

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
Departamento de Biologia Vegetal



**Estruturas Secretoras e Actividades Biocidas
em Espécies de *Hypericum* (Clusiaceae) da Flora
Portuguesa**

Inês Margarida Vieira da Silva
Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia
2010

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
Departamento de Biologia Vegetal



**Estruturas Secretoras e Actividades Biocidas
em Espécies de *Hypericum* (Clusiaceae) da Flora
Portuguesa**

Tese de Mestrado orientada por:
Professora Doutora Lia Ascensão
(Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

Em colaboração com:
Doutora Engenheira Teresa Nogueira
Doutora Lina Hall
(Laboratório Nacional de Energia e Geologia)

Inês Margarida Vieira da Silva
Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia
2010

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível devido à disponibilidade determinante de todas as pessoas que comigo colaboraram. No entanto, não posso deixar de fazer alguns agradecimentos em particular:

À Professora Lia Ascensão, um agradecimento muito especial não só pelo seu valor a nível científico e intelectual, mas também pela sua simpatia e pelo seu apoio moral. Agradeço a confiança que em mim depositou e todo o tempo que me dedicou.

À Engenheira Doutora Teresa Nogueira e à Doutora Lina Hall pela disponibilidade e acolhimento aquando do trabalho prático no LNEG.

À Luísa, um agradecimento muito especial pela disponibilidade e apoio durante todo o trabalho prático.

À Marta e ao Jorge pela paciência, disponibilidade e apoio informático imprescindível na parte escrita deste trabalho.

Aos meus colegas de mestrado: Carmen, Letícia, Ana, Lara, Vânia e Diogo, pelos momentos de distração e descontração.

Aos colegas da sala dos bolseiros em geral, agradeço o bom ambiente e a ajuda prestada, não só durante uma primeira fase de integração mas também durante todo o trabalho prático e escrito.

Aos meus pais um agradecimento especial pela paciência, compreensão, apoio e colaboração.

A todos que não mencionei, mas que de algum modo comigo colaboraram, um muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BDMA	Dimetilbenzilamina (Ing. <i>Benzyldimethylamine</i>)
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de Carbono
DDSA	Anidrido Dodecenil Succínico (Ing. <i>Dodecenyl Succinic Anhydride</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
g	Gramas
h	H
kV	KiloVolts
L	litro
M	Molar
MIC	Concentração Mínima Inibitória (Ing. <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>)
min.	Min.
mL	Mililitro
mL/min	Mililitros por minuto
mm	Milímetro
N	Normalidade
nm	Nanómetro
PAS	Ácido Periódico/ Reagente de Schiff (Ing. <i>Periodic Acid/Schiff Stain</i>)
PDA	Potato Dextrose Agar
PEG	Polietileno glycol
PIC	Porcentagem de inibição do crescimento micelial
pH	Potencial de hidrogénio iónico
r.p.m.	Rotações por min.
s	Segundo
SAL	Safranina/Azur II/Lugol
SEM	Microscopia Electrónica de Varrimento (Ing. <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
subsp.	Subespécie
UV	Ultravioleta
V	Volts
°C	Grau celsius
%	Porcentagem
µm	Micrómetro
µL	Microlitro
2,4-DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina

RESUMO

O género *Hypericum* (Clusiaceae) deve a sua ampla utilização em medicina popular à espécie representativa do género *H. perforatum* (Milfurada), que é usada desde a Antiguidade. Das muitas actividades farmacológicas atribuídas às espécies deste género, salientam-se a antiviral, antibacteriana e antifúngica, o que confirma muitas das suas utilizações tradicionais. Entre as substâncias bioactivas isoladas nestas espécies destacam-se a hipericina e hiperforina e seus derivados. Apesar de nas últimas décadas serem numerosos os estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados em espécies de *Hypericum*, são raros os estudos sobre a morfo-anatomia das estruturas secretoras envolvidas na produção dos compostos bioactivos.

Este trabalho teve como objectivo o estudo da morfologia e anatomia das estruturas secretoras que ocorrem nos órgãos aéreos de *Hypericum elodes*, *H. perforatum*, *H. pubescens* e *H. tomentosum*. Para além disso caracterizou-se histoquimicamente os secretados e avaliou-se a actividade antifúngica dos óleos essenciais e de extractos etanólicos. Caracterizam-se os diferentes tipos de estruturas secretoras (glândulas translúcidas, nódulos negros, canais e idioblastos secretores) e descreve-se o seu padrão de distribuição nos diferentes órgãos. As glândulas translúcidas são cavidades sub-epidérmicas delimitadas por duas ou três camadas de células, enquanto que os nódulos de cor vermelha a negra, são maciços de células que parecem não desenvolver um lúmen. Os canais secretores, quando associados ao floema, são de pequeno calibre e o lúmen está sempre delimitado por quatro células (tipo A) ou localizam-se nos parênquimas, apresentando maiores dimensões e lúmen delimitado por um epitélio glandular com cerca de dez células (tipo B). Os idioblastos acumulam taninos ou oxalatos de cálcio que cristalizam sob a forma de drusas. Descrevem-se ainda outros dois tipos de glândulas, nódulos pedunculados e estruturas híbridas, com características anatómicas simultaneamente de nódulo e canal, que por serem raras, não foram até agora estudadas detalhadamente. De um modo geral, as bolsas secretam óleos essenciais ricos em compostos fenólicos (agliconas flavonólicas), os canais eliminam oleorresinas e os nódulos contêm essencialmente hipericina. Os óleos essenciais e extractos etanólicos avaliados não revelaram a presença de concentrações mínimas inibitórias contra o basidiomycete *T. versicolor*, sendo no entanto significativo o decréscimo micelial obtido ao longo do estudo efectuado.

Palavras-chave: *Hypericum*, glândulas translúcidas, nódulos negros laminares e pedunculados, canais e idioblastos secretores, anatomia, morfologia, actividade antifúngica.

ABSTRACT

The widespread use of genus *Hypericum* (Clusiaceae) in folk medicine has its origin in the most representative specie of the genus *H. perforatum* (St John's Wort) which has been used since Antiquity. Concerning pharmacological activities attributed to this genus, we emphasize antiviral, antibacterial and antifungal activities, which validate many of its traditional uses. Among the isolated bioactive substances from this species, we underline hypericin, hyperforin and their derivatives. Despite the intense phytochemical and pharmacological research conducted in *Hypericum* species during the last decades, morpho-anatomical studies on the glands that produce bioactive compounds are rare.

The aim of the present work was to study the secretory structures that occur on the aerial organs of *Hypericum elodes*, *H. perforatum*, *H. pubescens* e *H. tomentosum* from a morphological and anatomical point of view. In addition, we characterized histochemically the secretory products and evaluated antifungal activity of essential oils and ethanolic extracts. Different types of secretory structures (translucent glands, black nodules, ducts and idioblasts) are characterized and their distribution pattern in different organs is described. Translucent glands are subepidermical cavities delimited by two or three cell layers, whereas red to dark nodules are clusters of cells lacking a central intercellular space (a lumen). Ducts, when associated with the phloem, have a narrow lumen always delimited by four cells (type A) or when located in parenchyma have a wide extent and a lumen surrounded by ten cells, approximately (type B). Idioblasts contain tannins or calcium oxalate crystals. Two other types of peculiar glands, secretory emergences with a nodule on top and hybrid structures, composed partly of nodule and partly duct, are also characterized. As they are plant uncommon structures their study has been neglected. The histochemical tests showed that cavities secrete essential oils rich in phenolic compounds (flavonolic aglycones), ducts produce oleoresins and nodules contain essentially hypericin. Although the tested essential oils and ethanolic extracts didn't reveal the existence of minimal inhibitory concentrations against *T. versicolor* basidiomycete, there was a substantial decrease in micelial growth during the experience.

Keywords: *Hypericum*, translucent glands, laminar and stipitate black nodules, secretory ducts and idioblasts, anatomy, morphology, antifungal activity.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1. O Género <i>Hypericum</i>	1
1.1. Enquadramento Taxonómico	2
1.2. Usos Etnofarmacológicos	4
1.3. Fitoquímica.....	5
1.4. Actividade biológicas de extractos e/ou de compostos isolados do género <i>Hypericum</i>	7
1.5. Estruturas secretoras	8
2. Breve caracterização morfológica das espécies em estudo	10
2.1. <i>Hypericum elodes</i> L.	10
2.2. <i>Hypericum perforatum</i> L.	11
2.3. <i>Hypericum pubescens</i> Boissier	12
2.4. <i>Hypericum tomentosum</i> L.	12
3. Objectivos e plano geral da dissertação	13
II. MATERIAIS E MÉTODOS	15
1. Material Vegetal	15
2. Métodos	16
2.1. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM).....	16
2.2. Microscopia Óptica.....	17
2.2.1 Histoquímica em Material Fresco.....	17
2.2.2. Anatomia e Histoquímica em Material Fixado.....	23
2.3. Isolamento dos Óleos Essenciais por Hidrodestilação	26
2.4. Extracção de Compostos Fenólicos.....	26
2.5. Avaliação da Actividade Antifúngica	27

III. RESULTADOS.....	29
1. Distribuição e morfologia das estruturas secretoras	29
1.1 <i>Hypericum elodes</i>	29
1.2. <i>Hypericum perfoliatum</i>	30
1.3. <i>Hypericum pubescens</i>	31
1.4. <i>Hypericum tomentosum</i>	32
2. Caracterização Anatômica das estruturas secretoras	33
2.1 <i>Hypericum elodes</i>	33
2.2. <i>Hypericum perfoliatum</i>	35
2.3. <i>Hypericum pubescens</i>	37
2.4. <i>Hypericum tomentosum</i>	38
3. Caracterização Histoquímica dos Secretados	39
4. Avaliação da actividade antifúngica dos Óleos e dos Extractos etanólicos.....	41
IV. DISCUSSÃO.....	43
V. CONCLUSÕES	51
VI. PRESPECTIVAS FUTURAS	53
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	55
VIII. ESTAMPAS	61

I. INTRODUÇÃO

1. O GÉNERO *HYPERICUM*

O termo latino *hypericum* deriva do grego *hypereicón*, que tem origem na junção de duas palavras, *hyper* (sobre) e *eikón* (imagem), o que significa estar para além do imaginável, dada a sua notável reputação como planta medicinal.

Hypericum perforatum L., a espécie representativa do género, deve o nome vulgar Erva de S. João ao facto de se encontrar em flor na altura do S. João, finais de Junho, embora apresente flores esporádicas durante todo o ano (Lieutaghi, 2002). É igualmente provável que tenha recebido esse nome devido aos Cavaleiros de São João de Jerusalém das Cruzadas, que o usavam nos campos de batalha para tratar as feridas. Esta espécie é também conhecida por Milfurada devido ao facto de as folhas serem ponteadas por glândulas transparentes sem clorofila, que lhe conferem um aspecto perfurado (Rocha, 1996).

De acordo com a Teoria das Assinaturas, *H. perforatum* era associado aos humores

“coléricos” por ter flores amarelas, e utilizado para a icterícia e para a histeria. Acreditava-se também, que esta espécie tinha a capacidade de expulsar os espíritos malignos do corpo, sendo por isso administrada aos dementes, sob forma de infusões (Lieutaghi, 2002).

