	0,4	1,0	0,6	1,0	3,8
α-Terpineol	1159	v	1,9	0,6	12,5	33,3
Carvacrol	1286	45,3	68,3	46,6	64,8	0,3
Acetato de carvacrilo	1348	5,4	23,1	2,1	5,0	
<i>trans</i> - β -Cariofileno	1414	v	2,3	v	v	0,5
<i>trans</i> - β -Dihidroagarofurano	1489	1,1	2,9	1,6	2,2	2,8
Cessano*	1517	0,3	1,9	2,4	2,9	1,5
NIThcaespB	1609	1,8	4,0	2,7	4,2	3,9
T-cadinol	1616	v	1,0	2,0	3,1	1,6
Intermediol	1626	v	2,6	v	0,8	v
NIThcaespD	1662	v	1,5	0,2	2,3	1,1
% Identificação		88,8	95,4	89,5	91,6	87,6
Componentes agrupados						
Hidrocarbonetos monoterpénicos		10,6	16,8	11,1	16,2	27,4
Monoterpenos oxigenados		65,2	77,9	63,7	69,7	44,5
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos		0,3	4,9	3,1	5,7	5,9
Sesquiterpenos oxigenados		1,4	5,9	5,0	6,9	7,4
Ácidos gordos						v
Outros		0,1	1,3	1,1	1,2	2,4

I.R. – Índice de Retenção; v – vestigial (<0,05%); * - Identificação baseada apenas no espectro de massa;

A análise de *clusters* dos componentes identificados nas amostras dos óleos agrupou os 18 indivíduos em dois grandes grupos (fig. 3.2), correspondendo com os seus componentes maioritários: carvacrol (Açores), *cluster* I, e α -terpineol (Madeira), *cluster* II. Os indivíduos com óleos essenciais ricos em carvacrol foram agrupados no mesmo agrupamento, enquanto que o indivíduo da Madeira ficou num grupo à parte. Os indivíduos dos Açores e da Madeira apresentaram-se muito distantes quimicamente, pois o índice de correlação entre estes foi praticamente nulo. Já os diferentes indivíduos dos Açores apresentaram uma correlação entre si muito elevada, superior a 0,9. Os indivíduos dos Açores ficaram agrupados em três sub-grupos distintos.

A separação dos indivíduos por estes sub-grupos deveu-se ao teor do segundo componente maioritário nas amostras de óleo, o α -terpineol no óleo isolado do indivíduo FaPCa1 e o acetato de carvacrilo nos óleos isolados dos restantes indivíduos recolhidos nos Açores.

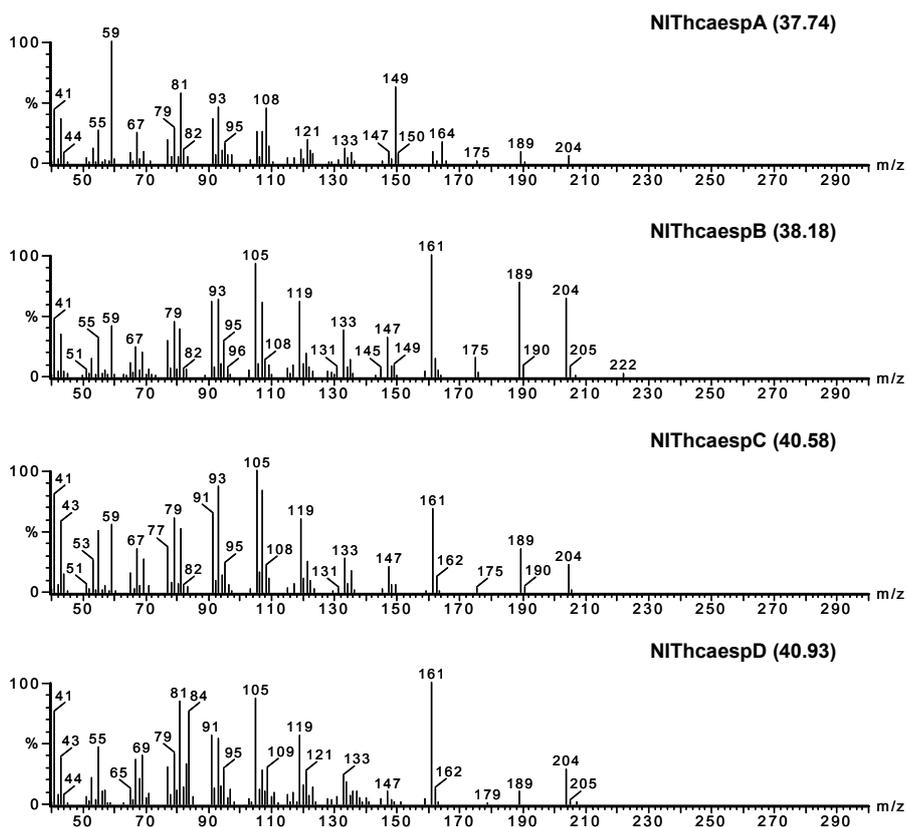


Fig. 3.1. Espectros de massa de quatro compostos não identificados, presentes nos óleos essenciais isolados dos diferentes indivíduos de *Thymus caespitius*.

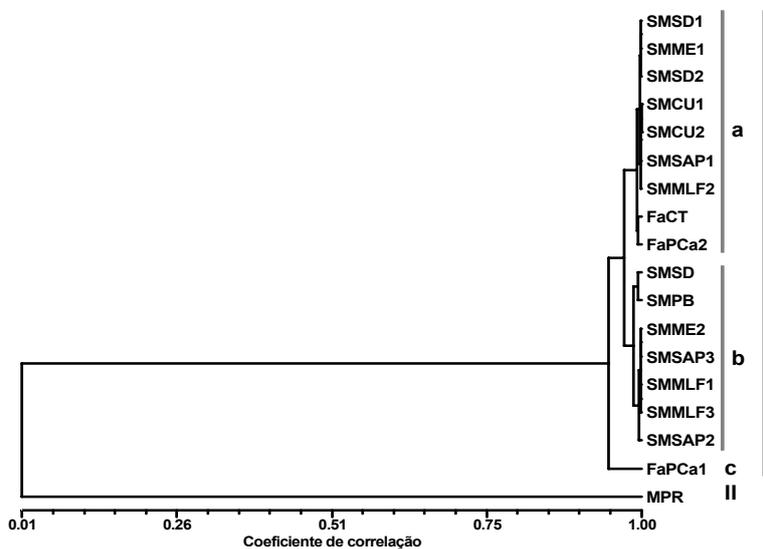


Fig. 3.2. Dendrograma obtido por análise de *clusters* da composição percentual dos óleos essenciais de 18 indivíduos de *Thymus caespitius*, utilizando a associação média (UPGMA).

Na análise molecular dos 18 indivíduos de *T. caespitius*, com os 18 primers seleccionados, obteve-se no total 241 bandas (anexo C.1), com tamanho entre os 300 e os 2800pb. O número de produtos de amplificação dos primers variou entre 7 (D05) e 23 (B10). Incluindo na análise o controlo externo (*Thymus carnosus*) obteve-se 97% de bandas polimórficas, sem esta planta o número de polimorfismos detectados foi de 77%.

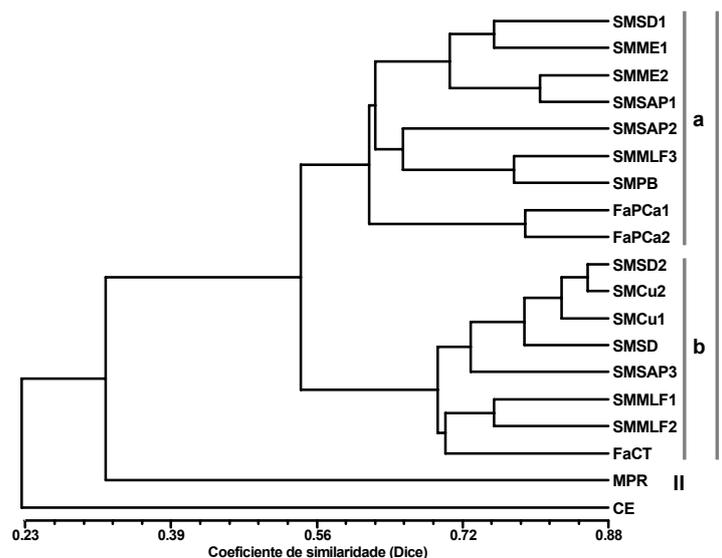


Fig. 3.3. Dendrograma obtido por análise de *clusters* baseada nos 18 *primers*, utilizando o coeficiente de similaridade Dice e a associação média (UPGMA) dos 18 indivíduos de *T. caespitius*.

A análise de *clusters* a partir dos marcadores moleculares (RAPDs) agrupou os diferentes indivíduos de *T. caespitius* em dois grupos distintos. O grupo I englobou todos os indivíduos dos Açores, e o indivíduo da Madeira ficou no grupo II (fig.3.3.). O coeficiente de similaridade entre os indivíduos dos Açores e da Madeira foi muito baixo, inferior a 0,4, revelando uma menor proximidade genética entre estes indivíduos. Os indivíduos dos Açores foram divididos em dois sub-grupos, e estes apresentaram entre si um índice de similaridade superior a 0,5.

Nas duas análises, química e molecular, os indivíduos da Madeira e os indivíduos dos Açores ficaram em grupos distintos, com coeficientes de similaridades muito baixos.

Comparando os grupos formados pela análise de *clusters* baseada na composição química (fig. 3.2) e pela análise baseadas nos dados de RAPDs (fig. 3.3) pode-se observar que os grupos formados em ambos os casos não foram organizados da mesma forma. No entanto, a correlação (coeficiente de Pearson) entre as distâncias obtidas pelos dois métodos de análise foi de 0,60 ($p \approx 0,00$). Este valor de correlação sugere que as duas análises apresentam entre si uma relação moderada.

3.2. *Crithmum maritimum*

Os óleos essenciais isolados das partes aéreas de 43 indivíduos de *C. maritimum* apresentaram uma coloração amarelada e um odor muito forte. O rendimento dos óleos essenciais não foi determinado neste estudo, mas em trabalhos anteriores com populações de *C. maritimum* das ilhas dos Açores o rendimento dos óleos encontrava-se entre os 0,1-0,3% (v/w) (Santos *et al* 2002).

Nas 43 amostras de óleos essenciais isolados foram detectados 54 componentes, resultando numa percentagem de identificação entre os 70-99%. Os componentes maioritários identificados, e a sua variação em termos da percentagem relativa máxima e mínima nos óleos isolados dos vários indivíduos colhidos por ilha, encontram-se na tabela 3.2, onde os componentes estão

listados em função da sua ordem de eluição na coluna DB-1.

Tabela 3.2. Composição percentual dos componentes dominantes ($\geq 1,5\%$ em pelo menos uma das amostras) dos óleos essenciais isolados das partes aéreas dos diferentes indivíduos de *C. maritimum*, colhidos, durante a fase de floração, em diferentes locais nas ilhas da Terceira, Flores, Pico, Corvo, Graciosa, São Jorge, São Miguel e Faial (Açores). Os valores representam o intervalo máximo (Máx) e mínimo (Min) de variação para cada componente.

Componentes	I.R.	Terceira		Flores		Pico		Corvo		Graciosa		São Jorge		São Miguel	Faial
		Min	Máx												
Sabineno	958	0,4	1,1	0,1	1,5	0,2	0,7	0,3	1,3	0,2	0,3	0,4	0,9	1,0	0,4
β -Mirceno	975	0,4	1,7	0,1	1,2	0,3	0,9	0,5	1,0	0,2	0,5	0,8	1,0	0,9	0,8
<i>p</i>-Cimeno	1003	6,1	17,4	8,4	29,8	13,1	31,2	21,3	22,3	23,7	28,8	3,5	8,7	8,2	11,6
Limoneno	1009	1,9	7,4	0,8	7,8	0,7	2,3	0,9	4,3	0,6	0,9	0,3	0,5	v	v
γ-Terpineno	1035	16,3	59,9	23,9	60,3	36,7	55,0	45,2	57,9	56,1	62,0	71,5	85,5	83,4	81,3
Terpinoleno	1064	0,3	0,5	0,1	2,2	v	1,0	0,4	0,4	0,2	1,9	0,1	2,9	0,2	0,2
Terpineno-4-ol	1148	0,5	2,1	0,1	1,5	0,2	1,3	0,3	0,7	0,4	1,1	v	0,7	0,3	0,4
Formato de timilo	1262	0,6	5,7	0,1	2,9	1,2	3,9	0,2	0,5	0,3	0,6	0,1	0,4	0,1	0,1
Timol	1275	1,0	9,3	0,3	3,9	1,4	5,4	0,4	1,1	0,5	0,8	0,2	0,8	0,2	0,2
Carvacrol	1286	2,0	18,0	1,2	6,8	2,8	9,5	0,8	1,9	0,9	1,5	0,3	1,4	0,3	0,4
γ -Elemeno*	1430	0,8	3,8	1,1	4,5	0,2	1,9	1,1	2,5	0,5	2,0	v	1,0	0,2	0,3
<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1434	0,2	0,9	v	3,2	v	0,5	0,1	0,7	v	0,4	v	0,4	0,2	v
<i>ar</i> -Curcumeno	1475	0,4	1,4	v	1,9	v	0,7	0,3	0,5	v	0,4				
β -Bisaboleno	1495	0,3	1,3	0,3	1,5	v	0,6	0,3	0,7	0,1	0,6	0,2	0,4	0,1	v
Germacreno-B*	1533	1,4	6,6	0,9	6,9	0,9	3,3	1,7	4,3	1,0	3,3	0,9	1,7	1,2	0,9
Falcarinol	2002	v	0,7	v	2,2	0,3	1,9	0,2	0,8	v	0,8	0,9	4,0	v	v
% Identificação		83,3	92,4	70,2	97,3	81,3	95,8	92,1	92,6	92,2	97,6	94,2	99,7	98,6	99,4
Componentes agrupados															
Hidrocarbonetos monoterpénicos		29,8	81,6	46,1	87,1	59,7	84,9	75,2	83,4	83,4	90,7	82,5	93,2	95,5	96,5
Monoterpenos oxigenados		4,6	36,9	2,3	16,6	6,3	20,9	2,5	5,3	2,6	4,1	1,0	3,1	0,9	1,1
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos		4,3	16,0	3,3	18,5	2,2	7,3	4,1	10,3	2,4	7,5	2,9	6,2	2,0	1,5
Sesquiterpenos oxigenados												v	0,2		
Fenilpropanóides												v	0,2		
Poliacetilenos		v	0,7	v	2,2	0,3	1,9	0,2	0,8	v	0,8	0,9	4,0		
Outros		1,2	3,7	0,6	2,3	0,7	1,4	0,9	1,8	0,6	1,7	0,1	0,6	0,1	0,2

I.R. – Índice de Retenção; v – vestigial (<0,05%); * - Identificação baseada apenas no espectro de massa;

A fracção monoterpénica (tabela *Crithmum maritimum* em Cd) foi dominante em todos os óleos essenciais analisados (58-98%), sendo a percentagem relativa da fracção sesquiterpénica muito mais baixa (2-19%). Em todos os óleos isolados dos indivíduos de *C. maritimum* os hidrocarbonetos monoterpénicos foram os componentes em maior percentagem relativa (30-97%), seguidos pelos monoterpenos oxigenados (1-37%). Os restantes grupos de componentes apresentaram percentagens relativas muito baixas em todos os óleos isolados dos indivíduos de *C. maritimum*.