1.1. Enquadramento Taxonómico

O género *Hypericum* foi inicialmente colocado na família Hypericaceae (Saint Hilaire, 1805, *in* Slusarski *et al.*, 2007), mas no final do séc. XIX Engler incluiu-o na família Guttiferae, *nomem conservadum* por Clusiaceae, onde ainda se encontra actualmente. Pertencem a esta família plantas perenes e anuais (raras), rizomatosas, que apresentam frequentemente idioblastos taniníferos dispersos e canais e/ou cavidades secretoras (glândulas translúcidas), onde se acumulam óleos essenciais e resinas. Em algumas espécies estão também presentes nódulos, estruturas compactas vermelhas ou negras que contêm hipericina. As folhas são opostas, algumas verticiladas, simples, inteiras, sem estípulas¹ e com numerosas e finas nervuras laterais. As flores hermafroditas ou unissexuais, actinómórficas², geralmente pentâmeras ou tetrâmeras são hipogínicas³ e estão organizadas em inflorescências terminais cimosas⁴. As sépalas são livres tal como as pétalas, podendo estar fundidas na base. Os estames numerosos, livres, e em sucessão centrífuga, estão agrupados em 3 a 5 fascículos, com os filetes livres ou fundidos na base. Por vezes alguns estames degeneram e formam estaminódios. O gineceu é composto por 3 a 5 (por vezes mais) carpelos fundidos, tendo o ovário normalmente tantos lóculos como carpelos. A placentação é axial, às vezes unilocular ou parietal. O óvulo é anatópico⁵ ou hemitrópico⁶ e bitegmentado. Os estiletos, em número igual aos carpelos, vão de livres a completamente fundidos, sendo o estigma lobulado ou peltado. O fruto é baciforme, drupáceo ou mais frequentemente em forma de cápsula com deiscência septicida⁷ ou septífuga⁸. As sementes apresentam o embrião recto ou curvo, oleaginoso, sem endosperma, por vezes com os cotilédones pouco desenrolados. A família Clusiaceae, constituída por cerca de 50 géneros, inclui 1500 espécies que ocorrem predominantemente em zonas temperadas. A subfamília Hypericoideae (Cronquist, 1981, *in* Curtis e Lersten, 1990)

¹Estruturas com a forma de escama, localizadas no caule de muitas plantas vasculares, junto à bainha das folhas.

²Com simetria radial

³Quando o ovário, livre, está posicionado na flor mais acima que o encaixe das pétalas

⁴Inflorescências onde os eixos laterais crescem mais que o eixo central, terminando todos eles numa flor

⁵Quando o óvulo sofre torção de forma que o micropilo fica ao lado do hilo

⁶Óvulo que apresenta uma curvatura de 90° em relação à sua base

⁷A cápsula abre-se longitudinalmente ao longo dos septos dos lóculos, separando-se a parte correspondente do carpelo.

⁸A cápsula abre por fendas longitudinais que separam completamente a face dorsal dos carpelos dos septos.

compreende fundamentalmente o género *Hypericum*, o maior género da família Clusiaceae.

Ao género *Hypericum* pertencem plantas perenes ou sufrútices⁹, incluindo árvores (no caso de algumas espécies não europeias), com canais ou bolsas esquizogénicas cheias de resina (cor âmbar), de óleos essenciais (translúcidos) e/ou com nódulos de hipericina e pseudohipericina (cor vermelha a negra). Os caules menos jovens têm 2-4 nervuras realçadas em cada entrenó. As folhas são geralmente opostas (apenas na secção *Coridium* são verticiladas), inteiras ou com aurículas¹⁰ fimbriado-granulosas na base, sem estípulas. As flores são hermafroditas, com 5 sépalas nas espécies ibéricas. As pétalas igualmente em número de 5 (também nas espécies ibéricas) são livres, amareladas e por vezes com a página inferior rosada. Os estames, de 12-30, estão agrupados em 3-5 fascículos nas espécies ibéricas, sendo os filetes livres ou fundidos até metade do seu comprimento. Os estaminódios, quando presentes, são escamiformes e apresentam-se reunidos em 3 fascículos que alternam com os estames férteis. Os carpelos são de 3 a 5, nas espécies ibéricas, e tal como os estiletos são igualmente livres. O fruto é uma cápsula com deiscência septicida, com 3-5 válvas, podendo por vezes ser indeiscente, drupáceo. As sementes são numerosas, cilíndricas, ovóides ou elipsoidais e papiráceas (Garmendia e Aedo, 2005).

Este género é constituído por cerca de 450 espécies que ocorrem em zonas temperadas e subtropicais, essencialmente no hemisfério norte. As espécies apresentam grande variabilidade morfológica e estrutural. As diferenças morfológicas mais evidentes dizem respeito ao tamanho e forma das flores e folhas e à dimensão e distribuição das estruturas secretoras nos diferentes órgãos. Embora todos os membros do género apresentem glândulas translúcidas, apenas alguns apresentam nódulos negros (Curtis e Lersten, 1990).

Em Portugal, o género *Hypericum* é representado por 17 espécies, sendo uma delas endémica dos Açores e três endémicas da Madeira (Franco, 1971 e Tebbs, 1994 *in* Nogueira *et al.*, 2007).

⁹ Subarbusto; planta lenhosa só na base ou na parte inferior, parecida a um arbusto mas de altura pouco elevada

¹⁰ Lóbulo foleáceo normalmente de pequena dimensão situado na base do limbo, perto do pecíolo

1.2. Usos Etnofarmacológicos

No séc. I Dioscórides, na sua enciclopédica obra “*Matéria Médica*”, em que referencia cerca de 600 espécies, menciona *Hypericum*, possivelmente referindo-se a *H. perforatum* e/ou *H. perforatum*. Na Grécia Antiga as espécies do género *Hypericum* eram muito conhecidas pelo seu poder cicatrizante. Hoje, de um modo geral são usadas no tratamento de feridas, queimaduras, reumatismo, gastroenterites, úlceras, enurese e para problemas do foro neurológico (histeria, estados depressivos leves a moderados, ansiedade e dores nevralgias) (Miller, 1998).

H. perforatum é utilizado desde a Antiguidade Clássica pelas suas propriedades medicinais, sendo referido como eficaz para problemas neurológicos e gastrointestinais e para tratamento de úlceras, diabetes, resfriados e icterícia. É também considerado um bom balsâmico contra problemas uro-genitais, intestinais e pulmonares, pelo que tem vindo a ser usado no tratamento da bronquite, asma e cistite crónica (uso interno). Macerações oleosas das folhas e flores são recomendadas para uso externo, para aplicar sobre queimaduras, inflamações cutâneas e ulcerações de diversas naturezas, devido às propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias que lhe são atribuídas. Para além disso, é também utilizado em medicina tradicional Turca para problemas hepáticos e biliares (Baytop, 1984: *in* Öztürk *et al.*, 2007). *H. perforatum* é uma espécie fotossensibilizadora, apesar de não ser tanto como *H. perforatum*, pelo que se deve evitar a exposição à luz solar após o seu uso interno ou externo (Lieutaghi, 2002).

Outras espécies de *Hypericum* (*H. japonicum*, *H. perforatum*, *H. perforatum*, *H. lydium* e *H. papuanum*) são também ainda hoje utilizadas em medicina tradicional (uso oral e tópico) para curar e prevenir feridas e queimaduras (Öztürk *et al.*, 2007).

As espécies de *Hypericum* utilizadas em medicina popular são colectadas localmente durante os meses de Verão, sendo as suas folhas e caules secos e armazenados para usar no Inverno (Pieroni *et al.*, 2004). Algumas espécies são utilizadas sob a forma de infusões, outras como *H. hircinum* são utilizadas sob a forma de decocções, puras ou em misturas com outras espécies.

Em Portugal, três espécies são utilizadas como plantas medicinais, *H. androsaemum* (Hiperião do Gerês), *H. perforatum* (Milfurada) e *H. undulatum* (Hiperião Kneip) (Nogueira *et al.*, 1999). As folhas de *H. androsaemum* são usadas pelas suas propriedades diuréticas e hepatoprotectoras (Costa, 1994, *in* Valentão *et al.*, 2004). A infusão de flores e folhas é recomendada no tratamento de infecções das vias urinárias e para cólicas renais. Para além

disso, é muito utilizado como estomáquico e colagogo. *H. perforatum* e *H. undulatum* são espécies também recomendadas pelas suas propriedades diuréticas e hepatoprotectoras mas são essencialmente usadas para tratamento de estados depressivos moderados, ansiedade e insónia.

No arquipélago da Madeira, para além do *H. perforatum* e *H. humifusum*, são utilizadas algumas espécies endémicas como *H. glandulosum* Aiton e um híbrido naturalizado *H. inodorum* Mill., resultante do cruzamento entre *H. hircinum* e *H. androsaemum*. Estas espécies são usadas sob a forma de infusões, especialmente para infecções nas vias urinárias, sendo ainda *H. perforatum* utilizado para tratar a gota e *H. hircinum* para problemas de fígado (Rivera e Obón, 1995).

Para além do uso de diferentes espécies de *Hypericum* em medicina popular é também frequentemente referida a utilização de algumas espécies na alimentação, nomeadamente na preparação de bebidas alcoólicas, e no fabrico de cosméticos (Costa, 1975 e Costa, 1987 in Nogueira *et al.*, 1999).

1.3. Fitoquímica

As propriedades medicinais atribuídas às diferentes espécies de *Hypericum*, levaram nas últimas décadas a numerosos estudos fitoquímicos. Embora *H. perforatum* seja a espécie mais estudada, de um modo geral os estudos fitoquímicos em espécies de *Hypericum* revelam a presença de óleos essenciais, ricos em hidrocarbonetos monoterpénicos (α -pineno, β -pineno, limoneno) e hidrocarbonetos sesquiterpénicos (β -cariofileno, germacreno D) (Wu *et al.*, 1998), e de um grande número de compostos fenólicos como floroglucinóis (hiperforina e adhiperforina), naftodiantronas (hipericina, pseudohypericina, protohypericina e pseudoprotohypericina), biflavonóides (I3, I18-biapigenina), flavonóis (rutina, hiperósido, quercetina, quercitrina, e isoquercitrina), ácidos fenólicos (ácido clorogénico) (Patocka, 2003 in Hosni *et al.*, 2010), taninos, xantonas e cumarinas (Erken *et al.*, 2001).

Num estudo realizado na Sérvia sobre composição de óleos essenciais de várias espécies de *Hypericum*, tais como, *H. alpinum*, *H. barbatum*, *H. rumeliacum*, *H. maculatum*, *H. perforatum* e *H. hirsutum* verificou-se que as espécies da secção *Drosocarpium* (*H. alpinum*, *H. barbatum*, *H. rumeliacum*) são ricas em hidrocarbonetos monoterpénicos enquanto que as

incluídas na secção *Hypericum* (*H. maculatum*, *H. perforatum*) são ricas em hidrocarbonetos sesquiterpénicos (Saroglou *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais de *H. perforatum* estudados em diferentes populações da Europa e Norte de África apresentam diferenças não só no rendimento do óleo mas também nos compostos maioritários. Assim os óleos provenientes de populações da Grécia têm como componentes maioritários o α -pineno, *n*-nonano e δ -cadineno (Couladis *et al.*, 2001), enquanto que os provenientes de populações da Argélia e Tunísia têm como compostos maioritários o timol, T-cadino e 4,5-dimetil-2-etilfenol (Touafek *et al.*, 2005) e o α -pineno, *allo*-aromadendreno e germacreno-D (Hosni *et al.*, 2008), respectivamente. Em Portugal, os óleos desta espécie, de composição mais similar aos provenientes de populações da Grécia, apresentam como compostos maioritários o α -pineno e *n*-nonano (Nogueira *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais de *H. tomentosum* estão ainda muito pouco estudados, havendo referência na literatura a apenas um estudo na Tunísia, em que o óleo apresenta como compostos principais a mentona, o *n*-octano e o β -cariofileno (Hosni *et al.*, 2008).

No que se refere à presença de compostos fenólicos e seus derivados, *H. perforatum* é a espécie mais bem estudada. Em extractos metanólicos de espécimens provenientes da Tunísia, referem-se como constituintes maioritários flavonóis (rutina e hiperósido), floroglucinóis (hiperforina) e naftodiantronas (hipericina) (Hosni *et al.*, 2010). Já em extractos metanólicos de *H. perforatum* de plantas da Turquia são os fenólicos (ácido clorogénico) e flavonóis os componentes maioritários (Çirak *et al.*, 2007). Enquanto que nos extractos metanólicos de *H. hircinum* os constituintes maioritários são ésteres de metilo do ácido clorogénico, quercetina, quercitrina e biapigenina (Pistelli *et al.*, 2000, *in* Piovani *et al.*, 2004). De um modo geral considera-se *H. perforatum* como um bom produtor de hiperósido, pseudohipericina e ácido clorogénico (Çirak *et al.*, 2007) e *H. perforatum* como a espécie que produz maior quantidade de hipericina.

Em extractos de *H. elodes*, uma espécie pouco estudada do ponto de vista fitoquímico, foram identificados compostos fenólicos, nomeadamente antraquinonas e naftodiantronas (Koch, 2001) e hipericina (Piovani *et al.*, 2004).