O γ -terpineno foi o componente detectado com maior percentagem relativa (16-86%) em todos os óleos essenciais analisados, seguido pelo *p*-cimeno (4-31%). No entanto, nos indivíduos TQR1

e TQR2 da ilha da Terceira o carvacrol foi o segundo componente maioritário (16-18%), seguido pelo timol (9%) e pelo *p*-cimeno (6-12%). Nos restantes óleos isolados dos indivíduos recolhidos na ilha da Terceira (TBI1 e TBI2) não foi observada uma elevada concentração relativa de timol (1-4%) e carvacrol (2-7%). Nos óleos isolados dos indivíduos recolhidos nas ilhas das Flores e do Pico a percentagem relativa em carvacrol (1-10%) foi semelhante à detectada nas amostras TBI1 e TBI2, enquanto que nos restantes óleos analisados a percentagem relativa deste composto foi mais muito mais baixa, não chegando aos 2%.

O dilapiole foi detectado a concentrações relativas muito baixas ($v-0,2\%$) nos indivíduos de São Jorge, não tendo sido detectado nos outros indivíduos das diferentes ilhas em estudo.

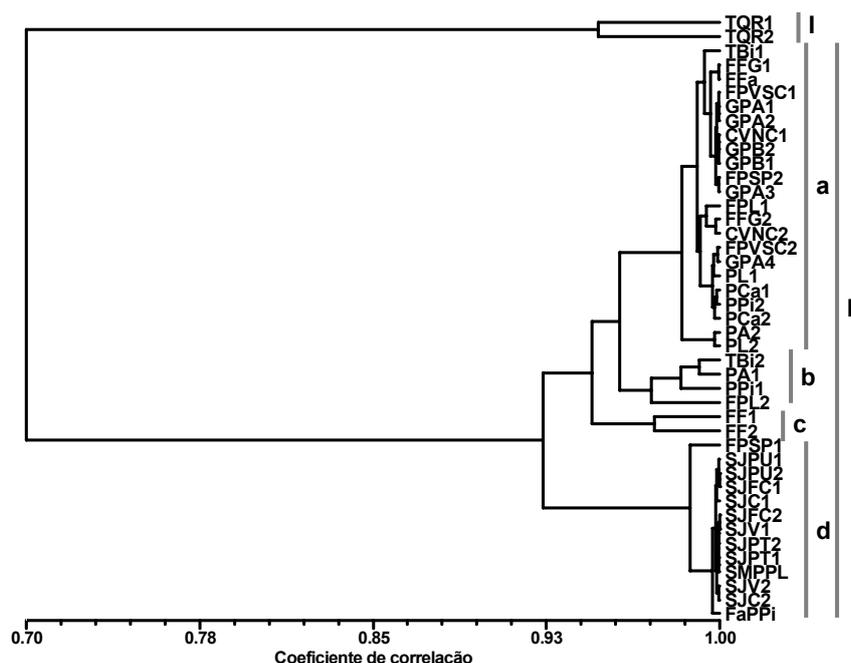


Fig. 3.4. Dendrograma obtido por análise de *clusters* da composição percentual dos óleos essenciais de 43 indivíduos de *Crithmum maritimum*, utilizando a associação média (UPGMA).

A análise de *clusters*, baseada na composição química dos óleos essenciais, agrupou os 43 indivíduos de *C. maritimum* em dois grupos distintos (fig. 3.4). Os indivíduos TQR1 e TQR2 formaram o *cluster* I, enquanto que os restantes indivíduos em estudo foram agrupados no *cluster* II. Os indivíduos destes dois agrupamentos apresentaram um coeficiente de correlação, entre si, superior a 0,70. Os indivíduos agrupados no *cluster* II apresentaram-se muito próximos a nível químico, pois o coeficiente de correlação existente entre estes indivíduos foi superior a 0,9. A separação dos indivíduos pelos dois agrupamentos deu-se em função dos componentes maioritários detectados nos diferentes óleos essenciais estudados, γ -terpineno e carvacrol.

Os indivíduos do *cluster* II foram separados em quatro sub-grupos. A separação dos indivíduos entre os sub-grupos a, b, c do sub-grupo d deveu-se à relação entre as percentagens relativas de *p*-cimeno e γ -terpineno.

Apesar de algumas variações quantitativas observadas na composição química dos óleos essenciais isolados dos indivíduos de *C. maritimum*, provavelmente resultantes do facto das plantas serem provenientes de localizações geográficas diferentes, estas variações não foram relevantes na separação dos diferentes indivíduos.

Na análise molecular dos 43 indivíduos de *C. maritimum* com os 22 primers seleccionados obteve-se no total 383 bandas (anexo C.2), entre os 300 e os 2800pb. Através dos padrões de bandas dos diferentes indivíduos em estudo, observados em gel de agarose, constatou-se que muitas bandas eram monomórficas, sendo rejeitados esses primers. O número de produtos de amplificação variou entre 10 (B01) e 33 (B08). Incluindo o controlo externo (*Ammi huntii*) nesta análise, foram obtidas 99% de bandas polimórficas e sem este indivíduo, o número de polimorfismos detectados foi de 94%.

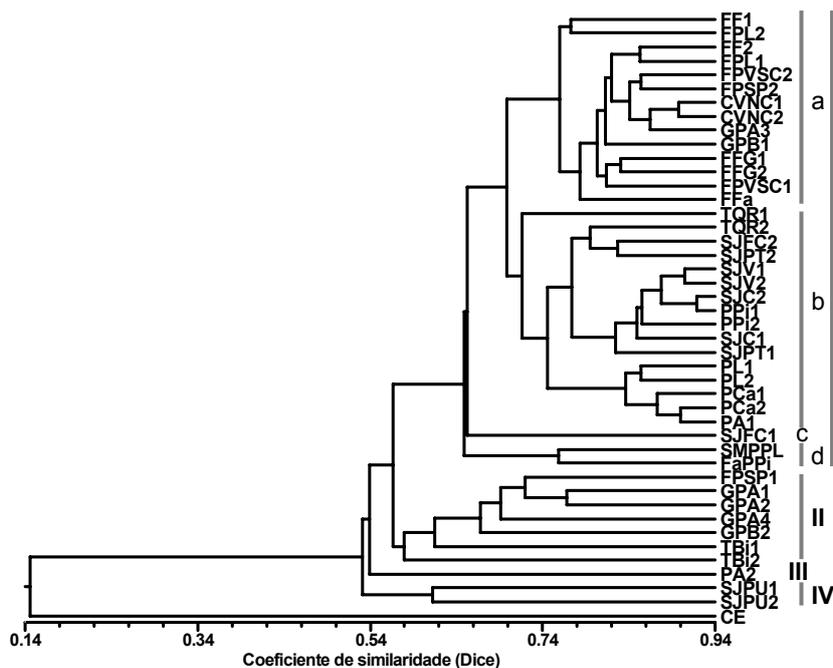


Fig. 3.5. Dendrograma obtido por análise de *clusters* baseada nos 22 primers, utilizando o coeficiente de similaridade Dice e da associação média (UPGMA) dos 43 indivíduos de *C. maritimum*.

A análise de *clusters* baseada na análise molecular por RAPDs agrupou os 43 indivíduos de *C. maritimum* em quatro grupos distintos (fig. 3.5), com um índice de similaridade superior a 0,5. Nesta análise os indivíduos TQR1 e TQR2 não foram agrupados num grupo à parte dos outros indivíduos, tal como observado na análise de *clusters* baseada na composição química dos óleos essenciais (fig. 3.4). Como referido anteriormente na análise química a análise de *clusters* baseada nos RAPDs também não permitiu a separação dos indivíduos de *C. maritimum* em função da sua origem geográfica, nem foi coincidente com os agrupamentos obtidos a partir da análise química dos óleos, obtendo-se um coeficiente de correlação de Pearson muito baixo ($r=0,09$; $p=0,00$) entre as duas análises.

3.3. *Ammi huntii*

Os óleos essenciais isolados das partes aéreas dos 14 indivíduos de *Ammi huntii* apresentaram uma coloração amarelada muito ténue e um odor muito forte. Neste estudo não foi determinado o rendimento dos óleos essenciais, mas num trabalho realizado no laboratório com indivíduos desta espécie o rendimento determinado foi de 0,08% (v/w) (dados não publicados).

No total das 14 amostras de óleo analisadas foram detectados 89 componentes, resultando numa percentagem de identificação superior a 84% em todos os óleos analisados. Foram também detectados dois componentes nos óleos isolados dos indivíduos recolhidos em São Miguel e São Jorge cuja identificação não foi possível (fig.3.6). Os componentes maioritários identificados, e a sua variação em termos da percentagem relativa máxima e mínima nos óleos isolados dos vários indivíduos colhidos por ilha, encontram-se na tabela 3.3, onde os componentes estão listados em função da sua ordem de eluição na coluna DB-1.

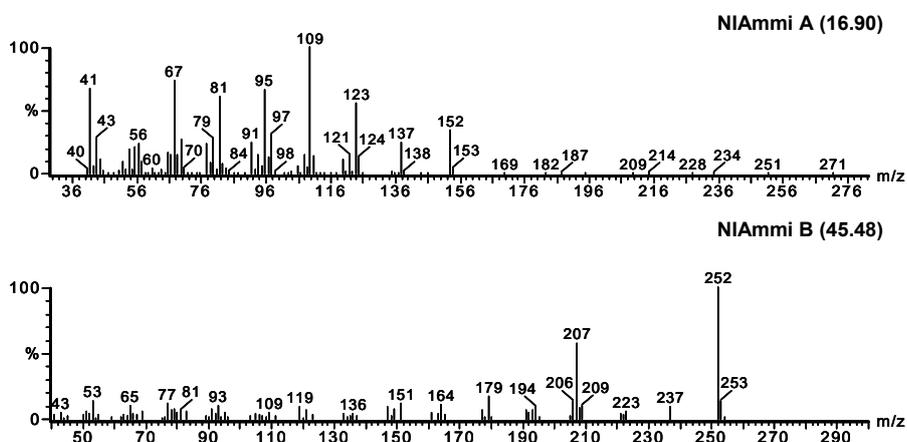


Fig. 3.6. Espectros de massa de dois componentes não identificados, NIAmmi A e NIAmmi B, presentes nos óleos essenciais isolados das amostras de *Ammi huntii* de São Miguel e São Jorge, respectivamente.

Foram detectados dois componentes, um nos óleos essenciais isolados dos indivíduos recolhidos na ilha de São Miguel (SMPLC1 e SMPLC2), NIAmmiA, e outro nos óleos essenciais isolados dos indivíduos de São Jorge, NIAmmiB, cuja identificação não foi ainda possível (fig. 3.6).

Nos óleos essenciais isolados dos indivíduos recolhidos em São Miguel a fracção dominante foi a terpénica (23-62%) ou a dos fenilpropanóides (32-74%). Nos óleos isolados dos indivíduos SMPLC1, SMPLC2, SMLR1, SMLR2 e SMLR3 a fracção dominante foi a dos fenilpropanóides (53-74%), enquanto que a terpénica foi mais baixa (23-41%), (tabela *Ammi huntii* em Cd). Nestes óleos essenciais os hidrocarbonetos sesquiterpénicos foram o grupo de componentes com maior representatividade (21-30%), enquanto que os sesquiterpenos oxigenados foram detectados em percentagens relativas vestigiais. A fracção monoterpénica (2-11%) apresentou menor percentagem relativa que a fracção a sesquiterpénica. Nos óleos essenciais isolados dos indivíduos SMLH1, SMLH2 e SMLH3 a fracção terpénica foi dominante (48-62%), enquanto que a percentagem relativa de fenilpropanóides foi mais baixa (30-39%). O grupo dos hidrocarbonetos monoterpénicos foi detectado em maior percentagem relativa nos óleos essenciais dos indivíduos SMLH1, SMLH2 e SMLH3 (42-58%), enquanto que os monoterpenos oxigenados apresentaram teores mais baixos (1-2%).

Tabela 3.3. Composição percentual dos componentes dominantes ($\geq 1,5\%$ em pelo menos uma das amostras) dos óleos essenciais isolados das partes aéreas dos diferentes indivíduos de *Ammi huntii*, colhidos, durante a fase de floração, em diferentes locais nas ilhas de São Miguel, São Jorge e Flores (Açores). Os valores representam o intervalo máximo (Máx) e mínimo (Min) de variação para cada componente.

Componentes	I.R.	São Miguel		São Jorge		Flores	
		Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx
Sabineno	958	0,1	0,8	1,4	2,6	0,2	0,3
β-Pineno	963	0,1	1,8	0,3	0,6	3,1	6,7
β-Mirceno	975	0,1	0,7	6,4	11,6	21,6	37,7
<i>p</i> -Cimeno	1003	v	0,4	2,3	5,6	0,2	0,8
β-Felandreno	1005	v	0,9	2,1	3,7	7,8	9,8
Limoneno	1009	0,3	4,3	5,8	12,5	5,1	8,3
<i>cis</i>-β-Ocimeno	1017	0,1	14,3	v	0,1		0,1
γ -Terpineno	1035	v	0,3	1,9	4,1	0,2	0,7
Terpinoleno	1064	0,3	33,4	0,7	1,9	0,1	0,7
NIAmiA	1097	1,3	2,4				
<i>p</i> -Cimeno-8-ol	1148		1,7				
Acetato de octanol	1187	3,0	4,6				
<i>trans</i>-β-Cariofileno	1414		1,1	0,3	1,0	v	11,4
Aromadendreno	1428			0,1	1,9		0,3
<i>trans</i>-α-Bergamoteno	1434	0,2	25,3				
Germacreno-D	1474		2,6	v	0,4		0,1
γ -Guaieño*	1494			v	3,7		3,2
β -Bisaboleno	1495	0,4	1,5	0,2	3,6	0,3	0,4
γ -Cadineno	1500			0,2	3,6		v
Germacreno-B*	1533			2,5	6,9		1,1
Óxido de cariofileno	1561						2,6
<i>trans</i>-Isomiristicina	1574			18,1	48,9	2,6	29,2
Dilapiole	1587	29,8	73,5				
Isodilapiole*	1665			0,7	6,2		
NIAmiB	1778			1,0	4,2		
Éster tiglico do <i>cis-trans</i>-farnesol	2023					1,5	21,1
% Identificação		90,3	97,5	84,1	91,1	85,6	93,1
Componentes agrupados							
Hidrocarbonetos monoterpénicos		2,4	57,6	22	40,3	37,3	64,6
Monoterpenos oxigenados		v	6,9	0,5	1,3	1,2	1,7
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos		2,8	30,1	8,1	14,5	4,9	13,1
Sesquiterpenos oxigenados				0,4	0,7	0,6	22,1
Fenilpropanóides		29,8	73,5	23,2	55,5	2,6	38,7
Poliacetilenos		v	1,1			v	1,8
Ácidos gordos			0,1				0,3
Outros		0,7	2,7	0,7	3,0	1,9	4,4

I.R. – Índice de Retenção; v – vestigial (<0,05%); * - Identificação baseada apenas no espectro de massa;

Quanto à fracção sesquiterpénica (3-4%) esta foi detectada em percentagens relativas muito mais baixa do que a observada nos óleos isolados dos outros indivíduos de São Miguel. Nos óleos essenciais isolados dos indivíduos recolhidos em São Jorge a fracção terpénica (34-57%) foi semelhante à fracção dos fenilpropanóides (23-56%). O grupo dos hidrocarbonetos monoterpénicos (22-40%) foi o grupo terpénico com maior representatividade nos óleos essenciais destes indivíduos, seguido pelos hidrocarbonetos sesquiterpénicos (8-15%). Já nos óleos

essenciais isolados dos indivíduos recolhidos na ilha das Flores a fracção monoterpénica foi a dominante (40-66%), a fracção sesquiterpénica (13-33%) foi semelhante à fracção dos fenilpropanóides (3-30%), mas estas demonstraram ser inversamente proporcionais.

Os componentes maioritários detectados nos óleos essenciais isolados dos indivíduos de São Miguel foram o dilapiole (30-74%), o terpinoleno (0-33%), o *trans*- α -bergamoteno (0-25%) e o *cis*- β -ocimeno (0-14%). Nos óleos isolados dos indivíduos SMPLC1, SMPLC2, SMLR1, SMLR2 e SMLR3, o dilapiole foi o componente com maior percentagem relativa (53-74%) e o segundo componente maioritário foi o *trans*- α -bergamoteno (18-25%). Já nos óleos isolados dos indivíduos SMLH1, SMLH2 e SMLH3 a percentagem relativa de terpinoleno (25-33%) e de dilapiole (30-39%) foram semelhantes, sendo estes os componentes maioritários dos óleos essenciais. Nestas amostras de óleo o *cis*- β -ocimeno (8-14%) foi detectado com percentagens relativas superiores às observadas nos outros óleos dos restantes indivíduos de São Miguel.

Nos óleos isolados dos indivíduos recolhidos na ilha de São Miguel não foi detectada a *trans*-isomiristicina, um componente maioritário dos óleos dos indivíduos de São Jorge e Flores, nem o éster tíglico do *cis-trans*-farnesol, um componente maioritário dos óleos dos indivíduos das Flores

Os componentes maioritários observados nos óleos essenciais isolados dos indivíduos recolhidos nas ilhas de São Jorge e das Flores foram a *trans*-isomiristicina (3-49%), o β -mirceno (6-38%) e o limoneno (5-13%). Nas amostras de óleo isoladas dos indivíduos das Flores foi ainda detectada uma elevada percentagem relativa de β -felandreno (8-10%), *trans*- β -cariofileno (v-11%) e de éster tíglico do *cis-trans*-farnesol (2-21%). Nestes óleos essenciais não foi detectado o dilapiole, nem o *trans*- α -bergamoteno, dois componentes maioritários dos óleos essenciais isolados dos indivíduos de São Miguel e as percentagens relativas de terpinoleno e de *cis*- β -ocimeno foram muito baixas, <1%. Nos óleos isolados dos indivíduos de São Jorge não foi detectado o éster tíglico do *cis-trans*-farnesol, um componente com elevada percentagem relativa nos óleos essenciais isolados dos indivíduos das Flores.

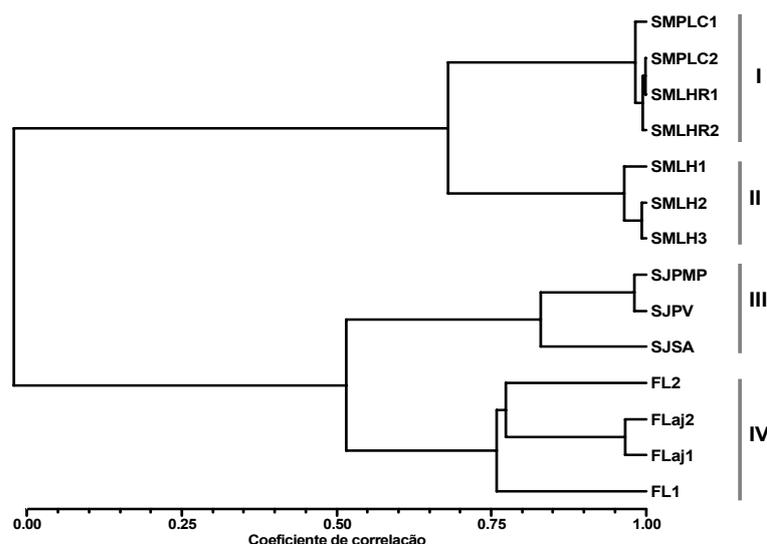


Fig. 3.7. Dendrograma obtido por análise de *clusters* da composição percentual dos óleos essenciais de 14 indivíduos de *Ammi huntii*, utilizando a associação média (UPGMA).

A análise de *clusters* baseada na composição química dos óleos essenciais agrupou os 14 indivíduos de *A. huntii* em quatro grupos distintos (fig. 3.7). Não foi detectada correlação entre os indivíduos de São Miguel (*clusters* I e II) e os indivíduos de São Jorge e Flores (*clusters* III e IV). Esta ausência de correlação química entre os indivíduos das diferentes ilhas deve-se às elevadas percentagens relativas de dilapiole e de *trans*-isomiristicina detectadas nos óleos isolados dos diferentes indivíduos em estudo.

Entre os indivíduos de São Miguel a correlação observada foi superior a 0,65. Os indivíduos de São Miguel foram agrupados nos dois grupos (I e II) em função do seu local de colheita, pois como observado no dendrograma da fig. 3.7, os indivíduos da Lomba dos Homens 330m, SMLR1 e SMLR2, foram agrupados juntamente com os indivíduos do Parque Lagoa do Canário, SMPLC1 e SMPLC2, com um elevado índice de correlação (*cluster* I). Os restantes indivíduos da Lomba dos Homens foram agrupados no *cluster* II.

Os indivíduos de São Jorge e Flores (*clusters* III e IV) apresentaram um coeficiente de correlação superior a 0,5 e sua separação ocorreu devido ao teor em *trans*-isomiristicina e β -mirceno nos óleos. Os indivíduos de São Jorge apresentaram uma boa correlação entre si, bem como os indivíduos das Flores (correlação superior a 0,8 em ambos os casos).

Os agrupamentos formados pelos 14 indivíduos de *A. huntii* reflectem a sua localização geográfica. Foi detectado um elevado polimorfismo químico nas amostras de óleo analisadas e na análise de *clusters* houve uma clara separação entre os indivíduos de São Miguel e os indivíduos de São Jorge e das Flores, como tal pode-se estar na presença de quimiotipos diferentes, dilapiole/terpinoleno/*trans*- α -bergamoteno e *trans*-isomiristicina/limoneno/ β -mirceno.

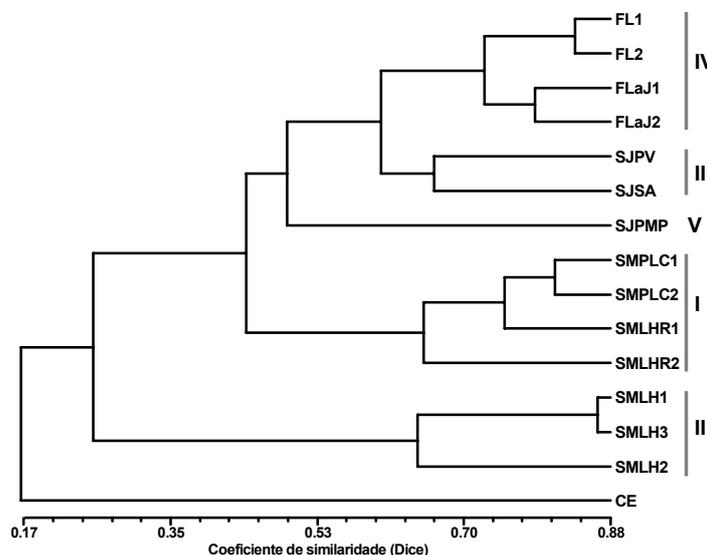


Fig. 3.8. Dendrograma obtido por análise de *clusters* baseada nos 16 *primers*, utilizando o coeficiente de similaridade Dice e da associação média (UPGMA) dos 14 indivíduos de *Ammi huntii*.

Na análise molecular dos 14 indivíduos de *A. huntii* com os 16 *primers* seleccionados obteve-se no total 255 bandas (anexo C.3) com dimensões entre os 300 e os 2800pb. O número de produtos de amplificação variou entre 7 com o *primer* B10 e 25 com o *primer* A13. O número de polimorfismos detectados foi de 99% tendo em conta o número de bandas polimórficas geradas quando se inclui o controlo externo (*Chaerophyllum azoricum*); sem este detectaram-se 90% de

bandas polimórficas.

A análise de *clusters* baseada na análise molecular (RAPDs) agrupou os diferentes indivíduos de *Ammi huntii* em quatro grupos (fig. 3.8). Tal como observado na análise química os indivíduos foram agrupados em função da sua origem geográfica, havendo uma clara separação por ilhas. O coeficiente de similaridade entre os indivíduos em estudo foi de 0,25.

Os indivíduos recolhidos em São Miguel, também ficaram separados em dois grupos distintos (I e II) corroborando os resultados obtidos com os óleos essenciais.

A correlação (coeficiente de Pearson) entre as distâncias obtidas pelos dois métodos de análise (composição química, fig. 3.7 e RAPDs, fig. 3.8) foi de 0,63 ($p \approx 0,00$), revelando que as duas análises apresentam entre si uma relação moderada.

3.4. *Angelica lignescens* e *Melanoselinum decipiens*

Os óleos essenciais isolados das partes aéreas das 14 amostras de *Angelica lignescens* e das 3 amostras de *Melanoselinum decipiens* apresentaram um odor muito forte. Para este estudo não foi determinado o rendimento dos óleos essenciais dos diferentes indivíduos, no entanto em estudos prévios este foi determinado sendo de 0,2% (v/w) (Silva *et al* 1998).