Dos compostos fenólicos, os mais representativos do género são as naftodiantronas (hipericina, pseudohipericina, protohipericina e isohipericina) e os floroglucinóis prenitados (hiperforina). A hipericina está presente em todas as espécies que apresentam glândulas negras ou vermelhas, sendo considerada como um marcador químico das espécies de *Hypericum*. A hiperforina, inicialmente só encontrada em *H. perforatum* (Umek *et al.*, 1999), também existe em *H. elodes* (Piovan *et al.*, 2004) tendo sido recentemente detectada em outras

espécies do género *Hypericum* como *H. barbatum*, *H. richeri*, *H. rumeliacum*, *H. maculatum*, *H. tetrapterum*, *H. hirsutum*, *H. linarioides* e *H. olympicum*, mas em quantidades muito pouco elevadas (Smelarovic e Spiteller, 2006).

Em Portugal, os estudos fitoquímicos em *Hypericum* têm incidido essencialmente em *H. perforatum* (Nogueira *et al.*, 1999; Nogueira *et al.*, 2008) e *H. androsaemum* (Guedes *et al.*, 2003; Guedes *et al.*, 2004; Valentão *et al.*, 2002; Nogueira, 1999; Valentão *et al.*, 2004). Contudo, outras espécies têm também sido estudadas, por exemplo Santos *et al.* (1999) estudaram a composição dos óleos essenciais de *H. foliosum* de cinco ilhas dos Açores e Nogueira (2002) as composições dos óleos essenciais de diferentes populações dos treze taxa do género que ocorrem em Portugal continental.

1.4. Actividade biológicas de extractos e/ou de compostos isolados do género *Hypericum*

As espécies de *Hypericum* têm grande valor económico devido á presença de numerosos compostos bioactivos com uma vasta gama de aplicações na industria farmacêutica. De um modo geral, as espécies de *Hypericum* que têm hipericina e/ou hiperforina, possuem actividade antidepressiva e antimicrobiana (Bhattacharya *et al.*, 1998). A actividade antidepressiva foi não só demonstrada a nível experimental mas também a nível clínico (Öztürk *et al.*, 1996; Öztürk, 1997; Okponyi e Weischer, 1987, *in* Öztürk *et al.*, 2007). O composto activo isolado de *H. perforatum*, a hiperforina, é utilizado amplamente no tratamento de depressões leves e moderadas, apresentando reduzidos efeitos adversos e boa tolerabilidade por parte dos pacientes.

H. scabrum, *H. sabroides* e *H. triquetrifolium* têm propriedades antimicrobianas (Kizil *et al.*, 2004, *in* Saroglou *et al.*, 2007) tal como *H. calycinum* (Gronquist *et al.*, 2001) e *H. coris* que é activo contra *Saccharomyces cerevisiae* (Schwob *et al.*, 2002, *in* Saroglou *et al.*, 2007). Os extractos metanólicos de *H. hircinum* apresentaram uma potente actividade contra *Staphylococcus aureus*, mas os seus compostos isolados e purificados não demonstraram qualquer tipo de actividade antimicrobiana (Pistelli *et al.*, 2000). *H. perforatum* e *H. scabrum* têm actividade antibacteriana devido à presença de hiperfoliatina (Rego, 2007) e os óleos essenciais de *H. linarioides*, *H. hyssopifolium*, *H. heteropyllum* e *H. perforatum* apresentam

propriedades antifúngicas (Çakir *et al.*, 2004; Çakir *et al.*, 2005, Hosni *et al.*, 2010).

A actividade hepatoprotectora atribuída a diferentes espécies de *Hypericum* foi demonstrada em roedores tratados com extractos alcoólicos de *H. perforatum* (Öztürk *et al.*, 1992; Herekman-Domir *et al.*, 2001, *in* Öztürk *et al.*, 2007). Contudo, em *H. androsaemum*, outra espécie tida como hepatoprotectora, verificou-se que, contrariamente ao esperado, aumentou a intensidade da desordem hepática (Valentão *et al.*, 2004).

Os extractos de *H. perforatum* demonstraram um largo espectro de actividades biológicas. São anti-tumorais (Duke, 1985), citotóxicos (Hosni *et al.*, 2010) e antivirais, nomeadamente contra o vírus HIV (Serkedjieva *et al.*, 1990; Wood *et al.*, 1990; Pei-Gen, 1994, *in* Öztürk *et al.*, 2007). Para além disso, em experiências realizadas em animais, os extractos de *H. perforatum* revelaram-se eficazes no combate a situações de abuso e dependência de álcool, nicotina e cafeína (Perfumi *et al.*, 2005; Uzbay *et al.*, 2006; Coskun *et al.*, 2006 Öztürk *et al.*, 2007). Em ensaios clínicos comprovou-se ainda o efeito cicatrizante do seu óleo essencial, que aumenta a reconstrução epitelial promovendo a cicatrização de feridas comuns e cirúrgicas (Lavagna *et al.*, 2001; Öztürk *et al.*, 2007). A actividade cicatrizante de *H. perforatum* e *H. scabrum* foi também verificada, confirmando-se que se deve à presença de hiperfoliatina. (Rego, 2007).

A actividade antioxidante foi recentemente revelada em extractos metanólicos de *H. perforatum* (Hosni *et al.*, 2010) apesar de ter já sido demonstrada em extractos de *H. triquetrifolium* (Couladis *et al.*, 2002) e de *H. androsaemum* (*in vitro*) (Valentão *et al.*, 2002).

De um modo geral, dos metabolitos secundários que ocorrem nos extractos de *H. perforatum*, a hipericina e a pseudohipericina apresentam actividade fotodinâmica, antiviral, antiretroviral, antibacteriana, antipsoriática, antidepressiva e antitumoral (Guedes e Eriksson, 2005). A hiperforina, outro metabolito maioritário nesses extractos, apresenta também actividade antidepressiva, inibindo de forma não selectiva a absorção sináptica de vários neurotransmissores (Müller, 2005, *in* Boubakir *et al.*, 2005), actividade antibiótica (Schempp *et al.*, 1999, *in* Boubakir *et al.*, 2005) e antitumoral, por indução de apoptose (Schempp *et al.*, 2002, *in* Boubakir *et al.*, 2005).

1.5. Estruturas secretoras

Nos órgãos vegetativos e florais das espécies de *Hypericum* são frequentes diversas estruturas secretoras, onde ocorre a síntese e/ou a acumulação dos compostos biologicamente

activos atrás referidos. A grande variedade de estruturas secretoras internas, que ocorre neste género permite distinguir os diferentes taxa infragenéricos (Keller, 1895, *in* Curtis e Lersten, 1990; Robson, 1977, *in* Ciccarelli *et al.*, 2001a).

Curtis e Lersten (1990) na introdução do estudo que publicaram em *H. perforatum* e *H. balearicum* apresentam uma excelente recolha bibliográfica sobre numerosos estudos anatómicos realizados no séc. XIX em espécies de *Hypericum*. Para além da descrição anatómica dos dois principais tipos de estruturas secretoras que ocorrem nessas espécies, glândulas translúcidas e nódulos resinosos, os autores do séc. XIX estudaram ainda o processo de formação das bolsas. As opiniões contraditórias sobre a ontogenia esquizogénica ou lisigénica dessas estruturas secretoras deram origem a uma controvérsia que se prolongou até aos nossos dias. Em *H. perforatum*, Curtis e Lersten (1990) mostraram que as glândulas translúcidas têm uma origem esquizogénica, facto que foi confirmado mais tarde por Ciccarelli *et al.* (2001a). Recentemente o isolamento de glândulas translúcidas em folhas de *H. perforatum* e a análise química do seu conteúdo mostraram que estas estruturas produzem e acumulam essencialmente hiperforina (Soelberg *et al.* 2007). A biossíntese deste composto e do óleo essencial parecem estar intimamente relacionados, o que reforça a hipótese de que as glândulas translúcidas são o local de síntese e acumulação deste floroglucinol.

Os nódulos vermelhos ou negros, estruturas sólidas e resinosas, ricas em hipericina, foram classificados de acordo com a sua distribuição, por alguns autores como Franco (1971), de marginais, intramarginais e superficiais. Este autor, refere ainda que em várias espécies, as glândulas vermelhas que ocorrem no ovário e na cápsula se assemelham a cordões ou bolhas, que designa por vitas, se planos ou levemente entumescidos e por vesículas se distintamente entumescidos. No estudo de 1990, Curtis e Lersten chegaram à conclusão de que os nódulos de *H. perforatum* não apresentam, como alguns autores do séc. XIX tinham mencionado, um espaço intercelular central e que as células constituintes contêm material granular não resinoso. Os mesmos autores referem que nas pétalas desta mesma espécie observaram estruturas híbridas (constituídas parcialmente por uma cavidade e por um nódulo), que designam por “tubos híbridos”. Na outra espécie de *Hypericum* que estudaram (*H. balearicum*) observaram que alguns nódulos parecem transformar-se em cavidades irregulares durante o desenvolvimento dos órgãos. Mais recentemente, a anatomia e ultraestrutura dos nódulos das folhas de *H. perforatum* foram estudadas por Fornasiero *et al.* (1998), Ciccarelli *et al.* (2001a, b) e Onelli *et al.* (2002). De um modo geral estes estudos confirmaram as observações anatómicas realizadas por Curtis e Lersten (1990), contudo nenhum destes autores se refere aos tubos híbridos.

Para além destas estruturas secretoras, Metcalfe e Chalk (1950), no seu Tratado Anatómico sobre Dicotiledóneas, referem também neste género a presença de idioblastos taniníferos, especialmente no córtex do caule e de canais secretores no floema do caule, pecíolo e nervuras da folha. A presença de canais secretores é também referida em *H. perforatum* por Curtis e Lersten (1990) e por Ciccarelli *et al.* (2001a) e em *H. elodes* por Bottega *et al.* (1999). Estes últimos autores descrevem ainda a ocorrência de emergências glandulares na margem das sépalas e brácteas, estruturas anteriormente referidas por Pereira Coutinho (1950) e Robson (1981 *in*, Bottega *et al.*, 2004). Embora a presença de emergências com uma cabeça glandular compacta de cor vermelha e estrutura muito semelhante à dos nódulos tenha sido referida em algumas espécies de *Hypericum*, a sua caracterização anatómica é ainda muito incompleta.

Para além destes estudos morfo-anatómicos conhece-se apenas da bibliografia mais dois outros estudos, um em *H. richeri* (Fornasiero *et al.*, 2000) e outro muito pouco pormenorizado em oito espécies de *Hypericum* (*H. androsaemum*, *H. hirsutum*, *H. hyssopifolium*, *H. montanum*, *H. perforatum*, *H. richeri* e *H. tetrapterum*) (Maggi *et al.*, 2004) Ao rever a bibliografia sobre anatomia e ultraestrutura das glândulas que ocorrem no género *Hypericum*, percebe-se quão pertinentes são os comentários de Curtis e Lersten (1990) que chamaram a atenção para a necessidade de mais estudos anatómicos em espécies de *Hypericum*, para se compreender a ontogenia e desenvolvimento dos nódulos e das estruturas híbridas.

2. BREVE CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ESPÉCIES EM ESTUDO

2.1. *Hypericum elodes* L.

É uma espécie herbácea perene, com caules erectos e roliços de 7 a 30 cm, de tomentosos a pubescentes, não apresentam ramos estéreis. As folhas, com 6-19 x 5-19 mm, são arredondadas ou ovaladas, obtusas, subamplexicaules e tomentosas com glândulas translúcidas muito pequenas. As brácteas, com cerca de 1 mm, são lanceoladas a oblanceoladas, glabras com glândulas vermelhas marginais curtamente pediceladas ou sésseis.

As sépalas, 3-4,5 mm, são lanceoladas, obtusas ou acutiúsculas¹¹, imbrincadas e glabras, com glândulas vermelhas exclusivamente marginais. As pétalas, com 8-10 mm, são debilmente emarginadas e imbrincadas em forma de tubo. A cápsula ovóide com 5 a 7 mm apresenta vitas longitudinais. As sementes são muito pequenas e pardas. Esta espécie apresenta $2n=20$ cromossomas.

H. elodes é um helófito que ocorre semi-submerso em águas superficiais, em solos encharcados ou em solos húmidos, principalmente em substratos ácidos.

Este taxon ocorre essencialmente no noroeste de Portugal, podendo também ser encontrado nas ilhas do Pico e de São Miguel (Açores). É uma espécie endémica da Europa, da qual não se encontraram referidos nomes vulgares.

2.2. *Hypericum perforatum* L.

É uma espécie herbácea perene, glabra, que chega a medir 80 cm de altura. O caule apresenta por vezes 2 linhas longitudinais, entrenós apicais negros (violeta-escuro) e raramente tem ramos estéreis. As folhas, com 8-50 x 3-28mm, são semi-aplexicaules, de ovaladas a lanceoladas, obtusas, com glândulas translúcidas e glândulas negras marginais e intramarginais. As brácteas, com 3-4 mm, são lanceoladas, com glândulas marginais largamente pediceladas e algumas laminares. As sépalas, com cerca de 5 mm, são obtusas ou subagudas, com 10-20 glândulas negras laminares, puntiformes ou lineares e marginais, pediceladas. As pétalas, com 8-12 mm, têm glândulas negras marginais, pediceladas, intramarginais e laminares. Cada antera apresenta um nódulo negro e a cápsula, com 8 a 10 mm, é ovóide e possui vitas dorsais e vesículas proeminentes, arredondadas ou elipsoidais, algumas dispostas obliquamente. A semente, com cerca de 1 mm, apresenta cor amarela pálida. A espécie apresenta $2n=14$ cromossomas.

H. perforatum é um hemicriptófito que ocorre em locais húmidos e frescos, em solos calcários ou basálticos. Em Portugal distribui-se maioritariamente no centro e sul do país e é vulgarmente conhecido por Hiperião-celheado ou Erva-das-sete-sangrias.

¹¹ Em forma de agulha.

2.3. *Hypericum pubescens* Boissier

É um hemiptófito perene que pode crescer até 80 cm. Apresenta caules lanuginosos a pubescentes em geral com ramos estéreis e sem nervuras realçadas. As folhas têm 7-35 x 3-18 mm, margens avermelhadas e nervuras secundárias reticuladas e translúcidas, apresentando glândulas translúcidas laminares e glândulas negras laminares e intramarginais, duas delas apicais. As brácteas e as sépalas, com 7 a 10 mm, são linear-lanceoladas, pubescentes com glândulas negras intramarginais e marginais, sésseis e pediceladas. As pétalas, com 9-14 mm, têm glândulas negras marginais ou intramarginais. Cada antera possui uma glândula negra e a cápsula, com 6-7 mm, ovóide, apresenta vitas longitudinais. As sementes, muito pequenas, são pardas. O cariótipo desta espécie é constituído por $2n=18$ cromossomas.

H. pubescens, muito raro em Portugal, ocorre em locais húmidos no Baixo Alentejo e Estremadura. Não há referências a nomes vulgares.

2.4. *Hypericum tomentosum* L.

É um hemiptófito vivaz que pode chegar aos 90 cm de altura. O caule, tomentoso a pubescente, apresenta geralmente ramos estéreis incipientes, sem linhas realçadas. As folhas, 5-15 x 2-8 mm, são subamplexicaules, de ovaladas a elípticas, obtusas, pubescentes com glândulas negras laminares e intramarginais, duas delas apicais, e glândulas translúcidas. As brácteas e sépalas, com 3-6 mm, são lanceoladas, pubescentes com glândulas negras apenas marginais, pediceladas ou não, sendo geralmente uma apical. As pétalas, com 5-12 mm, apresentam um número reduzido de glândulas negras laminares e marginais. Cada antera apresenta uma glândula negra. A cápsula, com 3-6 mm, é ovóide com vitas longitudinais. A semente é parda. O número de cromossomas típico é $2n=16$.

Este taxon ocorre em solos húmidos ou temporariamente encharcados no centro e sul de Portugal, podendo pontualmente ser encontrada no norte de Portugal. Esta espécie é vulgarmente conhecida por Pericão branco, Milfurada peluda ou Erva tomentosa de São João.

3. OBJECTIVOS E PLANO GERAL DA DISSERTAÇÃO

Apesar da intensa investigação fitoquímica realizada em espécies de *Hypericum*, são ainda muito escassos os estudos morfo-anatómicos das estruturas secretoras que se encontram distribuídas nos diferentes órgãos vegetativos e florais. Sobre este assunto, o conhecimento é ainda muito reduzido e fragmentário, estando apenas bem estudadas as glândulas de *H. perforatum*.

Com o presente trabalho pretende-se comparar por Microscopia Electrónica de Varrimento, o tipo e padrão de distribuição das diferentes estruturas secretoras que ocorrem nos órgãos vegetativos e florais de quatro espécies de *Hypericum* (*H. elodes*, *H. perforatum*, *H. pubescens* e *H. tomentosum*) da flora Portuguesa. É ainda nosso objectivo comparar por Microscopia Óptica, a anatomia das diversas glândulas, estudar a sua ontogenia e caracterizar histoquimicamente os principais grupos de compostos químicos presentes nos secretados.

Para além disso pretende-se também avaliar a actividade antifúngica dos óleos essenciais e extractos etanólicos das partes aéreas em fase de floração de *H. elodes*, *H. perforatum* e *H. tomentosum* e dos extractos etanólicos dos mesmos órgãos de *H. elodes* e *H. perforatum*.

A dissertação está organizada em seis capítulos. No primeiro, a Introdução, apresenta-se o género *Hypericum*, fazendo-se referência ao seu enquadramento taxonómico, usos etnobotânicos e propriedades farmacológicas das espécies. Está também incluído neste capítulo uma breve descrição morfológica das espécies em estudo. No segundo capítulo, faz-se referência à proveniência do material vegetal e descreve-se detalhadamente os métodos utilizados no seu estudo. No terceiro e quarto capítulos apresentam-se e discutem-se os resultados. As conclusões estão sumarizadas no quinto capítulo e no sexto incluem-se as perspectivas de investigação futura. Por último referem-se as fontes bibliográficas e apresentam-se as estampas.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

Utilizaram-se neste trabalho ramos vegetativos e florais de plantas de *H. elodes* L., *H. perforiatum* L., *H. pubescens* Boissier e *H. tomentosum* L. colhidos em populações naturais. *H. elodes* foi colhido na Apostiça (Sesimbra) em Julho, *H. perforiatum* em Alter do Chão (Alentejo) em Maio, *H. pubescens* em Serpa (Brinches) em Junho e *H. tomentosum* em Pêro Pinheiro (Sintra) em Junho.

De todas as populações estudadas foram herborizados espécimens que se encontram depositados no LISI (Herbário do Instituto Superior de Agronomia de Lisboa) com os seguintes códigos 126/2003, 109/2003, 118/2003 e 220/2003, respectivamente.

De *H. elodes*, *H. perforiatum* e *H. tomentosum* foram colhidas sementes para se efectuar a sua cultura de modo a poder seguir a ontogenia das estruturas secretoras durante fases precoces do desenvolvimento das plantas.

As sementes após terem sido imersas em água durante 12 h foram colocadas em caixas de petri sobre papel de filtro embebido em água e sujeitas a um fotoperíodo 8/16. As plântulas, quando apresentavam dois a três pares de folhas, foram transplantadas para *Jiffy pellets*¹² (JIFFY Products, Norway), previamente expandidos em água e mantidos num regime de luz semelhante ao anteriormente referido.

Quando as plantas atingiram cerca de 5-7 cm de altura, foram transferidas para vasos com terra bem adubada e mantidos em condições ambientais.

2. MÉTODOS

2.1. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

A morfologia das estruturas glandulares, assim como a sua distribuição nos diferentes órgãos foi estudada por SEM.

Folhas, caules e flores em diversos estádios de desenvolvimento foram retirados das quatro espécies em estudo, seccionados e fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, a pH 7,2 durante 72h a 4°C. O material foi de seguida lavado no tampão da solução fixadora (3 x 20min.) e desidratado numa série crescente de etanol, 15 min. em cada concentração e 1h em etanol absoluto (3 x 20 min.). De seguida, transferiram-se os espécimes para uma solução de etanol/acetona (1:1 v/v) durante 1h (3 x 20 min.) e ulteriormente para acetona absoluta durante 1h (3 x 20 min.) onde se mantiveram até serem secas pelo método do ponto crítico do CO₂ num Critical Point Drier BIO-RAD (Microscience Division, Watford). As amostras secas foram montadas em porta-objectos e por fim metalizados com ouro num evaporador Freeze Drier POLARON E5300. As observações foram realizadas num microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM-T220 (JEOL L^{td}, Tokyo, Japan), a 15 e 20kV, tendo as imagens sido registadas em película negativa a preto e branco KODAK Tmax 100 pro, com uma câmara fotográfica MAMIYA 6x7 (JEOL L^{td}, Tokyo, Japan).

¹² Os *Jiffy pellets* são feitos de trufa prensada rica em esfagno proveniente de pântanos seleccionados. A trufa é enriquecida com lima e com um fertilizante especial com baixo conteúdo em amónia de forma a estimular o crescimento. Os *pellets* têm um pH que ronda os 5.3 e estão envolvidos numa rede fina e degradável.

2.2. Microscopia Óptica

2.2.1 Histoquímica em Material Fresco

Secções transversais de folhas, sépalas e caules das quatro espécies em estudo foram feitas á mão e submetidas a vários testes histoquímicos, para detecção das classes de compostos químicos maioritariamente presentes no secretado: Vermelho Sudão IV, Negro Sudão B (Pearse, 1980) e Sulfato Azul do Nilo (Cain, 1947) em Luz Visível e Vermelho Neutro (Kirk, 1975) em luz UV para detecção de lípidos totais; Tetróxido de Ósmio (Ganter e Jollès, 1969 - 1970) para detecção de lípidos insaturados; Reagente de Nadi (David e Carde, 1964) para a detecção de terpenóides; Cloreto de Ferro III (Johansen, 1940) e Dicromato de Potássio (Gabe, 1968) para a detecção geral de fenóis e Vermelho de Ruténio (Johansen, 1940) para a detecção de pectinas e mucilagens vegetais. Os flavonóides foram detectados por indução de fluorescência com Cloreto de Alumínio, Acetato Neutro de Chumbo (Charrière-Ladreix, 1976) e 2-Aminodifeniletalburinato (Neu e Neuhoff, 1957 *in*: Opitz *et al.*, 2003). Os alcalóides foram detectados por coloração com Reagente de Wagner, Reagente de Dittmar (Furr e Mahlberg, 1981) e Reagente de Dragendorff (Svendsen e Verpoorte, 1983) enquanto que os esteróis foram detectados por reacção com Tricloreto de Antimónio (Hardman e Sofowora, 1972).

As observações foram efectuadas num microscópio óptico LEITZ-DIALUZ (Wetzlar, Alemanha) equipado com uma lâmpada de tungsténio de 12V e condensador de contraste interferencial de Nomarski e num microscópio de epifluorescência LEITZ-SM-LUX (Wetzlar, Alemanha) equipado com um bloco de filtros A (filtros de excitação BP 340-380 nm, espelho dicróico e filtro de passagem LP-515) sendo as imagens adquiridas por uma câmara Leitz Vario-Orthomat (Wetzlar, Alemanha) e por uma câmara Leica Wild MPS52, respectivamente, e registadas em filme FUJI 64T e Provia 400X, respectivamente. Algumas observações foram também efectuadas num microscópio Leica DM2500 sendo as imagens adquiridas por uma câmara digital DFC500.

A. Caracterização de Lípidos Totais

1. Detecção de Lípidos Totais

1.1. Em Luz Visível

a) Negro de Sudão B ou Vermelho de Sudão IV (Pearse, 1980)

1. Solução saturada de Negro de Sudão B ou Vermelho de Sudão IV (0,3%) em Etanol 70% (filtrar antes de usar), 30 min.
2. Lavagem rápida em etanol 70%
3. Lavagem rápida em água

Controlo Positivo: Aplicar numa rodela de papel de filtro padrões dissolvidos em clorofórmio e secretado da planta. Tratar como tecido vegetal.

Controlo Negativo: cortes, previamente tratados com Metanol/Clorofórmio/ Água/Ácido Clorídrico (66:33:4:1) durante 3h, á temperatura ambiente, são submetidos à coloração por estes lisocromos.

Resultado: os lípidos coram de azul-escuro ou vermelho, respectivamente.

1.2. Em UV

a) Vermelho Neutro (Kirk, 1975)

1. Solução de Vermelho Neutro a 0,1% em Tampão Fosfato de Sódio a 0,1% pH 6,5, 10-20 min.
2. Lavagem rápida em água

Controlo Negativo: idêntico ao referido em A.1.1 a).