No total das 17 amostras de óleo essencial isoladas dos diferentes indivíduos em estudo foram detectados 116 componentes, resultando numa percentagem de identificação entre os 78-99% em todos os óleos analisados. Foram também detectados quatro componentes nos óleos isolados dos indivíduos colhidos em São Miguel cuja identificação não foi ainda possível (fig. 3.9). Os componentes maioritários identificados, e a sua variação em termos da percentagem relativa máxima e mínima nos óleos isolados dos vários indivíduos colhidos por ilha, encontram-se na tabela 3.4, onde os componentes estão listados em função da sua ordem de eluição na coluna DB-1.

Dos indivíduos de São Miguel o óleo essencial foi isolado de diferentes órgãos das plantas, folhas (SMPLC1 e SMPLC2) e flores (SMPLC1.f e SMPLC2.f), verificando-se a existência de um elevado teor de α -pineno (34-37%), limoneno (25-28%) e um teor inferior de NIAngC (16-18%) nos óleos essenciais isolados das partes florais. Este componente não identificado apenas foi detectado nas amostras de óleo isoladas dos indivíduos de São Miguel e da Terceira, no entanto, apenas nas flores é que foi detectado em percentagens relativas elevadas. Nos óleos isolados a partir de partes vegetativas dos indivíduos recolhidos em São Miguel e Terceira, este componente foi detectado em percentagens relativas entre 1-3%.

Nos óleos essenciais isolados da parte vegetativa dos indivíduos recolhidos em São Miguel, SMPLC1 e SMPLC2, o componente dominante foi o limoneno (59-61%), seguido pelo β -mirreno (5-8%). Contrariamente ao observado nos óleos isolados das partes florais dos indivíduos de São Miguel, o α -pineno foi detectado nas amostras das partes vegetativas em percentagens relativas muito baixas (1-2%).

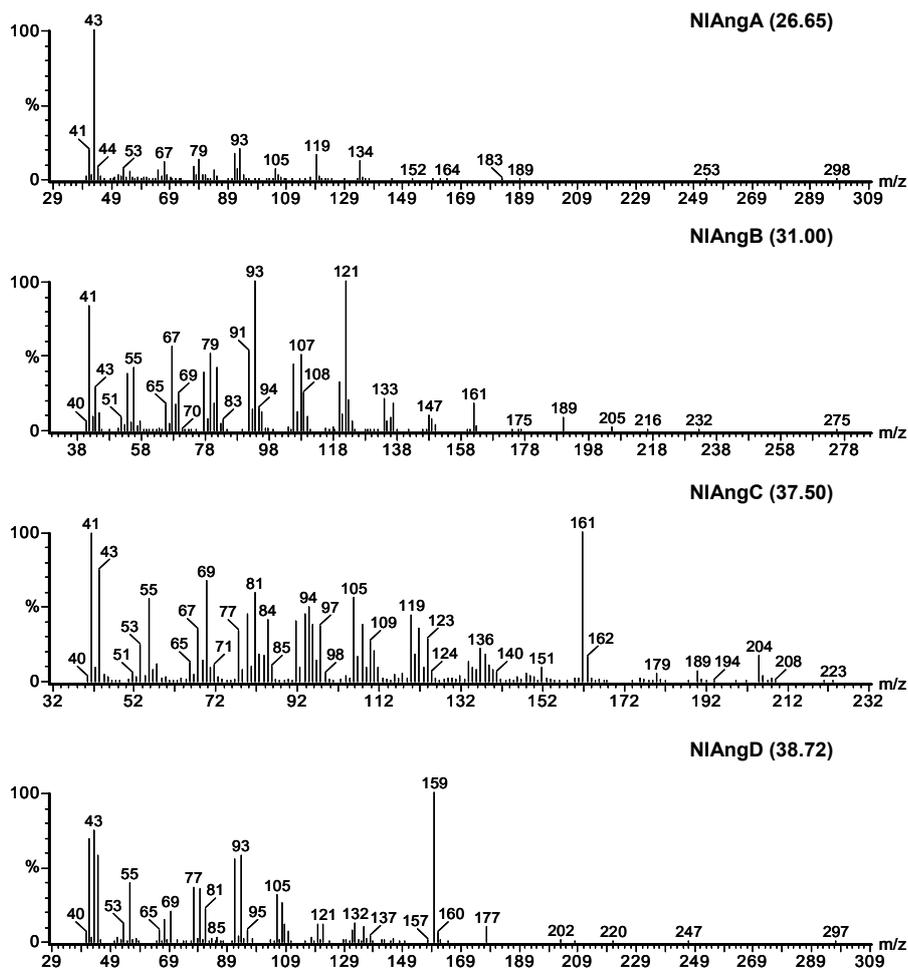


Fig. 3.9. Espectros de massa de quatro componentes não identificados, NIAngA, NIAngB, NIAngC e NIAngD, detectados nos óleos essenciais isolados das amostras de *Angelica lignescens*.

Nas amostras de óleos essenciais isolados dos indivíduos recolhidos nas ilhas das Flores, Pico e Terceira o componente maioritário foi o limoneno (57-86%). Nestes óleos foi ainda detectada uma elevada percentagem relativa de β -mirceno (10-16%). Os óleos essenciais isolados dos indivíduos FP2 e FTC1, recolhidos na ilha da Terceira apresentaram percentagens relativas de β -felandreno (19%) elevadas, face aos restantes óleos em estudo dos indivíduos de *Angelica lignescens* (v-1%). Nestas amostras de óleo o β -pineno foi detectado com teores muito baixos (0-1%).

Nos óleos isolados dos três indivíduos de *Melanoselinum decipiens* o componente maioritário foi o β -pineno (38-47%), seguido pelo o sabineno (1-33%) e pelo acetato de bornilo (12-23%). Nestas amostras de óleo o limoneno foi detectado em percentagens relativas muito baixas (1-3%).

Tabela 3.4. Composição percentual dos componentes dominantes ($\geq 1,5\%$ em pelo menos uma das amostras) dos óleos essenciais isolados das partes aéreas dos diferentes indivíduos de *Angelica lignescens* e *Melanoselinum decipiens* colhidos, durante a fase de floração, em diferentes locais nas ilhas de São Miguel, Flores, Terceira e Pico (Açores) e na ilha da Madeira, respectivamente. Os valores representam o intervalo máximo (Máx) e mínimo (Min) de variação para cada componente.

Componentes	I.R.	São Miguel		Flores		Terceira		Pico		Madeira	
		Min	Máx								
α-Pineno	930	1,4	36,5	0,1	0,7	1,3	2,8	0,7	2,0	1,3	2,0
Canfeno	938	0,2	4,2	v	v	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	1,2
Sabineno	958	0,2	0,6	0,1	1,0	2,4	3,3	0,2	1,7	0,7	33,0
β-Pineno	963	0,3	1,4	0,1	0,4	0,6	0,9	0,3	0,9	38,3	46,5
β-Mirceno	975	4,5	8,4	10,3	15,7	3,5	5,5	1,3	8,0	1,7	3,9
<i>p</i> -Cimeno	1003	v	0,2	0,6	4,0	4,4	6,4	1,2	5,8	0,3	1,3
β-Felandreno	1005	0,2	0,3	0,3	19,4	0,4	0,5	v	0,6	0,2	0,3
Limoneno	1009	24,7	61,0	57,6	71,0	58,1	64,9	56,6	85,5	0,6	2,7
γ -Terpineno	1035	0,1	0,3	0,2	1,1	3,6	5,8	0,8	5,8	0,8	1,9
<i>meta</i> -Cresol	1048			0,7	1,6						
Terpineno-4-ol	1148		0,2			0,8	1,8	0,1	1,8	0,2	4,0
Acetato de bornilo	1265										23,2
α -Copaeno*	1375										1,7
Germacreno-D	1474	0,2	0,8	0,5	2,3	v	1,1		0,4		1,2
Germacreno-B*	1533	0,5	4,0	0,6	1,2	2,6	5,0		1,7		
NIAngC	1568	2,6	17,9			v	1,2				
NIAngD	1595	0,5	3,1								
% Identificação		77,3	83,8	95,6	97,2	91,3	98,9	94,6	97,9	94,6	95,6
Componentes agrupados											
Hidrocarbonetos monoterpénicos		67,9	75,4	84,1	91,2	77,0	91,4	83,2	90,1	60,1	83,6
Monoterpenos oxigenados		0,4	1,3	0,4	1,2	2,8	3,8	1,5	4,9	7,6	28,9
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos		1,4	7,4	2,1	6,4	2,9	8,6	0,7	3,8	3,7	5,4
Sesquiterpenos oxigenados		1,1	4,0	0,6	1,1	0,2	1,5	2,5	3,8	0,3	0,7
Outros		0,4	1,4	1,4	3,4	1,0	1,7	1,1	2,0	v	0,3

I.R. – Índice de Retenção; v – vestigial (<0,05%); * - Identificação baseada apenas no espectro de massa;

A análise de *clusters* baseada da composição química dos óleos essenciais agrupou os diferentes indivíduos em dois grupos distintos, o *cluster* I foi composto pelos indivíduos de *A. lignescens* e o *cluster* II foi composto pelos indivíduos de *M. decipiens* (fig. 3.10). As duas espécies em análise apresentaram uma correlação praticamente nula entre si, estando muito afastadas a nível químico. Os indivíduos de *M. decipiens*, agrupados no grupo II apresentaram uma boa correlação entre si, superior a 0,75. Já os indivíduos de *A. lignescens* (*cluster* II) apresentaram um coeficiente de correlação superior a 0,5 se incluirmos a análise os óleos essenciais isolados das peças florais, aumentando para 0,9 considerando apenas os óleos isolados das partes vegetativas. A separação dos indivíduos nos subgrupos a, b, c deveu-se ao teor em limoneno, α -pineno e β -felandreno detectados nas amostras.

Nos indivíduos de *A. lignescens*, a composição química dos óleos essenciais foi muito semelhante, independentemente da proveniência do material.

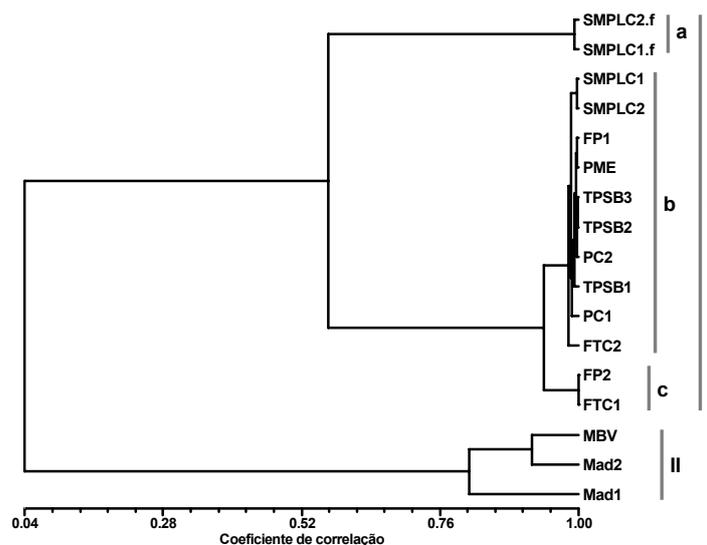


Fig. 3.10. Dendrograma obtido por análise de *clusters* da composição percentual dos óleos essenciais de 14 amostras de *Angelica lignescens* e 3 amostras de *Melanoselinum decipiens*, utilizando a associação média (UPGMA).

Na análise molecular dos 12 indivíduos de *A. lignescens* e dos 3 indivíduos de *M. decipiens* com os 16 primers seleccionados obteve-se no total 314 bandas (anexo C.4) com dimensões compreendidas entre os 300 e os 2800pb. O número de produtos de amplificação variou entre 9 com primer A10 e 30 com o primer A13.

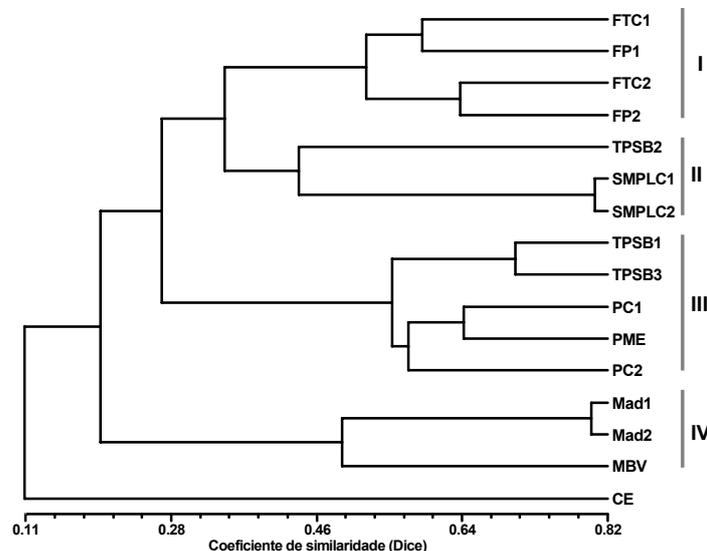


Fig. 3.11. Dendrograma obtido por análise de *clusters* baseada nos 16 *primers*, utilizando o coeficiente de similaridade Dice e da associação média (UPGMA) dos 12 indivíduos de *A. lignescens* e dos 3 indivíduos de *M. decipiens*.

O número de polimorfismos detectados foi de 100% utilizando as bandas adicionadas pelo controlo externo (*Chaerophyllum azoricum*); sem esta planta foram detectadas cerca de 90% de bandas polimórficas. A análise de *clusters* baseada nos marcadores moleculares agrupou os

diferentes indivíduos em quatro *clusters* (fig. 3.11). As duas espécies utilizadas neste estudo não se apresentaram relacionadas, pois o índice de similaridade entre estas foi inferior a 0,2. Os indivíduos de *M. decipiens* (grupo IV) apresentaram entre si um índice de similaridade superior a 0,5.

Os indivíduos de *A. lignescens* foram agrupados nos *clusters* I, II e III. A organização dos diferentes indivíduos pelos grupos coincidiu com a localização geográfica dos mesmos, excepto para os indivíduos da Terceira que não foram todos agrupados no mesmo *cluster*. Comparando os grupos formados pela análise de *clusters* baseada na composição química (fig. 3.10) e pela análise baseadas nos dados de RAPDs (fig. 3.11) pode-se observar que os grupos formados em ambos os casos não foram organizados da mesma forma. No entanto, a correlação (coeficiente de Pearson) entre as distâncias obtidas pelos dois métodos de análise foi de 0,51 ($p \approx 0,00$).

3.5. *Chaerophyllum azoricum*

Os óleos essenciais isolados das partes aéreas de 7 indivíduos de *Chaerophyllum azoricum* apresentaram um odor muito forte. Neste estudo não foi determinado o rendimento dos óleos essenciais, mas num trabalho anterior com esta espécie o rendimento dos óleos foi de 0,1-0,5% (v/w) (Pedro *et al* 1999).

Nas 7 amostras de óleo isoladas foram detectados 53 componentes, resultando numa percentagem de identificação entre os 91-99% em todos os óleos analisados. Os componentes maioritários identificados e as suas percentagens relativas nos óleos dos diferentes indivíduos de São Jorge encontram-se na tabela 3.5, onde os componentes estão listados em função da sua eluição na coluna DB-1.

A fracção monoterpénica foi dominante em todos os óleos analisados (49-91%) e a fracção sesquiterpénica apresentou valores semelhantes à fracção dos fenilpropanóides (4-17% e 4-23%, respectivamente). Os hidrocarbonetos monoterpénicos foram o grupo monoterpénico com maior relevância nestas amostras de óleos (44-91%), enquanto que os monoterpénos oxigenados foram detectados nestas amostras em menor quantidade relativa (0-7%). Da fracção sesquiterpénica o grupo com maior percentagem relativa foi o dos hidrocarbonetos sesquiterpénicos (4-17%).

A análise de *clusters* baseada na composição química dos óleos essenciais agrupou os diferentes indivíduos de *C. azoricum* em dois *clusters* (fig. 3.12). Através desta análise constatou-se que os indivíduos de São Jorge eram muito próximos a nível químico, pois o índice de correlação foi superior a 0,75. Os indivíduos SJPMP, SJSA1 e SJSA2 foram agrupados no *cluster* I, enquanto que todos os indivíduos SJSA3, SJSA4, SJSA5 e SJSA6 foram agrupados no *cluster* II. A separação dos indivíduos em diferentes grupos deveu-se ao teor de terpinoleno detectado nos óleos.

Tabela 3.5. Composição percentual dos componentes dominantes ($\geq 1,5\%$ em pelo menos uma das amostras) dos óleos essenciais isolados das partes aéreas dos diferentes indivíduos de *Chaerophyllum azoricum* colhidos, durante a fase de floração, em diferentes locais na ilha de São Jorge.

Componentes	I.R.	São Jorge						
		SJPMP	SJSA1	SJSA2	SJSA3	SJSA4	SJSA5	SJSA6
<i>p</i> -Cimeno	1003	7,4	6,1	5,5	0,5	0,6	0,5	1,0
Limoneno	1009	9,4	7,1	11,7	2,9	2,8	3,3	2,9
γ-Terpineno	1035	5,5	5,0	5,4	14,2	13,4	15,1	15,9
Terpinoleno	1064	28,1	22,1	20,0	62,8	59,0	67,3	60,6
<i>p</i> -Cimeno-8-ol	1148	4,2	3,7	3,3	0,2	0,2	0,1	0,2
<i>trans</i> - β -Cariofileno	1414	2,0	1,3	2,5	1,2	1,0	1,0	0,9
<i>ar</i> -Curcumeno	1475	2,4	1,8	1,8	0,1	v	0,1	0,1
α-Zingibereno	1492	5,8	11,7	9,9	3,4	4,7	2,0	3,8
Miristicina	1493	11,6	23,4	19,8	6,7	9,5	3,9	7,6
β -Sesquifelandreno	1508	1,9	0,8	1,6	0,6	0,6	0,3	0,5
Ácido palmítico	1908	1,8	1,0	1,3	v	v	0,1	0,2
% Identificação		91,3	91,0	92,0	98,9	98,5	99,2	99,3

Componentes agrupados

Hidrocarbonetos monoterpénicos	57,2	43,9	48,0	85,2	80,3	90,7	85,1
Monoterpenos oxigenados	6,7	5,6	4,7	0,7	0,4	0,4	0,5
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	12,8	16,4	16,9	5,8	7,1	3,7	5,5
Sesquiterpenos oxigenados				v	0,9	v	v
Fenilpropanóides	11,6	23,4	19,8	6,7	9,5	3,9	7,6
Ácidos gordos	1,8	1,0	1,3	v	v	0,1	0,2
Outros	1,2	0,7	1,3	0,5	0,3	0,4	0,4

I.R. – Índice de Retenção; v – vestigial (<0,05%); * - Identificação baseada apenas no espectro de massa;

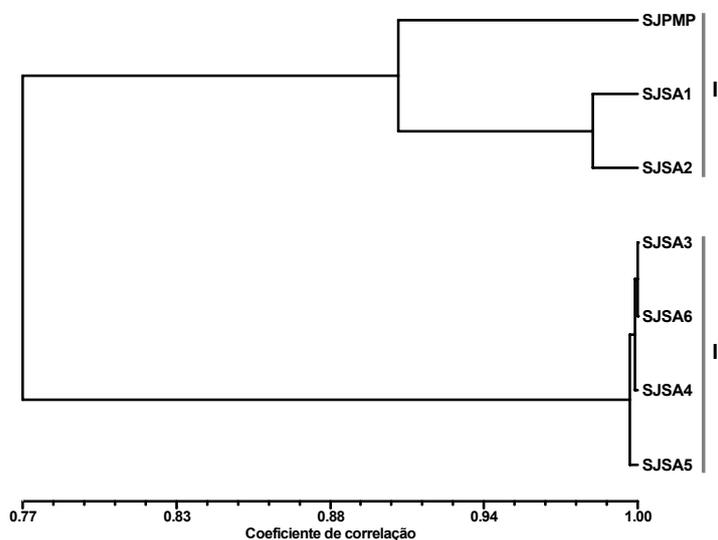


Fig. 3.12. Dendrograma obtido por análise de *clusters* da composição química percentual dos óleos essenciais de 7 indivíduos de *Chaerophyllum azoricum* recolhidos na ilha de São Jorge, utilizando a associação média (UPGMA).

Embora os indivíduos SJSA3, SJSA4, SJSA5 e SJSA6 tenham sido recolhidos a altitudes diferentes (700m e 560m), estes não apresentaram diferenças acentuadas na sua composição química dos óleos essenciais.

Na análise molecular dos 7 indivíduos de *Chaerophyllum azoricum* com os 23 primers seleccionados obteve-se no total 332 bandas (anexo C.5) com dimensões compreendidas entre os 300 e os 2800pb. O número de produtos de amplificação variou entre 5 no primer B15 e 32 no primer B07. O número de polimorfismos detectados foi de 97% quando se inclui o controlo externo (*Ammi huntii*); sem esta planta detectou-se 88% de bandas polimórficas.

A análise de *clusters* baseada nos marcadores moleculares (RAPDs) agrupou os diferentes indivíduos de *C. azoricum* em dois *clusters* (fig. 3.13). Os indivíduos em estudo apresentaram um coeficiente de similaridade superior a 0,5. Os indivíduos SJSA3, SJSA4, SJSA5 e SJSA6 foram agrupados no *cluster* I juntamente com o indivíduo SJPMP, no entanto este indivíduo foi agrupado num sub-grupo diferente (sub-grupo a) dos restantes indivíduos deste grupo.

Os indivíduos SJSA1 e SJSA2 foram agrupados no *cluster* II apresentando um coeficiente de similaridade entre si próximo dos 0,6.

Tal como observado na análise de *clusters* baseada na composição química dos óleos essenciais, os indivíduos de Santo António foram agrupados em *clusters* diferentes independentemente da altitude a que as amostras foram recolhidas.

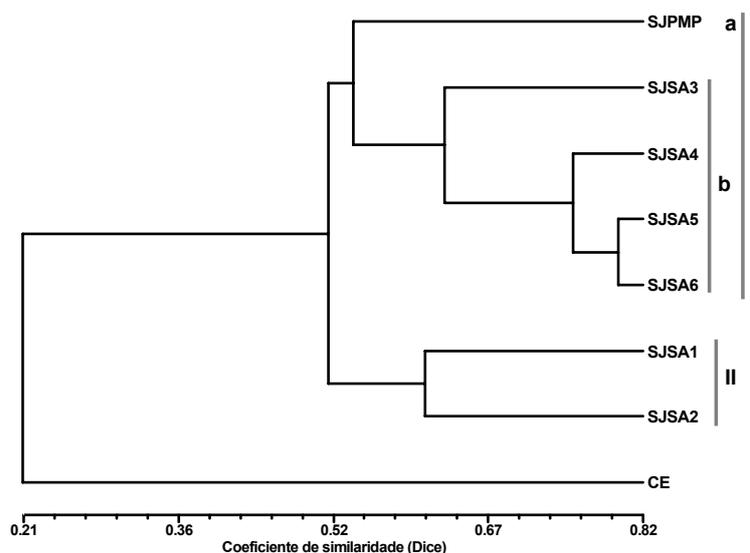


Fig. 3.13. Dendrograma obtido por análise de *clusters* baseada nos 23 *primers*, utilizando o coeficiente de similaridade Dice e da associação média (UPGMA) dos 7 indivíduos de *Chaerophyllum azoricum*.

Comparando os grupos formados pela análise de *clusters* baseada na composição química (fig. 3.12) e pela análise baseadas nos dados de RAPDs (fig. 3.13) pode-se observar que estes não foram organizados da mesma forma. No entanto, a correlação baseada no coeficiente de Pearson, entre as distâncias obtidas pelos dois métodos de análise foi de 0,56 ($p \approx 0,00$).

4. Discussão

4.1. Análise dos óleos essenciais

Nos óleos essenciais isolados dos diferentes indivíduos de *T. caespititius* foi detectada a presença de dois quimiotipos distintos, carvacrol e α -terpineol, sendo o primeiro detectado nos óleos isolados dos indivíduos colhidos em São Miguel e no Faial e o segundo detectado no óleo do indivíduo colhido na ilha da Madeira. Estes dados corroboram dados anteriores obtidos a partir de populações de *T. caespititius* colhidas nas ilhas de São Miguel, Corvo e Flores, em que o carvacrol foi o componente dominante (Santos *et al* 2005), e na ilha da Madeira e em Portugal continental, em que o α -terpineol foi o componente dominante (Salgueiro *et al* 1997, Santos *et al* 2005). O α -terpineol foi também o componente maioritário em algumas populações das ilhas de São Jorge (Pereira *et al* 2000) e da ilha da Graciosa (Pereira *et al* 2003).

A análise de *clusters*, baseada na composição química dos óleos essenciais, reflectiu os dois grandes grupos de óleos e agrupou os indivíduos de *T. caespititius* em dois *clusters* distintos, com uma correlação muito baixa entre estes. Em estudos anteriores, populações de *T. caespititius* dos Açores e da Madeira foram separados também em *clusters* diferentes, com base nos perfis dos componentes voláteis (Santos *et al* 2005).

Nos óleos essenciais dos diferentes indivíduos de *C. maritimum* o γ -terpineno foi o componente maioritário, seguido pelo *p*-cimeno. No entanto, nos óleos isolados a partir dos indivíduos TQR1 e TQR2 o carvacrol apresentou concentrações semelhantes ao γ -terpineno. Em estudos prévios com populações de *C. maritimum* colhidas em diferentes ilhas do arquipélago dos Açores verificou-se que o γ -terpineno e o *p*-cimeno eram os componentes maioritários dos óleos essenciais, estando de acordo com os dados do presente estudo (Santos *et al* 2002).

Uma vez que o γ -terpineno e o *p*-cimeno estão envolvidos nas vias biossintéticas do timol, carvacrol e derivados, estes são detectados em baixas percentagens relativas em óleos com elevado teor em carvacrol e timol (Senatore *et al* 2000), como observado no caso dos óleos dos indivíduos TQR1 e TQR2.

Tal como observado nos indivíduos de *T. caespititius* colhidos em São Miguel e Faial, os diferentes indivíduos de *C. maritimum* apresentaram uma boa correlação, em termos da composição do seu óleo essencial, superior a 0,7.

Nos óleos essenciais de *Ammi huntii* os componentes maioritários detectados foram o dilapiole nas amostras de óleo isoladas a partir dos indivíduos de São Miguel e a *trans*-isomiristicina nas amostras isoladas a partir dos indivíduos recolhidos em São Jorge e nas Flores, sugerindo a existência de dois quimiotipos diferentes: dilapiole/terpinoleno/*trans*- α -bergamoteno e *trans*-isomiristicina/limoneno/ β -mirceno.

Este trabalho constitui uma primeira abordagem à composição do óleo essencial de *A. huntii*, ainda que já tenha sido realizada a análise química dos extractos desta planta (Antunes *et al* 1997).