Resultado: fluorescência amarela ou azul esverdeada, dependendo da composição dos diferentes tipos de lípidos.

2. Detecção de Lípidos Insaturados

2.1. Em Luz Visível

a) **Tetróxido de Ósmio** (Ganter e Jollès, 1969)

1. Solução de Tetróxido de Ósmio a 0,1% durante 60 min., na *hotte*
2. Lavagem rápida em água

Controlo Negativo: idêntico ao referido em A.1.1 a).

Resultado: os lípidos insaturados coram de negro.

3. Detecção de Lípidos Ácidos e Neutros

3.1. Em Luz Visível

b) **Sulfato Azul do Nilo** (Cain, 1947)

1. Solução de Sulfato Azul do Nilo 1%, a 37°C
2. Solução de Ácido Acético a 1%
3. Lavagem rápida em água

Controlo Positivo: Aplicar numa rodela de papel de filtro padrões dissolvidos em clorofórmio e secretado da planta. Tratar como tecido vegetal.

Controlo Negativo: cortes, previamente tratados com Metanol/Clorofórmio/ Água/Ácido Clorídrico (66:33:4:1) durante 3h, à temperatura ambiente, são submetidos a coloração por este corante.

Resultado: os lípidos neutros coram de rosa e os lípidos ácidos assim como todas as substâncias basófilas da célula coram de azul.

B. Caracterização de Terpenóides

1. Em Luz Visível

1.1 Detecção de Óleos Essenciais e Resinas

a) **Reagente de Nadi** (David e Carde, 1964)

1. Reagente de Nadi¹³ recém-preparado, 60 min., no escuro
2. Lavagem em Tampão Fosfato de Sódio 0,1 M a pH 7,2 durante 2 min.

Controlo Negativo: idêntico ao referido em A.1.1 a).

Resultado: os óleos essenciais coram de azul e os ácidos resínicos coram de vermelho escuro. As misturas de óleos essenciais e resinas dão origem a colorações que vão do violeta ao púrpura de acordo com a predominância de cada um destes componentes.

1. Detecção de Esteróides

b) **Tricloreto de Antimónio** (Hardman e Sofowora, 1972)

1. Montar directamente os cortes numa solução saturada de Tricloreto de Antimónio em Ácido Perclórico a 60%
2. Observar ao fim de 3 min.

Controlo Positivo: Aplicar numa rodela de papel de filtro padrões dissolvidos em clorofórmio e secretado da planta. Tratar como tecido vegetal.

Controlo Negativo: Cortes previamente tratados com uma solução de Tetraidreto Boreto de Sódio a 1% (recém preparado) durante 10 min., seguido de lavagem em Água (3 x 15 min.). Realizar também um controlo utilizando apenas Ácido Perclórico.

Resultado: Os esteróides coram de vermelho-alaranjado.

¹³ Juntar 0,5 ml de α -naftol a 0,1% em Etanol a 40%, 0,5 ml de Cloridrato de Dimetilparafenileno Diamina a 1% e 49 ml de Tampão Fosfato de Sódio 0,05 M a pH 7,2

C. Caracterização de Hidratos de Carbono

1. Detecção de Pectinas

1.1 Em Luz Visível

a) **Vermelho de Ruténio** (Johansen, 1940)

1. Solução Vermelho de Ruténio a 1000 ppm, recém-preparada, durante 15 min.
2. Lavagem rápida em água

Resultado: as pectinas e as mucilagens vegetais coram de rosa brilhante.

D. Caracterização de Compostos Fenólicos

1. Detecção Geral de Compostos Fenólicos

1.1 Em Luz Visível

a) **Cloreto de Ferro III** (Johansen, 1940)

1. Solução de Cloreto de Ferro III a 10% durante 15 a 30 min.
2. Lavagem rápida em água

Controlo Positivo: aplicar numa rodela de papel de filtro padrões dissolvidos em Metanol e secretado da planta. Tratar como o tecido vegetal.

Resultado: os fenóis coram de verde intenso, púrpura azul ou negro.

b) **Dicromato de Potássio** (Gabe, 1968)

1. Solução de Dicromato de Potássio a 10% durante 15 a 30 min.
2. Lavagem rápida em água

Controlo Positivo: idêntico ao anterior.

Resultado: os fenóis coram de castanho avermelhado a castanho-escuro.

2. Detecção Geral de Flavonóides

2.1 Em UV

a) Tricloreto de Alumínio (Carrière-Ladreix, 1973)

1. Solução aquosa de Tricloreto de Alumínio a 10% durante 30 min.
2. Lavagem rápida em água

Controlo: idêntico ao descrito em D.1.1 a).

Controlo Negativo: cortes não submetidos ao tratamento com fluorocromo. Verificar também se a fluorescência não se deve ao reagente só por si.

Resultado: os flavonóides emitem uma fluorescência secundária amarela esverdeada.

b) Acetato Neutro de Chumbo (Carrière-Ladreix, 1973)

1. Solução de Acetato Neutro de Chumbo a 1% durante 30 min.
2. Lavagem rápida em água

Controlo Negativo: idêntico ao descrito em D.1.1 a).

Resultado: os flavonóides emitem uma fluorescência secundária amarela esverdeada.

c) 2-Aminoetildifenilburinato (Naturstoff Reagent A, NA) (Neu e Neuhoff, 1957 in: Opitz et al., 2003)

1. Solução de 2-Aminoetildifenilburinato a 0,1% em etanol a 70% durante 30
2. Lavagem rápida em água

Controlo Negativo: idêntico ao descrito em D.1.1 a).

Resultado: os flavonóides emitem uma fluorescência secundária amarela esverdeada.

d) 2-Aminoetildifenilburinato (Naturstoff Reagente A, NA) em PEG 400 (Neu e Neuhoff, 1957 in: Opitz et al., 2003)

1. Solução de 2-Aminoetildifenilburinato a 1% em PEG 400 a 5% durante 30 min.
2. Lavagem rápida em água

Controlo Negativo: idêntico ao descrito em D.1.1 a).

Resultado: os flavonóides emitem uma fluorescência secundária amarela esverdeada.

E. Detecção de Alcalóides

1. Caracterização Geral de Alcalóides

1.1 Em Luz Visível

a) Reagente de Dragendorff (Svendsen e Verpoorte, 1983)

1. Reagente de Dragendorff durante 15 min.
2. Lavagem rápida em água

Controlo Positivo: Aplicar numa rodela de papel de filtro padrões e secretado da planta. Tratar como o tecido vegetal.

Controlo Negativo: Cortes previamente tratados com Ácido Tartárico a 5% em Etanol a 95%, durante 48-72h.

Resultado: Os alcalóides coram de castanho-avermelhado.

b) Reagente de Dittmar (Furr e Mahlberg, 1981)

1. Reagente de Dittmar durante 15 min.
2. Lavagem rápida em água

Controlos: Idênticos aos anteriores.

Resultado: Os alcalóides coram de castanho-avermelhado.

c) Reagente de Wagner (Furr e Mahlberg, 1981)

1. Reagente de Wagner durante 15 min.
2. Lavagem rápida em água

Controlos: Idênticos aos anteriores.

Resultado: Os alcalóides coram de laranja vivo a castanho-avermelhado.

2.2.2. Anatomia e Histoquímica em Material Fixado

A anatomia e ontogenia das estruturas secretoras foram estudadas em secções de material fixado e incluído em historesina (Leica, Microsystems, Nussloch, Alemanha). A fixação

do material foi idêntica à executada para SEM. O material foi em seguida lavado no tampão da solução fixadora (3 x 20min.) e desidratado numa série crescente de etanol (15 min. em cada uma das concentrações) e 1h em etanol absoluto (3 x 20 min.). Após a desidratação as amostras foram colocadas a 4°C em diferentes misturas de pré-infiltração (etanol/mistura de infiltração nas proporções 3:1, 1:1 e 1:3, (v/v), 24h em cada mistura) e posteriormente na mistura de infiltração pura (3 x 24h), constituída por historesina (metacrilato de hidroxietileno) e activador (dibenzilperóxido) a 1%.

A inclusão em moldes de historesina foi realizada em mistura de infiltração à qual se adicionou o polimerizador (sulfóxido de dimetilo) numa proporção de 15:1 (v/v). A polimerização ocorreu sobre placa de aquecimento a 60°C durante cerca de 2 dias.

Secções, com 3-4 µm de espessura, foram efectuadas num micrótomo rotativo LEICA RM2155 (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha) equipado com lâminas de tungsténio. As secções foram ulteriormente montadas em lâminas de vidro e submetidas aos seguintes testes histoquímicos: Azul de Toluidina O para coloração geral (Feder e O'Brien, 1968), Ácido Periódico/Reagente de Schiff (PAS, Feder e O'Brien, 1968) para a detecção polissacáridos e Safranina/Azur II/Lugol (SAL, Gutmann, 1995) para distinguir paredes essencialmente de celulose de paredes lenhificadas ou cutinizadas e para detectar taninos e amido. Algumas das lâminas coradas com PAS foram posteriormente submetidas à coloração com Toluidina O.

As observações foram efectuadas num microscópio Leica DM2500 sendo as imagens adquiridas por uma câmara digital DFC500.

a) Azul de Toluidina O (Feder e O'Brien, 1968)

1. Solução de Toluidina O 0,05%, 15 min.
2. Lavagem em água
3. Secagem em corrente de ar frio
4. Secagem em estufa a 60°C, 10 min.

Resultado: as paredes celulares essencialmente de celulose e os núcleos coram de azul. As paredes celulares lenhificadas ou cutinizadas coram de lilás claro e os taninos de verde.

b) Ácido Periódico - Reagente de Shiff (PAS) (Feder e O'Brien, 1968)

1. Solução saturada de 2,4-DNPH em Ácido Acético a 15%¹⁴ recém-preparada durante 10 min.
2. Lavagem em água corrente, 15 min. e posterior secagem em estufa a 60°C durante 15 min.
3. Ácido Periódico a 1%, 10 min.
4. Lavagem em água corrente, 5 min., e posterior secagem em estufa a 60°C durante 15 min.
5. Reagente de Schiff¹⁵, 30 min.
6. Lavagem em Metabissulfito de Sódio a 0,5% em Ácido Clorídrico 0,05 N, 3 x 2 min.
7. Lavagem em água corrente, 5 min., e posterior secagem à temperatura ambiente

Resultado: todos os polissacáridos exceptuando a celulose e a calose coram intensamente de rosa.

c) Safranina O, Azur II e Lugol (SAL) (Gutmann, 1996)

1. Solução de Safranina O a 1% (p/v) em Etanol a 50%, 5 min.
2. Lavagem rápida em água destilada
3. Solução de Azur II a 0,5% 2 a 3 min. até que se perca a coloração anterior
4. Lavagem rápida em água destilada
5. Solução de Lugol, 30 segundos
6. Secagem rápida com ar frio
7. Lavagem rápida em água destilada
8. Secagem rápida com ar frio

Resultado: os taninos coram de vermelho, enquanto as paredes essencialmente de celulose coram de verde e o amido de azul-escuro a roxo.

¹⁴ Juntar 0,5 g de 2,4-DNPH a 100 ml de Ácido Acético a 15%, agitar com um magnete durante 60 min. e filtrar

¹⁵ Juntar 2 g de Fucsina Diamante (Pararosanilina) em 60 ml de Ácido Clorídrico 1N a 2 g de Metabissulfito de Sódio em 3000 ml de água destilada. Misturar bem e deixar repousar 24h em frasco rolhado. Adicionar 1,2 g de Carvão Activado e agitar durante 2 min.. Filtrar a solução e manter o filtrado incolor no escuro a 4°C

2.3. Isolamento dos Óleos Essenciais por Hidrodestilação

Para a avaliação da actividade antifúngica procedeu-se à destilação dos órgãos aéreos em fase de floração das seguintes espécies: *H. elodes* (exemplares colhidos na Apostiça, Sesimbra, em Julho de 2006), *H. tomentosum* (exemplares colhidos próximo de Pêro Pinheiro, Sintra em Junho de 1996) e *H. perforiatum* (exemplares colhidos em Alter do Chão, Alentejo, em Maio de 1994). O material em estudo foi previamente seco em estufa com ventilação a 30 °C e posteriormente conservado a -15°C em embalagens sob vácuo até ao isolamento do óleo essencial ou extracto.