Reflectindo a diferente composição dos óleos essenciais analisados, os indivíduos de *A. huntii*

foram agrupados em dois grupos distintos, não apresentando correlação entre si. No entanto, dado que o número de indivíduos estudados foi reduzido são necessários mais estudos para confirmar a existência ou não dos dois quimiotipos acima propostos.

Na análise da composição química dos óleos essenciais isolados dos indivíduos de *Angelica lignescens* e de *M. decipiens* foi observado que o limoneno e o β -pineno eram os componentes maioritários dos óleos, respectivamente. Nos óleos isolados das partes florais dos indivíduos de São Miguel foi observado que o α -pineno era o componente maioritário, seguido pelo limoneno. Em algumas espécies a componente volátil é semelhante nos diferentes órgãos, mas noutras esta depende do tipo de material colhido (flores, folhas, raízes). A existência desta variação pode ser evidente em flores entomófilas, em que os voláteis emitidos pelas flores funcionam na atracção de polinizadores (Figueiredo *et al* 2006).

Em estudos prévios com *Angelica lignescens* (mencionada nesse trabalho como *Melanoselinum decipiens*), recolhida no Faial, verificou-se que o componente maioritário era o limoneno (82%) (Silva *et al* 1998), tal como observado no presente estudo.

Noutras espécies do género *Angelica*, como *Angelica archangelica* (Kerrola *et al* 1994, Nivinskienė *et al* 2003), *Angelica glauca* (Agnihotri *et al* 2004) e *Angelica gigas* (Seo *et al* 2007) foi verificado que os constituintes maioritários dos óleos essenciais pertenciam ao grupo dos hidrocarbonetos monoterpénicos. A natureza monoterpénica parece ser uma característica dos óleos essenciais deste género.

Nos óleos isolados dos indivíduos de *Melanoselinum decipiens* o componente dominante foi o β -pineno (38,3-46,5%), confirmando estudos anteriores (Silva *et al* 1998, Pino *et al* 2001, Tesso 2005).

As diferenças na composição do óleo essencial entre as duas espécies estão concordantes com a classificação taxonómica, baseada nos caracteres morfológicos (Press e Dias 1998) e são corroboradas pela análise de *clusters*, baseada na composição química dos óleos essenciais.

Nos óleos essenciais isolados dos diferentes indivíduos de *C. azoricum* os componentes maioritários detectados foram o terpinoleno, a miristicina, o γ -terpineno e o limoneno. Estes dados confirmam dados obtidos em estudos prévios com partes aéreas desta espécie, recolhidas na ilha de São Jorge, tendo sido verificado que o terpinoleno era o componente maioritário (44-62%) dos óleos essenciais, seguido pelo γ -terpineno (9-31%) (Pedro *et al* 1999). Nestes estudos o teor em miristicina (5-9%) foi inferior ao detectado no presente estudo.

As percentagens relativas dos componentes maioritários dos óleos essenciais dos indivíduos SJSA1, SJSA2 e SJPMP foram diferentes das detectadas nos óleos dos indivíduos SJSA3, SJSA4, SJSA5, SJSA6. Nas plantas o rendimento e a composição química dos óleos essenciais variam consideravelmente, devido a factores intrínsecos (variações sexuais, sazonais, ontogénicas e genéticas) ou extrínsecos (aspectos ecológicos e ambientais), não tendo sido possível encontrar correlação entre a composição química dos óleos e a altitude dos locais de colheita. O polimorfismo observado neste estudo pode dever-se à variabilidade genética das populações ou à influência de factores edáficos (Santos *et al* 2005).

Noutras espécies do género *Chaerophyllum* foi verificado que os hidrocarbonetos monoterpénicos eram o grupo com maior representatividade nos óleos essenciais. Em *C.*

byzantinum o componente maioritário detectado nos óleos essenciais foi o sabineno (30%) (Kürkçüoğlu *et al* 2006), em *C. macropodum* o componente maioritário foi o *p*-cimeno (39%) (Başer *et al* 2006) e em *C. libanoticum* os componentes maioritários foram o β -felandreno (18%) e o limoneno (16%) (Demirci *et al* 2007). A natureza monoterpénica dos óleos pode ser uma característica geral deste género.

Tal como observado nos indivíduos de *T. caespititius*, *C. maritimum* e *A. lignescens* os indivíduos de *C. azoricum* apresentaram uma boa correlação entre si, em termos da composição do seu óleo essencial, superior a 0,77.

As análises de *clusters*, baseadas na composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de *T. caespititius*, *C. maritimum*, *A. lignescens* e *C. azoricum*, não evidenciaram uma separação dos indivíduos por grupos em função da sua localização geográfica. Apesar de algumas variações quantitativas intra-específicas observadas na composição química dos óleos, resultantes de plantas com localizações geográficas diferentes, estas não foram relevantes na separação dos diferentes indivíduos. No entanto, em *A. huntii* os agrupamentos formados reflectem a localização geográfica dos diferentes indivíduos.

Os metabolitos secundários têm sido utilizados na taxonomia das plantas. A variação na composição dos óleos essenciais tem sido utilizada na determinação da diversidade intra-específica e inter-específica observada entre algumas populações de plantas. O polimorfismo químico foi utilizado em estudos anteriores (Adams 2003) na determinação da variação química dos óleos essenciais de diferentes espécies de *Juniperus*. Noutros estudos realizados com diferentes espécies de *Hypericum*, foi possível distinguir as diferentes espécies através dos perfis químicos, embora tenha sido detectada uma elevada correlação entre as diferentes populações (Nogueira *et al* 2008).

4.2. Análise molecular

Através da análise molecular, por RAPDs, foi possível detectar um elevado número de polimorfismos, superior a 75%, evidenciando o interesse destes marcadores na avaliação das relações genéticas entre os diferentes indivíduos. Este grau de polimorfismo foi semelhante ao observado anteriormente em plantas aromáticas e medicinais das famílias Lamiaceae e Apiaceae como *Salvia fruticosa* (Skoula *et al* 1999), *Ocimum gratissimum* (Vieira *et al* 2001), *Thymus vulgaris* (Echeverrigaray *et al* 2001), *Cunila galioides* (Fracaro *et al* 2005) e *Changium smyrnioides* (Fu *et al* 2003).

A análise molecular realizada aos indivíduos de *A. lignescens* e *M. decipiens* separou as duas espécies em grupos distintos, com um índice de similaridade inferior a 0,3. Em *T. caespititius* e *A. huntii* a separação dos indivíduos pelos diferentes grupos foi semelhante à observada na análise química, ou seja foi em função do quimiotipo das plantas, sugerindo que esta composição química esteja relacionada com a diferente constituição genética das plantas. Em estudos prévios com espécies da família Lamiaceae, foi também observada a separação de diferentes populações em função do seu quimiotipo, através da análise de RAPDs (Echeverrigaray *et al* 2001, Vieira *et al* 2001, Fracaro *et al* 2005).

A análise molecular realizada nos diferentes indivíduos de *C. maritimum*, *C. azoricum*, *T. caespititius* e *A. lignescens* demonstrou que a organização dos indivíduos pelos diferentes grupos

não foi em função da sua localização geográfica. Foi também detectada uma ausência de relação entre a localização geográfica e a variação genética com plantas de *Cunila galioides*, (Fracaro *et al* 2005). No entanto, noutros estudos observou-se o contrário, ou seja, uma relação entre a variação genética e a distribuição geográfica, em várias espécies de plantas aromáticas, incluindo algumas plantas da família das Lamiaceae, como *Cunila incisa*, *Cunila galioides*, *Hesperizygis ringes* (Fracaro e Echeverrigaray 2006) e *Rosmarinus tomentosus* (Martín e Bermejo 2000).

Nas diferentes espécies em estudo a organização dos indivíduos pelos grupos não foi coincidente quando se utiliza a análise da componente volátil e a análise de RAPDs. A correlação entre as distâncias obtidas pelos dois métodos de análise variou desde uma correlação evidente, $r=0,63$ em *A. huntii* até uma ausência de correlação em *C. maritimum* $r=0,09$. Os valores obtidos para a correlação foram de $r=0,6$ ($p=0,00$) em *Thymus caespititius*, $0,63$ em *A. huntii*, $0,51$ em *A. lignescens* e *M. decipiens* e $0,56$ em *C. azoricum*. Este valor de correlação sugere que a composição química dos óleos essenciais pode ser controlada por um elevado número de genes distribuídos pelo genoma das plantas. Dados disponíveis na bibliografia, em plantas aromáticas e medicinais, mostram correlações variáveis entre a análise química, baseada na composição dos óleos essenciais e a análise molecular, desde $r=0,41$ em *Tanacetum vulgare* (Keskitalo *et al* 2001), $0,79$ em *Thymus vulgaris* (Echeverrigaray *et al* 2001) e $0,81$ em *Ocimum gratissimum* (Vieira *et al* 2001).

Em *C. maritimum* a correlação entre as duas análises foi muito baixa ($r=0,09$; $p\approx 0,00$), significando que para esta espécie a análise química e a análise molecular não estão relacionadas. Em estudos prévios com *Cymbopogon* (Poaceae) também não foi observada correlação entre a análise química dos óleos essenciais e a análise de RAPDs (Khanuja *et al* 2005). Em *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) a análise química baseada no perfil químico dos óleos essenciais não agrupou as diferentes populações da mesma forma que a análise molecular e a análise morfológica. Este facto pode dever-se à diferente expressão genética das enzimas envolvidas nas vias biossintéticas dos compostos químicos produzidos (Masi *et al* 2006).

Os resultados sugerem que tanto a composição química dos óleos essenciais como a análise de RAPDs podem ser utilizadas na identificação de indivíduos de *T. caespititius*, *A. huntii*, *A. lignescens*, *M. decipiens* e *C. azoricum* e na avaliação das relações filogenéticas entre indivíduos.

5. Conclusão

A utilização dos metabolitos secundários na taxonomia das plantas tem vindo a ser reconhecida, podendo também ser utilizados em estudos evolutivos. A utilização dos metabolitos secundários como marcadores intra-específicos necessita ter em conta vários factores, como o estágio de desenvolvimento do órgão (ontogenia foliar, floral e do fruto), condições ambientais, localização geográfica e factores genéticos, entre outros. Todos estes factores podem influenciar a composição química dos óleos.

Nos últimos anos, os marcadores moleculares baseados no DNA têm sido utilizados na identificação de cultivares e na análise das relações genéticas entre indivíduos e espécies, contribuindo, também, para estudos evolutivos e ecológicos (Fracaro *et al* 2005). Os marcadores de DNA são considerados a melhor ferramenta para determinar relações genéticas e diversidade, uma vez que existem em número ilimitado, demonstram elevado polimorfismo, são independentes das interações ambientais e têm elevada hereditariedade (Singh *et al* 2004).

No presente trabalho pretendeu-se fazer uma abordagem comparativa da componente aromática e molecular de diferentes espécies. Foi possível:

- Conhecer a composição química dos óleos essenciais isolados de indivíduos de *T. caespititius*, *C. maritimum*, *A. lignescens*, *M. decipiens* e *C. azoricum*, corroborando dados anteriores existentes na bibliografia referentes a populações.
- Identificar os componentes presentes nos óleos essenciais de indivíduos de *A. huntii*, uma espécie muito pouco estudada, não existindo dados na bibliografia referentes à composição química dos óleos essenciais.
- Detectar a possível existência de dois quimiotipos nos óleos essenciais de indivíduos de *A. huntii*: dilapiole/terpinoleno/*trans*- α -bergamoteno nos óleos essenciais dos indivíduos de São Miguel e *trans*-isomiristicina/limoneno/ β -mirceno nos óleos dos indivíduos de São Jorge e Flores.
- Diferenciar os indivíduos de *A. lignescens* dos indivíduos de *M. decipiens*, revelando uma boa separação a nível inter-específico, tanto a nível aromático como molecular corroborando a existência de duas espécies distintas, uma endémica das ilhas dos Açores (*A. lignescens*) e outra endémica da ilha da Madeira (*M. decipiens*).
- Agrupar os indivíduos em função das similaridades apresentadas entre estes.
- Detectar elevados polimorfismos moleculares nas diferentes espécies em estudo.
- Estudar um elevado número de *loci* sem conhecimento prévio do genoma.
- Detectar uma correlação moderada entre a análise da componente volátil e a análise molecular, em todas as espécies estudadas excepto no *C. maritimum*.

As informações obtidas a partir da análise molecular por RAPDs e da análise da componente volátil sugerem que estas duas análises podem-se combinar e apoiar-se mutuamente na avaliação das diferenças químicas e genéticas entre indivíduos próximos, como complemento a análises morfológicas.

6. Perspectivas futuras

As plantas aromáticas e medicinais têm sido utilizadas com diferentes fins pelo Homem desde a antiguidade. O estudo dos compostos secundários teve início no final do século XIX e a estes foram atribuídas funções de defesa, atracção de animais polinizadores e dispersores de sementes. Ainda há muito por descobrir sobre estes compostos, nomeadamente as vias biossintéticas, a sua regulação genética, entre outros.

Em trabalhos futuros seria interessante utilizar outro tipo de marcadores moleculares, como os ISSRs e os AFLPs, uma vez que estes geram polimorfismos diferentes dos RAPDs e verificar se estes estão relacionados com as características químicas das plantas.

As abordagens genómicas funcionais são uma boa ferramenta para o estudo do metabolismo celular em tecidos ou em todo o organismo. Como tal seria interessante utilizar algumas destas abordagens, como:

- A proteómica, uma ferramenta que permite a identificação de proteínas envolvidas nos processos celulares, identificando as proteínas expressas numa dada altura nos diferentes tecidos. Para a separação das proteínas a melhor técnica é a 2D-PAGE (*two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*), depois de separadas as proteínas podem ser identificadas por espectrometria de massa.
- Os EST (*expressed sequence tags*), são sequências de DNA provenientes de uma biblioteca de cDNA. Os ESTs podem ser mapeados permitindo a identificação de um determinado *locus*.
- Os *microarrays*, permitem monitorizar os níveis de expressão de vários genes em simultâneo, de modo a detectar quais é que estão activos em determinadas alturas.

7. Bibliografia

- Adams RP, Schwarzbach AE, Pandey RN. 2003. The concordance of terpenoid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotypes: an example from *Juniperus*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 375-387.
- Agnihotri VK, Thappa RK, Meena B, Kapahi BK, Saxena RK, Qazi GN, Agarwal SG. 2004. Essential oil composition of the aerial parts of *Angelica glauca* growing wild in North-West Himalaya (India). *Phytochemistry* 65: 2411-2413.
- Antunes AM, Fonseca TF, Santos SMBPP. 1997. Isonothoapiol: a new phenylpropenoid from *Ammi huntii*. *Natural Product Letters* 11(1): 77-80.
- Barroso JG, Pedro LG, Figueiredo AC, Pais MSM. 1992. Seasonal variation in the composition of the essential oil of *Crithmum maritimum* L. *Flavour and Fragrance Journal* 7: 147-150.
- Barroso JG, Pedro LG, Pais MS, Scheffer JJC. 1991. Analysis of the essential oil of *Crithmum maritimum* L. *Journal of Essential Oil Research* 3(5): 313-316.
- Başer KHC, Özek G, Özek T, Duran A. 2006. Composition of the essential oil of *Chaerophyllum macropodum* Boiss. fruits obtained by microdistillation. *Journal of Essential Oil Research* 18: 515-517.
- Başer KHC, Özek T, Demirci B, Saritas Y. 2000. Essential oil of *Crithmum maritimum* L. from Turkey. *Journal of Essential Oil Research* 12(4): 424-426.
- Başer KHC. 1995. Analysis and quality assessment of essential oils. Em: Silva KT (ed). A manual on the essential oil industry. United Nations Industrial Development Organization. Viena. pp 155-172.
- Bueno E, Juan A, Crespo MB. 2006. Lectotypification of three endemic taxa of *Ammi* L. (Apiaceae) from the archipelago of the Azores. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 63(1): 31-33.
- Bussell JD, Waycott M, Chappill JA. 2005. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 7: 3-26.
- Cannon MJ. 1994. Umbelliferae (Apiaceae). Em: Press JR, Short MJ (eds). *Flora of Madeira*. HMSO. Londres. pp 238-248.
- Croteau R, Kutchan T, Lewis N. 2000. Natural products (secondary metabolites). Em: Buchanan B, Gruissem W, Jones R, (eds). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 1ª edição. American Society of Plant Physiologist. Maryland. pp 1250-1318.
- Cunsolo F, Ruberto G, Amico V, Platelli M. 1993. Bioactive metabolites from Sicilian marine fennel, *Crithmum maritimum*. *Journal of Natural Products* 56(9): 1598-1600.
- Darokar MP, Khanuja SPS, Shasany AK, Kumar S. 2001. Low levels of genetic diversity detected by RAPD analysis in geographically distinct accessions of *Bacopa monnieri*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48: 555-558.
- Demirci B, Koşar M, Demirci F, Dinç M, Başer KHC. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. et Kotschy. *Food Chemistry* 105: 1512-1517.

- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19, 11-15.
- Echeverrigaray S, Agostini G, Atti-Serfini L, Paroul N, Pauletti GF, Santos ACA. 2001. Correlation between the chemical and genetic relationship among commercial thyme cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4220-4223.
- Facchini PJ. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 29-66.
- Féral JP. 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 268: 121-145.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. 2006. Plantas aromáticas e medicinais. Factores que afectam a produção. Em: Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG (eds). *Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Curso teórico-prático. 1ª edição. Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Centro de Biotecnologia Vegetal. Lisboa. pp 48-54.*
- Flamini G, Mastrorilli E, Cioni PL, Morelli I. 1999. Essential oil from *Crithmum maritimum* grown in Liguria (Italy): seasonal variation and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research* 11 (6): 788-792.
- Foechterlen D. 1996. Les constituants volatils de *Melanoselinum decipiens* Hoffman (rapport). Mulhouse: Université de Haute Alsace Faculté des Sciences et Techniques. pp 3-9.
- Fracaro F, Echeverrigaray S. 2006. Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of southern Brazil. *Biochemical Genetics* 44(11/12): 479-490.
- Fracaro F, Zacaria J, Echeverrigaray S. 2005. RAPD based genetic relationships between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 409-417.
- Franco JA. 1971. Nova flora de Portugal (Continente e Açores). Volume I. Sociedade Astórica, Lda. Lisboa. pp 498-547.
- Fu C, Qiu Y, Kong H. 2003. RAPD analysis for genetic diversity in *Changium smyrnioides* (Apiaceae), an endangered plant. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44: 13-18.
- Günaydin K, Beyazit N. 2004. The chemical investigations on the ripe fruits of *Ammi visnaga* (Lam.) Lamarck growing in Turkey. *Natural Product Research* 18(2): 169-175.
- Judd W, Campbell C, Kellogg E, Stevens P, Donoghue M. 2002. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. 2ª edição. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. pp 466-468, 470-473.
- Katsouri E, Demetzos C, Perdetzoglou D, Loukis A. 2001. An interpopulation study of the essential oils of various parts of *Crithmum maritimum* L. growing in Amorgos Island, Greece. *Journal of Essential Oil Research* 13(5): 303-308.
- Kerrola K, Galambosi b, Kallio H. 1994. Characterization of volatile composition and odor of *Angelica* (*Angelica archangelica* subsp. *archangelica*. L.) root extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42: 1979-1988.

- Keskitalo M, Lindén A, Valkonen JPT. 1998. Genetic and morphological diversity of Finnish tansy (*Tanacetum vulgare* L., Asteraceae). *Theoretical and Applied Genetics* 96: 1141-1150.
- Keskitalo M, Pehu E, Simon JE. 2001. Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 267-285.
- Khanuja SPS, Shasany AK, Pawar A, Lal RK, Darokar MP, Naqvi AA, Rajkumar S, Sundaresan V, Lal N, Kumar S. 2005. Essential oil constituents and RAPDs markers to establish species relationship in *Cymbopogon* Spreng. (Poaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 171-186.
- Kim MR, El-Aty AMA, Kim IS, Shim JH. 2006. Determination of volatile flavour components in danggui cultivars by solvent free injection and hydrodistillation followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography* 1116: 259-264.
- Kumar LS. 1999. DNA markers in plant improvement: an overview. *Biotechnology Advances* 17: 143-182.
- Kürkçüoğlu M, Baser KHC, Işcan G, Malyer H, Kaynak G. 2006. Composition and anticandidal activity of the essential oil of *Chaerophyllum byzantinum* Boiss. *Flavour and Fragrance Journal* 21:115-117.
- Lacerda DR, Acedo MDP, Lemos Filho JP, Lovato MB. 2002. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana* 3(2): 87-92.
- Likens ST, Nickerson GB. 1964. Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *American Society of Brewing Chemistry, Proceedings* . 5-13.
- Liu ZJ, Cordes JF. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Martín JP, Bermejo EH. 2000. Genetic variation in the endemic and endangered *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath Maire (Labiatae) using RAPD markers. *Heredity* 85: 434-443.
- Masi L, Siviero P, Esposito C, Castaldo D, Siano F, Laratta B. 2006. Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). *European Food Research and Technology* 223(2): 273-281.
- Massanet GM, Guerra FM, Dorado JM, Jorge ZD, Valerga P. 1995. Eudesmanolides from *Melanoselinum decipiens*. *Phytochemistry* 36(5): 1123-1126.
- Massanet GM, Guerra FM, Jorge ZD, Astorga C. 1997. Sesquiterpenolides from *Melanoselinum decipiens*. *Phytochemistry* 45(8):1645-1651.
- Miguel G, Simões M, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Carvalho L. 2004. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespitius*, *Thymus camphorates* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry* 86: 183-188.
- Moreno-Dorado FJ, Guerra FM, Aladro FJ, Bustamante JM, Jorge ZD, Massanet GM. 2000. Synthesis of (±)-11 α -Hydroxy-3-oxo-6 α H,7 α H,10 β Me-endesman-1,2-4,5-dien-6,12-olide. *Journal of Natural Products* 63: 934-938.
- Nivinskienė O, Butkienė R, Mockutė D. 2003. Changes in chemical composition of essential oil of *Angelica archangelica* L. roots during. *Chemija* 14(1): 52-56.

- Nivinskienė O, Butkienė R, Mockutė D. 2005. Chemical composition of seed (fruit) essential oils of *Angelica archangelica* L. growing wild in Lithuania. *Chemija* 16(3-4): 51-54.
- Nivinskienė O, Butkienė R, Mockutė D. 2005a. The chemical composition of the essential oil of *Angelica archangelica* L. roots growing wild in Lithuania. *Journal of Essential Oil Research* 17(4): 373-377.
- Nivinskienė O, Butkienė R, Mockutė D. 2007. The seed (fruit) essential oils of *Angelica archangelica* L. growing wild in Lithuania. *Journal of Essential Oil Research* 19(5): 477-481.
- Nogueira T, Marcelo-Curto MJ, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Rubiolo P, Bicchi C. 2008. Chemotaxonomy of *Hypericum* genus from Portugal geographical distribution and essential oils composition of *Hypericum perforatum*, *Hypericum humifusum*, *Hypericum linarifolium* and *Hypericum pulchrum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 40-50.
- Özcan M, Akgül A, Başer KHC, Özçek T, Tabanca N. 2001. Essential oil composition of sea fennel (*Crithmum maritimum*) from Turkey. *Nahrung/Food* 45(5): 353-356.
- Pateira L, Nogueira T, Antunes A, Venâncio F, Tavares R, Capelo J. 1999. Two chemotypes of *Crithmum maritimum* L. from Portugal. *Flavour and Fragrance Journal* 14: 333-343.
- Pedro LG, Silva JA, Barroso JG, Figueiredo AC, Deans SG, Looman A, Scheffers JJC. 1999. Composition of the essential oil of *Chaerophyllum azoricum* Trel., an endemic species of the Azores archipelago. *Flavour and Fragrance Journal* 14:287-289.
- Pereira SI, Santos PAG, Barroso JG, Figueiredo AC, Pedro LG, Salgueiro LR, Deans SG, Scheffer JJC. 2000. Chemical polymorphism of the essential oils from populations of *Thymus caespititius* grown on the island S. Jorge (Azores). *Phytochemistry* 55: 241-246.
- Pereira SI, Santos PAG, Barroso JG, Figueiredo AC, Pedro LG, Salgueiro LR, Deans SG, Scheffer JJC. 2003. Chemical polymorphism of the essential oils from populations of *Thymus caespititius* grown on the Islands Pico, Faial and Graciosa (Azores). *Phytochemical Analysis* 14: 228-231.
- Pestana MH, Gageiro JN. 2000. Análise de dados para ciências sociais. A complementaridade do SPSS. Edições Sílabo. Lisboa. pp 563.
- Peters RJ, Croteau RB. 2004. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Em: Christou P, Klee H, (eds). *Handbook of Plant Biotechnology*. 1ª edição. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. pp 609-627.
- Pichersky E, Gang DR. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* 5(10): 430-445.
- Pimenov MG, Leonov MV. 1993. The genera of Umbelliferae. 1ª edição. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens. Kew. pp: 3-8.
- Pino JA, Fernandes P, Marbot R, Fontinha SS. 2001. Chemical composition of the leaf oil of *Melanoselinum decipiens* (Schrad. Et Wendl.)Hoffm. from Madeira. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 4(1): 5-7.
- Press JR, Dias E. 1998. The genera *Melanoselinum* Hoffm. and *Angelica* L. (Umbelliferae) in Macaronesia. *Life and Marine Sciences* 16A: 1-10.
- Press JR. 1994. Labiatae (Lamiaceae). Em: Press JR, Short MJ (eds). *Flora of Madeira*. HMSO. Londres. pp 238-248.