Os óleos essenciais foram isolados por hidrodestilação, durante 3h, num aparelho do tipo Clevenger modificado, como descrito na Farmacopeia Europeia (Anonymous, 1996), com um débito de 3 mL/min e com água destilada como líquido de arrastamento. A biomassa utilizada variou consoante os ensaios, entre 100 e 200 g de material vegetal seco em 750 a 1000 mL de água consoante o balão utilizado (2L ou 3L, respectivamente). O óleo essencial foi recolhido e armazenado em frascos escuros a -15°C de forma a que não sofresse alteração ou degradação.

2.4. Extracção de Compostos Fenólicos

Os órgãos aéreos em fase de floração de *H. elodes* (exemplares recolhidos em Sesimbra em Julho de 2010), *H. perforiatum* (exemplares recolhidos em Sesimbra em Julho de 2010) e *H. tomentosum* (exemplares recolhidos em Sesimbra em Julho de 2010) foram moídos depois de secos ao abrigo da luz. A 2 g de planta moída foram adicionados 400 ml de etanol absoluto (PA) tendo esta mistura sido posteriormente deixada a macerar durante 24h em copo isolado com parafilme e coberto com folha de alumínio à temperatura ambiente (cerca de 30°C). A mistura foi depois sujeita a ultrasons durante 30 min. O extrato resultante foi filtrado e o solvente foi evaporado num Rotavapor R-210 (Buchi, Suíça) a 60 mb, à temperatura ambiente. O extrato puro foi então diluído em Diclorometano para se colocar num politope e os resíduos finais foram diluídos em metanol. Para evaporar os solventes que ficaram no politope, procedeu-se a uma secagem sob coluna de Azoto e para evaporar algum resíduo de solvente que ainda pudesse existir, o extrato foi deixado numa bomba de vácuo durante 16h.

2.5. Avaliação da Actividade Antifúngica

A actividade antifúngica dos óleos essenciais e dos extractos isolados foi avaliada relativamente ao fungo *Trametes versicolor* (*Coriolus versicolor* ou *Poliporus versicolor*, TR 489), da família Poriceae, basidiomycete responsável pela podridão branca da madeira. Esta estirpe foi gentilmente cedida pela Engenheira Helena Machado (Instituto Nacional de Recursos Biológicos) da colecção deste instituto.

A concentração mínima inibitória (MIC) de *H. elodes* e *H. perforiatum* foi determinada através de um *screening* pelo método de diluição em agar usando como meio de crescimento para o fungo Potato Dextrose Agar (PDA) (Petrič *et al.*, 1998, *in* Voda *et al.*, 2003).

No ensaio dos óleos essenciais, foi adicionado a 20 mL de meio de PDA uma solução de óleo essencial diluído em dimetilsulfoxido (DMSO) a diferentes concentrações (0,18 mg/mL, 0,28 mg/mL, 0,46 mg/mL, 0,67 mg/mL e 1,22 mg/mL) (Norma Europeia prEN 113:1994). No ensaio dos extractos foi adicionado a 20 mL do mesmo meio uma solução de extrato diluído em DMSO nas seguintes concentrações 100mg/L, 250mg/L e 500mg/L (Viana *et al.*, 2008).

Em cada caixa de Petri com meio de crescimento, esterilizado durante 15 minutos em autoclave a 121°C, foi adicionado 200 µL da solução de óleo ou de extracto de cada concentração a testar. O meio de crescimento foi inoculado 24 horas após com um inóculo de cerca de 0,5 cm de diâmetro de micélio de uma cultura stock de *T. versicolor*. Como controlos inoculou-se o fungo em meio de PDA sem adição da solução de óleo ou de extracto e em meio de PDA com adição de DMSO. Todos os testes foram efectuados em triplicado e foi determinada a média dos valores obtidos para o crescimento micelial.

Após sete dias de incubação em estufa a 25°C, observaram-se as caixas de petri medindo o crescimento da colónia (média de 2 medidas diametralmente opostas) do fungo *Trametes versicolor* TR489. A partir dos resultados obtidos determinou-se a percentagem de inibição do crescimento micelial [PIC = (diâmetro da testemunha – diâmetro do extracto/óleo) / diâmetro da testemunha) x 100].

III. RESULTADOS

1. DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DAS ESTRUTURAS SECRETORAS

As quatro espécies de *Hypericum* estudadas (*H. elodes*, *H. perforatum*, *H. pubescens* e *H. tomentosum*) apresentam nos órgãos aéreos glândulas translúcidas e/ ou nódulos negros que devido às suas dimensões são facilmente visíveis à vista desarmada ou com uma simples lupa de mão. A distribuição e morfologia dessas estruturas secretoras foram estudadas em pormenor em microscopia electrónica de varrimento.

1.1 *Hypericum elodes*

As folhas, os caules e os pedúnculos florais de *H. elodes* estão cobertos por um indumento pubescente constituído por tricomas não glandulares longos e finos, pluricelulares e

unisseriados (Est. I, Figs. 1 e 2; Est. II, Fig. 1; Est. XI, Figs. 1 e 3). Na superfície abaxial da folha o indumento é mais denso que na superfície adaxial (Est. Figs. 1 e 2). No ápice da folha, na superfície adaxial ocorre um tufo de papilas que possivelmente corresponde a um hidátodo tricomatoso (Est. I, Fig. 3; Est. XI, Fig. 4), contudo nunca observamos gutação. Nas folhas observam-se numerosas pontuações transparentes, muito pequenas, as bolsas ou glândulas translúcidas, que são mais facilmente visíveis na superfície adaxial por não ter muitos tricomas de cobertura (Est. I, Fig. 3; Est. XI, Fig. 2).

O caule apresenta um aerênquima bem desenvolvido com lacunas enormes entre as células. Associados ao floema encontra-se um grande número de canais secretores de pequeno calibre (canais do tipo A) (Est. XI, Fig. 1).

As folhas, de um verde vivo, são arredondadas a largamente ovaladas e apresentam uma epiderme composta por células isodiamétricas irregulares.

As brácteas e as sépalas são lanceoladas e glabras com nódulos vermelhos marginais, de pedúnculo curto (Est. I, Figs. 4 e 5; Est. II, Figs. 1 - 3; Est. XII, Figs. 1-3). Em botões muito jovens os nódulos pedunculados não apresentam cor (Est. II, Fig. 4), à medida que se vão desenvolvendo tornam-se pigmentados e em flores em ântese as células no topo do nódulo sofrem rupturas na cutícula, havendo a formação de poros (Est. XII, Figs. 1-5). Os botões florais são pequenos e esféricos e uma grande parte do seu volume deve-se aos estames, que apesar de serem em pequeno número, são maiores que os das outras espécies em estudo. As anteras, de cor amarela, apresentam entre os lobos por cima do conectivo, uma protuberância em forma de lingueta, que correspondente a uma glândula translúcida (Est. I, Fig. 6; Est. XIII, Figs. 1, 2 e 5). O cálice consiste num conjunto de células imbrincadas e as pétalas, amarelas, com 10 mm, são imbrincadas em forma de tubo (Est. II, Figs. 2 - 4). O carpelo é composto por um ovário pouco volumoso que se segmenta para dar três estiletos, terminando cada um deles num tufo de papilas estigmáticas (Est. XIII, Figs. 3 e 4).

1.2. *Hypericum perforatum*

H. perforatum é a única espécie em estudo que não apresenta tricomas de cobertura. As folhas, verdes escuras, são semi-aplexicaules, de ovaladas a lanceoladas, têm glândulas translúcidas, maioritariamente localizadas na lâmina e glândulas negras marginais e intramarginais, um par de nódulos no ápice da folha a ladear a nervura central (Est. III, Figs. 1-6; Est. XIV, Figs. 1 e 4). De um modo geral há sempre glândulas translúcidas, nesta espécie,

são consideravelmente maiores que as presentes nas outras espécies em estudo e distribuem-se tal como as outras nos espaços internervuras (Est. III, Fig. 6). As células da epiderme das folhas de paredes sinuosas são muito ricas em ceras epicuticulares, bem visíveis nesta espécie, possivelmente devido à ausência de tricomas de cobertura (Est. XIV, Figs. 1 - 3) e estão imbricadas umas nas outras como as peças de um *puzzle*.

Os estomas do tipo anomocítico¹⁶, são em maior número na superfície abaxial do que na superfície adaxial (Est. XIV, Fig. 2).

As brácteas e as sépalas lanceoladas, apresentando glândulas negras marginais largamente pediceladas e algumas laminares punctiformes e lineares (Est. IV, Figs. 1 - 5; Est. XIV, Fig. 5; Est. XV, Fig. 1). No decurso do desenvolvimento, vão aparecendo rupturas cuticulares nas células do ápice dos nódulos pedunculados havendo a formação de poros (Est. XV, Figs. 2 e 3). Os botões florais são ovalados, maiores que os da espécie descrita anteriormente (Est. IV, Figs. 3 e 4). O seu volume deve-se em grande parte aos muito numerosos estames (Est. V, Figs. 2 e 3). As anteras, de cor amarela, apresentam entre os lobos, acima do conectivo, nódulos negros de grandes dimensões (Est. V, Figs. 2 e 3). O carpelo é composto por um ovário pouco volumoso, alongado que diverge para dar três estiletos que terminam num tufo de papilas estigmáticas de cor vermelha (Est. V, Fig. 2, seta). As pétalas, de cor amarela, apresentam glândulas negras marginais, pediceladas ou sésseis, intramarginais e laminares punctiformes ou lineares (Est. IV, Fig. 5). Nas pétalas encontram-se também canais secretoras que se fundem com os nódulos lineares da lâmina (Est. V, Figs. 4 e 5; Est. XV, Fig. 4).

1.3. *Hypericum pubescens*

As folhas, os caules, as brácteas e o cálice das flores de *H. pubescens* estão revestidos por um indumento lanuginoso a pubescente constituído por tricomas de cobertura longos, finos, pluricelulares e unisseriados (Est. VI, Figs. 1 - 5; Est. VII, Figs. 1 - 3; Est. XVI, Fig. 3). Tanto as brácteas como as sépalas apresentam tricomas de cobertura apenas na superfície abaxial (Est. VI, Fig. 5; Est. VII, Figs. 1 - 3). Na superfície abaxial da folha o indumento é mais denso que na superfície adaxial (Est. VI, Figs. 1 e 2). As folhas, verdes escuras, com margens avermelhadas e nervuras secundárias reticuladas e translúcidas apresentam glândulas negras laminares e

¹⁶ Estoma envolvido por um número variável de células que não diferem em forma e tamanho das demais células epidérmicas.

intramarginais e glândulas translúcidas (Est. VI, Figs. 1 - 4). Geralmente no ápice da folha ocorrem dois nódulos ladeando a nervura central (Est. VI, Fig. 4; Est. XVI, Fig. 3). As células da epiderme da folha, aplanadas e de secção poligonal apresentam ceras epicuticulares. Os estomas do tipo anomocítico estão aprofundados na epiderme e são em maior número na superfície abaxial (Est. XVI, Figs. 1 - 2). De um modo geral, os nódulos, muito volumosos, ocupam toda a espessura da folha, desde a epiderme adaxial até à abaxial (Est. XVI, Fig. 3).

As brácteas e as sépalas, semelhantes em tamanho, são linear-lanceoladas, com glândulas negras marginais, sésseis ou não, e canais que se alongam da base ao ápice, e dispostos alternadamente com as nervuras. No ápice das folhas e sépalas observa-se um grande número de estruturas semelhantes a estomas, são poros aquíferos de um hidátodo de epitema que existe nessa zona (Est. XVII, Fig. 2). Os botões florais têm dimensões semelhantes aos de *H. perforiatum* (Est. VI, Fig. 5; Est. VII, Fig. 3). As anteras, tal como na espécie descrita anteriormente, apresentam uma glândula negra e volumosa (Est. VII, Figs. 4 e 6; Est. XVII, Fig. 4). O carpelo é composto por um ovário pouco volumoso e por três estiletos que terminam num tufo de papilas estigmática (Est. VII, Fig. 7; Est. XVII, Fig. 5). As pétalas, amarelas-alaranjadas, imbrincadas, apresentam glândulas negras marginais ou intramarginais e canais (Est. VII, Figs. 3 e 5; Est. XVII, Fig. 3). As nervuras das pétalas são frequentemente avermelhadas (Est. VII, Fig. 3 e 5).

1.4. *Hypericum tomentosum*

As folhas, os caules as brácteas, os cálices e o pedúnculos florais de *H. tomentosum* estão revestidos por um indumento denso tomentoso constituído por tricomas de cobertura pluricelulares e unisseriados co papilas cuticulares. O indumento é mais denso na superfície abaxial da folha especialmente sobre as nervuras (Est. IX, Figs. 1 - 5). Os tricomas que revestem as folhas, brácteas e sépalas são em maior número mas mais curtos que os tricomas de cobertura de *H. pubescens*. As folhas, verdes escuras, são subamplexicaules, de ovaladas a elípticas apresentando glândulas negras laminares e intramarginais, duas delas apicais a ladear a nervura central (Est. IX, Figs. 1 - 4) e numerosas e pequenas glândulas translúcidas que se distribuem entre as nervuras por toda a lâmina (Est. IX, Fig. 6). A epiderme das folhas é composta por células pequenas mais ou menos isodiamétricas (Est. XVIII, Fig. 2).

As brácteas e sépalas são lanceoladas, pubescentes apenas na superfície abaxial, com glândulas negras internas só marginais e nódulos pedicelados (muito redondos) ou sésseis

(Est. X, Figs. 2 - 4). No decurso do desenvolvimento da flor vão aparecendo nas células apicais dos nódulos rupturas na cutícula, que dão origem a poros (Est. XIX, Figs. 1 - 4). O botão floral é semelhante em tamanho ao de *H. perfoliatum* em tamanho (Est. X, Figs. 1 e 4). A grande parte do seu volume é ocupada pelo Androceu (Est. X, Figs. 2 e 3). Cada antera ostenta uma glândula negra esférica muito volumosa, muito semelhante à que ocorre em *H. perfoliatum* e *H. pubescens* (Est. XIX, Fig. 5). O carpelo é composto por um ovário pouco volumoso e por três estiletos que terminam num tufo de papilas estigmática de cor vermelha, tal como nas outras espécies em estudo (Est. X, Figs. 2 e 3). As pétalas, de um amarelo vivo, apresentam um número reduzido de glândulas negras laminares e marginais (Est. X, Fig. 3; Est. XIX, Fig. 6).

2. CARACTERIZAÇÃO ANATÓMICA DAS ESTRUTURAS SECRETORAS

A caracterização anatómica estruturas secretoras nas quatro espécies de *Hypericum* estudadas foi feita em cortes histológicos de órgãos vegetativos e reprodutores em diferentes estádios de desenvolvimento.

2.1 *Hypericum elodes*

O caule de *H. elodes* apresenta um córtex ocupado maioritariamente por um aerênquima bem desenvolvido com amplas lacunas. Associados ao floema observam-se canais secretores do tipo A em que o lúmen é delimitado apenas por quatro células (Est. XX, Figs. 1 e 2). Nesta espécie o calibre destes canais é maior do que os observados nas outras três espécies em estudo. O parênquima medular rodeado por células com depósitos taniníferos não apresenta canais secretores (Est. XX, Fig. 2)

Nas folhas dorso-ventrais podemos observar um parênquima clorofilino em paliçada constituído por uma única camada de células um parênquima lacunoso composto por duas camadas de células esféricas a ovóides. Nas folhas de *H. elodes* ocorre um grande número de estruturas secretoras, na sua maioria glândulas translúcidas (bolsas), o que lhes conferem um aspecto perforado. As bolsas, de forma esférica, têm o lúmen rodeado por uma única camada de células epiteliais (Est. XXI, Figs. 1 e 2). De um modo geral, as bolsas ocorrem mais próximo da epiderme abaxial da folha (Est. XXI, Fig. 2). As células da epiderme em contacto com as células epiteliais da bolsa são geralmente idioblastos taniníferos (Est. XXI, Fig. 2). As bolsas estão distribuídas nos espaços internervuras, não existindo aparentemente nenhuma ligação

topográfica entre elas e os feixes condutores (Est. XXI, Fig.3). Nos feixes vasculares das folhas, tanto a nível das nervuras primárias como secundárias ocorrem canais secretores de pequeno calibre associados ao floema. São canais semelhantes aos do caule, em que o lúmen está rodeado apenas por quatro células (Est. XXI, Fig. 1, seta).

As brácteas e sépalas de *H. elodes* são anatomicamente bastante diferentes das folhas, pois apresentam um parênquima clorofilino com cerca de seis camadas de células esféricas (Est. XXII, Figs. 1-3 e 5). Nas brácteas e sépalas ocorrem também a nível do parênquima canais secretores do tipo B com calibre maior do que os do tipo A (associados ao floema). São canais com lúmen grande, rodeado por um epitélio com número variável de células (Est. XXIII, Figs. 1 e 2). São canais que se alongam por toda a lâmina da bráctea e da sépala mas que em corte transversal são facilmente confundidos com bolsas secretoras por terem um diâmetro de lúmen semelhante. Para além dos canais do tipo B podemos ainda encontrar canais do tipo A, isto é, canais de pequeno calibre associados ao floema, e semelhantes aos descritos para o caule e folhas (Est. XXII, Fig. 5, seta; e Est. XXIII, Fig. 3, seta). Ao longo de toda a margem das brácteas e sépalas observam-se ainda nódulos pedunculados pequenos, em que as células laterais dos pedúnculos contêm taninos (Est. XXIII, Fig. 4; Est. XXIV, Figs. 3 e 5). Em flores em ântese observam-se frequentemente nódulos pedunculados com fissuras no topo da cabeça glandular (Est. XXIV, Fig. 5, seta).

Nas pétalas observou-se apenas um único tipo de estruturas secretoras, os canais do tipo A, associados ao floema e semelhantes aos que ocorrem no caule, folhas e sépalas (Est. XXII, Fig. 4, seta).

Nas anteras, na região interlobular acima do conectivo, observa-se sempre uma protuberância em forma de lingueta, que internamente corresponde a uma pequena glândula translúcida, que é revestida por uma epiderme de células taniníferas (Est. XXII, Fig. 3, seta; Est. XXIV, Figs. 1, 4 e 6, setas). A glândula translúcida é assim constituída por uma camada de células secretoras (epitélio glandular) e uma bainha de células taniníferas.

Na parede do ovário podem observar-se numerosos canais secretores junto à epiderme externa. São canais que vão desde a base do ovário até ao ápice, sendo paralelos entre si. Apresentam lúmen oval ou circular quando em secção transversal e prolongam-se pelo receptáculo (Est. XXIV, Fig. 2, asterisco). Apresentam um lúmen grande de limitado por cerca de dez a doze células epiteliais que constituem a bainha.

Idioblastos taniníferos são frequentes nas epidermes das sépalas, brácteas, filetes das anteras e nas células em redor dos feixes condutores (Est. XXII, Figs. 2 - 4).

2.2. *Hypericum perfoliatum*

As folhas adultas são mais compactas e mais espessas do que as do *H. elodes*. Apresentam um parênquima clorofílico constituído por várias camadas de células paliçada e por um parênquima lacunoso composto por duas ou mais camadas de células esféricas a ovóides com espaços intercelulares reduzidos entre elas. Nas folhas de *H. perfoliatum* encontra-se um grande número de estruturas secretoras. Nos feixes vasculares das folhas, tanto a nível das nervuras primárias como secundárias, ocorrem canais secretores do tipo A, de pequeno calibre associados ao floema, semelhantes aos encontrados no caule, com o lúmen rodeado por quatro células epiteliais (Est. XXV, Figs. 1 - 3, setas).

Em folhas jovens ainda pouco cutinizadas, é facilmente visível a olho nú e contra a luz, um grande número de bolsas distribuídas por toda a lâmina. As bolsas de maiores dimensões que as de *H. elodes*, têm igualmente uma forma esférica e são constituídas por uma camada de células epiteliais e por uma bainha, camada de células de parede espessa que se tornam achatadas à medida que a estrutura se desenvolve. As bolsas ocorrem nas folhas, logo por baixo da epiderme adaxial e devido às suas grandes dimensões contactam também com a epiderme abaxial (Est. XXV, Figs. 4 – 6). As bolsas ocupam apenas os espaços internervuras, não sendo visível nenhum contacto entre estas e os feixes vasculares (Est. XXV, Fig. 7). Nas folhas, encontram-se ainda, ao longo das margens, nódulos negros internos de grandes dimensões.

O botão floral é a zona onde se concentra a maioria das estruturas secretoras de *H. perfoliatum*. Tal como nas folhas, nas brácteas, nas sépalas e pétalas ocorrem canais associados ao floema (tipo A) (Est. XXVI, Figs. 1 – 4, setas). Existem também nódulos negros internos esféricos a ovóides ou tubuliformes, mais ou menos longos e dispostos paralelamente às nervuras, as vitas (Est. XXVI, Fig. 4, ponta de seta). As vitas são estruturas que se confundem com nódulos das folhas quando em corte transversal, pois são esféricas, mas em secção longitudinal são estruturas muito alongadas (Est. XXVII, Fig. 5, seta), que podem ir da base do órgão ao ápice ou pararem num ponto do órgão exactamente onde parece começar um outro tipo de estrutura alongada, um canal secretor. Estas estruturas, denominadas de estruturas híbridas são aparentemente constituídas por um nódulo alongado e por um canal (Est. XXVII, Figs. 1-3) e correspondem aos “veios” negro-avermelhados que se observam nas sépalas, brácteas e pétalas e que parecem interrompidos de onde em onde (Est. XXVII, Figs. 1-

3, setas).

Os nódulos iniciam a sua ontogenia muito cedo no decurso do desenvolvimento dos órgãos onde ocorrem. Os nódulos internos têm origem em células que se diferenciam do parênquima circundante, junto da epiderme abaxial. Inicialmente, como resultado das primeiras divisões, têm aspecto de uma mórula, constituída por pequenas células com citoplasma denso e núcleos hipertrofiados. Depois de várias divisões celulares, quando a estrutura atinge uma determinada dimensão, as células destes maciços começam a diferenciar-se e externamente forma-se uma a duas camadas de células mais estreitas que envolvem o maciço de células e vão dar origem à bainha do nódulo. À medida que o órgão expande, as células da bainha vão se achatando tangencialmente em redor do nódulo. Nas folhas maduras os nódulos apresentam forma esférica a ovóide e apesar de se formarem junto à epiderme abaxial, acabam por ocupar toda a espessura do mesofilo (Est. XXVI, Figs. 5 - 8). Os nódulos em órgãos jovens completamente expandidos apresentam células grandes de paredes delgadas, que deixam entre si espaços intercelulares muito reduzidos. Em órgãos maduros é notória uma certa desorganização celular e quebra das paredes celulares. Nas estruturas híbridas tal facto é bem visível, parece que uma parte da estrutura nodular se desorganiza dando origem, provavelmente por lise celular a um lúmen (Est. XXVII, Figs. 1 - 4). Aparentemente parece que uma estrutura compacta (nódulo) evolui durante a diferenciação do órgão numa estrutura em que internamente há um lúmen (canal).

Nas margens das brácteas, sépalas e pétalas ocorrem também nódulos pedunculados ou pedicelados, emergências glandulares não vascularizadas ostentando um nódulo no ápice e um pedúnculo de dimensão variável constituído por células de origem epidérmica e subepidérmica (Est. XXVIII, Figs. 1 e 2). As células dos nódulos inicialmente são isodiamétricas, de paredes delgadas, ricas em citoplasma e núcleos proeminentes. São células com características meristemáticas (Est. XXVIII, Figs. 1 - 3). O desenvolvimento dos nódulos pedunculados é semelhante ao dos nódulos internos que se encontram nas folhas. À medida que os órgãos expandem, as células dos nódulos também se alongam e diferenciam, tornando-se irregulares e muito vacuolarizadas. Em sépalas de botões em ântese é comum ver no topo dos nódulos pedunculados, rupturas nas paredes celulares ao mesmo tempo que se observa um aumento da vacuolarização que é seguida por uma completa desorganização celular. Inicialmente as células parecem aumentar de volume, sofrendo as paredes celulares rupturas que levam à expulsão do conteúdo das células e dos seus secretados para o exterior (Est. XXVIII, Figs. 3 - 6).

Os nódulos que ocorrem nas margens das pétalas são menores que os das sépalas e

embora proeminentes são muitas vezes sésseis. As vitas são bastante salientes, apresentando uma espessura maior do que a pétala onde ocorrem.