- Rohlf JF. 1992. NTSYS-pc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics. New York.
- Ruberto G, Baratta MT, Deans SG, Dorman HJD. 2000. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Medica* 66: 687-693.
- Ruberto G, Biondi D, Piattelli M. 1991. Composition of the volatile oil of *Crithmum maritimum* L. *Flavour and Fragrance* 6: 121-123.
- Salgueiro L. 2006. Os tomilhos de Portugal. Em: Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG (eds). *Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Curso teórico-prático. 1ª edição. Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Centro de Biotecnologia Vegetal. Lisboa. pp 48-54.*
- Santos PAG, Barroso JG, Figueiredo AC, Pedro LG, Salgueiro LR, Fontinha SS, Deans SG, Scheffer JC. 2005. Chemical polymorphism of populations of *Thymus caespitius* grown on the islands Corvo, Flores, São Miguel and Terceira (Azores) and Madeira, assessed by analysis of their essential oils. *Plant Science* 169: 1112-1117.
- Santos PAG, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Deans SG, Scheffer JJC. 2002. Composition of the essential oils from population of *Crithmum maritimum* L. grown on four Azorean Islands. Em: Rauter AP, Palma FB, Justino J, Araújo ME, Santos SP (eds). *Natural products in the new millennium: prospects and industrial application. Volume 47. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp: 135-141.*
- Schäfer H. 2005. *Flora of Azores. A field guide. 2ª edição. Margraf Publishers. Weikersheim. pp 196-198.*
- Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjioudjop MN. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 5(25): 2540-2568.
- Senatore F, Napolitano F, Özcan M. 2000. Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal* 15: 186-189.
- Seo H, Yang S, Shim S, No K, Park K, Song K, Kim K. 2007. Volatile organic compounds of *Angelica gigas* Nakai, Korean medicinal herb. *Natural Product Research* 21(3): 265-273.
- Sidwa-Gorycka M, Królicka A, Kozyra M, Glowniak K, Bourgaud F, Lojkowska E. 2003. Establishment of a co-culture of *Ammi majus* L. and *Ruta graveolens* L. for the synthesis of furanocoumarins. *Plant Science* 165: 1315-1319.
- Silva JA, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Gomes MA, Fontinha SS, Scheffer JJC. 1998. Composition of the essential oil of *Melanoselinum decipiens* (Schard. & Wendl.) Hoffm., an endemic species of the Madeira and Azores archipelagos. *Flavour and Fragrance Journal* 13: 90-92.
- Singh AP, Dwivedi S, Bharti S, Srivastava A, Singh V. 2004. Phylogenetic relationships as in *Ocimum* revealed by RAPD markers. *Euphytica* 136: 11-20.
- Sjögren E. 2001. *Plants and flowers of the Azores. Espaço Talassa. Lajes do Pico. pp 16, 66, 68, 70, 102.*
- Skoula M, Hilali IE, Makris AM. 1999. Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill.

- clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 559-568.
- Sneath PHA, Sokal RR. 1973. *The principles and practice of numerical classification*. Freeman, São Francisco.
- Taiz L, Zeiger E. 2002. *Plant physiology*. 3ª edição. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. pp 283-308.
- Tesso H. 2005. *Isolation and structure elucidation of natural products from plants (dissertação)*. Hamburgo: Institute of Organic Chemistry University of Hamburg. pp 126-131.
- Verpoorte R, Heijden R, Memelink J. 2000. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research* 9: 323-343.
- Vieira RF, Grayer RJ, Paton A, Simon JE. 2001. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 287-304.
- Vieira RF, Simon JE. 2006. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) based on volatile oils. *Flavour and Fragrance Journal* 21: 214-221.
- Watanabe A, Araki S, Kobari S, Sudo H, Tsuchida T, Uno T, Kosaka N, Shimomura K, Yamazaki M, Saito K. 1998. In vitro propagation, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA analyses of *Angelica* plants. *Plant Cell Reports* 18: 187-192.
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W. 1995. *DNA fingerprinting in plants and fungi*. CRC Press. Boca Raton, USA. pp 43-152.
- Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18(24): 7213-7218.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22): 6531-6535.

Anexos

Anexo A – Origem geográfica das espécies

Anexo A.1. Origem geográfica dos 18 indivíduos de *Thymus caespitius* em estudo, recolhidos nas ilhas de São Miguel, Faial e Madeira em Julho de 2006.

Ilha	Local de colheita	Altitude	Siglas dos indivíduos
São Miguel	Serra da Devassa	700m	SMSD1 e SMSD2
		740m	SMSD
	Cumeeiras	440m	SMCU1 e SMCU2
	Monte Escuro	750m	SMME1 e SMME2
	Serra da Água de Pau	600m	SMSAP1 e SMSAP2
		640m	SMSAP3
	Miradouro Lagoa Fogo	660m	SMMLF1, SMMLF2 e SMMLF3
Pico da Barrosa	900m	SMPB	
Faial	Cabeço dos Trinta	700m	FaCT
	Parque Capelo	340m	FaPCa1 e FaPCa2
Madeira	Pico Ruivo	1800m	MPR

Anexo A.2. Origem geográfica dos 43 indivíduos de *Crithmum maritimum* em estudo, recolhidos nas ilhas de São Jorge, Terceira, Pico, Graciosa, Terceira, Corvo, São Miguel e Faial

Ano	Ilha	Local de colheita	Siglas dos indivíduos
2004	São Jorge	Fajã dos Cubres	SJFC1 e SJFC2
		Porto da Urzelina	SJPU1 e SJPU2
		Velas	SJV1 e SJV2
		Calheta	SJC1 e SJC2
		Porto do Topo	SJPT1 e SJPT2
	Pico	Ponta da Ilha	PPi1 e PPi2
		Lajes	PL1 e PL2
		Cachorro	PCa1 e PCa2
		Areia Larga	PA1 e PA2
	Terceira	Biscoitos	TB1 e TB2
Quatro Ribeiras		TQR1 e TQR2	
2005	Flores	Fajãzinha	FF1 e FF2
		Porto das Lajes	FPL1 e FPL2
		Farol de Albarnaz	FFa
		Fajã Grande	FFG1 e FFG2
		Porto Velho de Santa Cruz	FPVSC1 e FPVSC2
		Porto de São Pedro (Stª Cruz)	FPSP1 e FPSP2
	Graciosa	Porto Afonso	GPA1, GPA2, GPA3 e GPA4
		Ponta da Barca	GPB1 e GPB2
Corvo	Vila Nova do Corvo	CVNC1 e CVNC2	
2006	São Miguel	Praia do Pópulo Livramento	SMPPL
	Faial	Porto Pim	FPPi

Anexo A.3. Origem geográfica dos diferentes indivíduos de *Ammi huntii* em estudo, recolhidos nas ilhas de São Jorge, Flores e São Miguel.

Ano	Ilha	Local de colheita	Altitude	Siglas dos indivíduos
2004	São Jorge	Pico Verde		SJPV
		Pico Morro Pelado		SJPMP
		Santo António		SJSA
2005	Flores	Ladeiras		FL1 e FL2
		Lajedo		Flaj 1 e Flaj2
2006	São Miguel	Parque Lagoa Canário	740m	SMPLC1 e SMPLC2
		Lomba dos Homens	330m	SMLHR1 e SMLHR2
			380m	SMLH1, SMLH2 e SMLH3

Anexo A.4. Origem geográfica dos diferentes indivíduos de *Melanoselinum decipiens* e *Angelica lignescens* em estudo. Sendo os indivíduos de *A. lignescens* recolhidos na Terceira, no Pico, nas Flores e e em São Miguel. Os indivíduos de *M. decipiens* foram recolhidos na ilha da Madeira.

Ano	Ilha	Local de Colheita	Altitude	Siglas dos indivíduos
<i>Angelica lignescens</i>				
2004	Terceira	Pico de Stª Bárbara	970m	TPSB1
			850m	TPSB2 e TPSB3
	Pico	Caveiro	950m	PC1 e PC2
			Meia Encosta	800m
2005	Flores	Tapada Comprida	500m	FTC1 e FTC2
		Peninha	400m	FP1 e FP2
2006	São Miguel	Parque Lagoa Canário	740m	SMPLC1 e SMPLC2
		Parque Lagoa Canário (floral)		SMPLC1.f e SMPLC2.f
<i>Melanoselinum decipiens</i>				
2005	Madeira			Mad1 e Mad2
2006	Madeira	Boa Ventura		MBV1

Anexo A.5. Origem geográfica dos indivíduos de *Chaerophyllum azoricum* em estudo, recolhidos na ilha de São Jorge.

Ano	Local de colheita	Altitude	Siglas dos indivíduos
2004	Pico Morro Pelado	1000m	SJPMP
	Santo António	500m	SJSA1 e SJSA2
2007	Santo António	700m	SJSA3 e SJSA4
		560m	SJSA5 e SJSA6

Anexo C – Polimorfismos detectados pelos RAPDs

Anexo C.1. Número de polimorfismos gerados com os primers de RAPDs, utilizados na análise molecular dos 18 indivíduos de *Thymus caespititius*.

Primer	Sequência	N.º Bandas	N.º Bandas Polimórficas sem CE	N.º Bandas Polimórficas com CE
A01	CAGGCCCTTC	13	11	11
A02	TGCCGAGCTG	14	11	14
A03	AGTCAGCCAC	15	13	14
A05	AGGGGTCTTG	11	10	11
A09	GGGTAACGCC	11	8	9
A11	CAATCGCCGT	12	9	12
A13	CAGCACCCAC	18	12	17
A15	TTCCGAACCC	16	11	16
A16	AGCCAGCGAA	12	8	12
A18	AGGTGACCGT	13	8	13
A20	GTTGCGATCC	11	10	11
B05	TGCGCCCTTC	10	8	10
B07	GGTGACGCAG	13	10	13
B10	CTGCTGGGAC	23	21	23
B12	CCTTGACGCA	14	12	13
D05	TGAGCGGACA	7	3	7
E02	GGTGCGGGAA	10	6	10
E18	GGA CTGCAGA	18	14	18
Total Bandas		241	185	234

Anexo C.2. Número de polimorfismos gerados com os primers de RAPDs, utilizados na análise molecular dos 43 indivíduos de *Crithmum maritimum*.

Primer	Sequência	N.º Bandas	N.º Bandas Polimórficas sem CE	N.º Bandas Polimórficas com CE
A03	AGTCAGCCAC	21	26	20
A06	GGTCCCTGAC	12	10	12
A07	GAAACGGGTG	17	14	17
A08	GTGACGTAGG	11	10	11
A09	GGGTAACGCC	21	20	20
B01	GTTTCGCTCC	10	9	10
B02	TGATCCCTGG	12	11	12
B06	TGCTCTGCC	17	14	17
B08	GTCCACACGG	33	33	33
B10	CTGCTGGGAC	21	19	21
B11	GTAGACCCGT	13	9	13
B12	CCTTGACGCA	11	9	11
B15	GGAGGGTGTT	17	16	17
B18	CCACAGCAGT	24	23	24
B20	GGACCCTTAC	18	18	18
D03	GTCGCCGTCA	27	26	27
D05	TGAGCGGACA	17	16	17
D15	CATCCGTGCT	15	15	15
E09	CTTCACCCGA	11	9	11
E18	GGACTGCAGA	17	17	17
E19	ACGGCGTATG	19	19	19
E20	AACGGTGACC	19	18	19
Total Bandas		383	361	381

Anexo C.3. Número de polimorfismos gerados com os primers de RAPDs, utilizados na análise molecular dos 14 indivíduos de *Ammi huntii*.

Primer	Sequência	N.º Bandas	N.º Bandas Polimórficas sem CE	N.º Bandas Polimórficas com CE
A04	AATCGGGCTG	14	14	14
A05	AGGGGTCTTG	23	19	23
A06	GGTCCCTGAC	15	12	15
A08	GTGACGTAGG	13	13	13
A09	GGGTAACGCC	15	14	14
A10	GTGATCGCAG	13	11	13
A13	CAGCACCCAC	25	24	24
A16	AGCCAGCGAA	20	18	20
A18	AGGTGACCGT	13	12	13
B01	GTTTCGCTCC	24	23	24
B10	CTGCTGGGAC	7	6	7
B11	GTAGACCCGT	14	13	14
B17	AGGGAACGAG	10	9	10
B18	CCACAGCAGT	11	7	11
E19	ACGGCGTATG	18	16	18
E20	AACGGTGACC	20	18	20
Total Bandas		255	229	253

Anexo C.4. Número de polimorfismos gerados com os primers de RAPDs, utilizados na análise molecular dos 12 indivíduos de *Angelica lignescens* e 3 indivíduos de *Melanoseinum decipiens*.

Primer	Sequência	N.º Bandas	N.º Bandas Polimórficas sem CE	N.º Bandas Polimórficas com CE
A04	AATCGGGCTG	26	26	26
A05	AGGGGTCTTG	29	28	29
A09	GGGTAACGCC	17	17	17
A10	GTGATCGCAG	9	8	9
A11	CAATCGCCGT	16	13	16
A13	CAGCACCCAC	30	29	30
A14	TCTGTGCTGG	8	7	8
A15	TTCCGAACCC	10	8	10
A16	AGCCAGCGAA	19	15	19
A19	CAAACGTCCG	18	14	18
B01	GTTTCGCTCC	27	23	27
B07	GGTGACGCAG	27	24	27
B10	CTGCTGGGAC	22	18	22
B11	GTAGACCCGT	19	17	19
D03	GTCGCCGTCA	24	23	24
D13	GGGGTGACGA	13	12	13
Total Bandas		314	282	314

Anexo C.5. Número de polimorfismos gerados com os primers de RAPDs, utilizados na análise molecular dos 7 indivíduos de *Chaerophyllum azoricum*.

Primer	Sequência	N.º Bandas	N.º Bandas Polimórficas sem CE	N.º Bandas Polimórficas com CE
A01	CAGGCCCTTC	11	8	9
A03	AGTCAGCCAC	18	17	17
A05	AGGGGTCTTG	10	9	10
A09	GGGTAACGCC	10	9	9
A11	CAATCGCCGT	10	10	10
A13	CAGCACCCAC	16	13	15
A15	TTCCGAACCC	8	3	5
A16	AGCCAGCGAA	19	16	19
A20	GTTGCGATCC	19	14	19
B05	TGCGCCCTTC	13	13	13
B07	GGTGACGCAG	32	28	32
B08	GTCCACACGG	14	13	14
B09	TGGGGGACTC	19	19	19
B10	CTGCTGGGAC	21	19	21
B11	GTAGACCCGT	21	18	21
B12	CCTTGACGCA	10	7	10
B15	GGAGGGTGTT	5	4	5
B17	AGGGAACGAG	10	9	10
B18	CCACAGCAGT	9	8	9
D03	GTCGCCGTCA	10	8	9
E18	GGA CTGCAGA	14	14	14
E19	ACGGCGTATG	16	16	16
E20	AACGGTGACC	17	16	17
Total Bandas		332	291	323