Nas anteras de *H. perfoliatum* entre os lobos e acima do conectivo, pode observar-se uma volumosa glândula esférica com natureza nodular (Est. XXIX, Figs. 1 - 3). A desorganização das células do nódulo das anteras já nítida em botões florais em pré-ântese. As células dessas estruturas, apresentam rupturas a nível das paredes, desorganização celular acentuada e grandes espaços intercelulares (Est. XXIX, Figs. 1 - 3).

No ovário desta espécie podemos ainda encontrar numerosos canais secretores paralelos entre si e à epiderme externa.

Idioblastos taniníferos são frequentes nos diferentes órgãos de *H. perfoliatum* nomeadamente na epiderme das folhas, sépalas e ovário, e nas células parenquimatosas em torno dos feixes vasculares e nódulos, tanto das pétalas como das sépalas e folhas.

2.3. *Hypericum pubescens*

H. pubescens apresenta um caule com um córtex constituído por células de forma irregular com pequenos espaços celulares entre elas. As células do parênquima cortical do caule vão aumentando até ao meio do caule voltando a diminuir de tamanho na proximidade da endoderme onde são mais pequenas. Observam-se canais secretores do tipo A, associados ao floema. O calibre destes canais é muito reduzido sendo por vezes difícil identificá-los (Est. XXX, Figs. 1 e 2, setas).

As folhas adultas apresentam um parênquima clorofilino constituído por uma ou duas camadas de células de parênquima em paliçada e por duas ou três camadas de parênquima lacunoso, composto por células de formas irregulares, de esféricas a ovóides com grandes espaços entre elas. Nas folhas de *H. pubescens* ocorre um grande número de estruturas secretoras. Nos feixes vasculares das folhas, ocorrem tal como nas outras espécies canais secretores do tipo A em que o lúmen está rodeado por quatro células (Est. XXX, Fig. 3). Ao longo de toda a lâmina são visíveis numerosas glândulas translúcidas ou bolsas, que a olho nu não são observáveis devido aos longos tricomas de cobertura que revestem a folha tanto na superfície abaxial como na superfície adaxial. As bolsas são igualmente de forma esférica, apresentam uma bainha de células achatadas e localizam-se no mesofilo, estando mais ou menos equidistantes da superfície adaxial e abaxial (Est. XXXI, Fig. 3). Em secções

paradermais observa-se que as bolsas se distribuem nas regiões internervuras, não havendo qualquer tipo de contacto entre elas e o sistema vascular (Est. XXXI, Figs. 1 e 2). Nas folhas há também, como nas brácteas e nas sépalas, nódulos negros ao longo da margem. São estruturas esféricas ligeiramente ovóides ou elipsóides de grande dimensão delimitadas por uma bainha composta por uma ou duas camadas de células (Est. XXXI, Figs. 4 e 8). Embora os nódulos se formem junto à epiderme abaxial, após diferenciação e desenvolvimento acabam por ocupar todo o mesófilo contactando muitas vezes com as epidermes adaxial e abaxial (Est. XXXI, Figs. 3 e 6 - 7).

Nas brácteas e sépalas, anatomicamente semelhantes às folhas apenas menos espessas, ocorrem também, para além dos canais do tipo A, canais secretores de calibre maior, paralelos à nervura central com o lúmen delimitado por um número de células epiteliais variável (Est. XXXII, Fig. 1, asterisco).

As pétalas de *H. pubescens* observam-se canais secretores associados ao floema (Est. XXXII, Fig. 1, seta), semelhantes aos já descritos para o caule e canais que acompanham a pétala longitudinalmente, semelhantes aos descritos nas sépalas (Est. XXXII, Fig. 1, asteriscos). Ainda nas pétalas podem ser observados nódulos secretores na lâmina e na margem. Os nódulos negros das pétalas são muito volumosos atendendo à espessura das pétalas e apresentam sinais de degenerescência celular ainda em botões em pré-ântese (Est. XXXIII, Figs. 3 e 4).

As anteras apresentam tal como na espécie anteriormente descrita um volumoso nódulo (Est. XXXIII, Fig. 1). Nos estigmas ocorrem longas papilas estigmáticas (Est. XXXIII, Fig. 2).

Na parede do ovário, tal como nas espécies anteriores há numerosos canais secretores que se estendem desde a base até ao ápice (Est. XXXII, Figs. 2 e 3).

2.4. *Hypericum tomentosum*

Nos caules e folhas de *H. tomentosum* ocorrem tal como nas espécies referidas anteriormente, os mesmos tipos de estruturas secretoras (XXXIV, Figs. 1 - 4; Est. XXXVI, Figs. 6 - 8). Contudo, as bolsas são menores do que as presentes em *H. elodes*, *H. perforiatum* e *H. pubescens*, mas o seu número por unidade de área foliar é maior (Est. XXXIV, Figs. 1 - 3). Na superfície adaxial da folha numa posição sub-terminal observa-se um hidátodo com epitema, tecido constituído por células pequenas, que se localiza entre as terminações dos feixes e o

poro aquífero (Est. XXXV, Figs. 1 e 2).

As brácteas, sépalas e pétalas apresentam canais associados ao floema dos feixes vasculares (tipo A) e canais secretores paralelos à nervura central (tipo B) (Est. XXXIV, Fig. 4; Est. XXXV, Figs. 4 e 5). Para além dos canais estão presentes nas margens de sépalas e pétalas nódulos pedunculados com pedúnculo de menor comprimento que aqueles apresentados por *H. elodes* e *H. perfoliatum* (Est. XXXVII, Figs. 1 - 10). A ontogenia e o desenvolvimento dos nódulos pedunculados são semelhantes aos descritos para *H. perfoliatum*. Os nódulos internos e marginais das pétalas, muito volumosos, têm dimensões semelhantes aos nódulos dos mesmos órgãos de *H. perfoliatum* (Est. XXXIX, Figs. 2 e 3).

Na parede do ovário e nas anteras de *H. tomentosum* estão presentes as estruturas secretoras descritas anteriormente para as outras espécies em estudo (Est. XXXVIII, Figs. 3 e 4; Est. XXXIX, Fig. 4).

Idioblastos taniníferos ocorrem em diferentes órgãos, nomeadamente na epiderme de folhas e em torno dos feixes vasculares, tanto das folhas como das sépalas (Est. XXXIV, Fig. 4; Est. XXXV, Fig. 4). Idioblastos cristalíferos de oxalato de cálcio são também frequentes nesta espécie principalmente em células do receptáculo, ovário e anteras.

3. CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DOS SECRETADOS

Em secções de material fresco das folhas jovens de *H. elodes* verificou-se que o secretado translúcido contido nas bolsas (Est. XL, Fig. 5) corou intensamente de vermelho com o Vermelho Sudão IV (Est. XL, Fig. 2), de azul-escuro com o Reagente de Nadi (Est. XL, Fig. 6) e de negro com o Tetróxido de Ósmio (Est. XL, Fig. 7). No que refere ao conteúdo dos canais secretores, o secretado translúcido, com o aspecto de uma emulsão (Est. XL, Fig. 3), corou intensamente de roxo com o Reagente de Nadi (Est. XL, Figs. 4 e 8). Relativamente aos testes com Vermelho de Ruténio e com corantes para detecção de compostos fenólicos e de alcalóides, não houve qualquer resultado positivo, quer para o secretado contido nas bolsas como para o secretado dos canais. A glândula translúcida da antera não reagiu em nenhum dos testes (Est. XL, Fig. 1, seta).

Em secções de folha de *H. perfoliatum* foi possível observar no lúmen das bolsas, um secretado com aspecto de emulsão (Est. XLI, Fig. 1) que corou de um vermelho alaranjado com Vermelho Sudão IV (Est. XLI, Fig. 2) e de azul-escuro com o Reagente de Nadi (Est. XLI, Fig.

3). Os testes para pectinas, fenóis e alcalóides deram resultados negativos. Apesar disso, as bolsas mostraram uma autofluorescência amarela (Est. XLI, Fig. 7) e azul (Est. XLI, Fig. 8) quando observadas respectivamente em Luz Azul e UV, comprimentos de onda a que as paredes das células xilémicas emitem autofluorescência amarela sob Luz Azul (Est. XLI, Fig. 5) e autofluorescência azul sob UV (Est. XLI, Fig. 6). Os nódulos internos e os pedunculados corados naturalmente por compostos de cor vermelha (Est. XLII, Figs. 1 - 6), não reagiram a nenhum teste histoquímico, apresentados-se absorventes quando observados em Luz Azul (Est. XLI, Fig. 9). O secretado dos canais secretores, nomeadamente do tipo A, corou de roxo escuro com o Reagente de Nadi (Est. XLI, Fig. 4) e de vermelho com o Vermelho Sudão IV (resultado não apresentado). A glândula negra volumosa presente na antera reagiu como os nódulos (Est. XL, Figs. 9 e 10).

Nas bolsas que ocorrem nas folhas de *H. pubescens*, o secretado com aspecto de emulsão (Est. XLIII, Fig. 3), reagiu positivamente ao Reagente de Nadi, corando de azul-escuro (Est. XLIII, Fig. 4) e ao Vermelho Sudão IV, corando de vermelho intenso (Est. XLIII, Fig. 5). Os testes para pectinas, fenóis e alcalóides, deram resultados negativos. A glândula negra interlobular da antera apresenta uma cor negra, naturalmente (Est. XLIII, Fig. 1 e 2).

O secretado das bolsas da folha de *H. tomentosum*, naturalmente translúcido (Est. XLIII, Fig. 8) corou positivamente com o Vermelho Sudão IV (Est. XLIII, Figs. 9 e 10) e com o Reagente de Nadi obteve-se um resultado inespecífico pois o secretado das bolsas corou de laranja (resultado não apresentado). Com os reagentes para detecção de compostos flavonólicos em microscopia de fluorescência observou-se em Luz Azul observou-se uma fluorescência secundária amarela, muito intensa quando se utilizou uma solução aquosa de 2-Aminoetildifenilburinato (Est. XLIII, Fig. 13) e uma fluorescência amarela-esverdejada forte quando se usou uma solução de 2-Aminoetildifenilburinato em PEG (Est. XLIII, Fig. 14). Apesar de haver pouca diferença na cor, a intensidade desta fluorescência induzida é maior que a da autofluorescência do secretado quando esposto à Luz Azul (Est. XLIII, Fig. 12). Todos os testes efectuados para detecção de alcalóides deram resultados negativos. Tal como nas outras espécies estudadas os resultados dos testes histoquímicos nos nódulos foram inconclusivos, pois o conteúdo muito escuro destas estruturas permaneceu sempre negro (resultado não apresentado). Assim, a glândula negra interlobular da antera de *H. tomentosum*, *H. perfoliatum* e *H. pubescens* deu sempre resultados inconclusivos no que respeita à caracterização histoquímica dos seus compostos maioritários (Est. XLIII, Figs. 6 e 7).

O Vermelho de Ruténio apenas corou a parede das células, reagindo debilmente como secretado das bolsas (Est. XLIII, Fig. 11).

4. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS E DOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

Os resultados obtidos neste estudo preliminar da avaliação potencial da actividade antifúngica de *T. versicolor*, relativamente aos extractos e óleos essenciais das espécies de *Hypericum* em estudo não registaram valores de MIC, conforme os resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2. No entanto, observou-se um decréscimo no crescimento do micélio sendo mais acentuado perante as maiores concentrações de óleo essencial/extracto (1,22 mg/mL). Na Tabela 3 apresentam-se os valores correspondentes às PICs (percentagem de inibição do crescimento micelial). Os controlos do solvente e do meio PDA permitiram que o micélio do fungo crescesse de modo a estender-se por toda a caixa de Petri (diâmetro de caixa = 9 cm).

Tabela 1. Diâmetros dos micélios do fungo *Trametes versicolor* nos ensaios com óleos essenciais

Óleo Essencial a diferentes concentrações	Diâmetro dos micélios de <i>Trametes versicolor</i> (cm)				
	0,18 mg/mL	0,28 mg/mL	0,46 mg/mL	0,67 mg/mL	1,22 mg/mL
<i>H. elodes</i>	8,5	7,8	7,4	6,4	2,3
<i>H. perforiatum</i>	5,8	5,8	5,2	5,1	4,3

Tabela 2. Diâmetros dos micélios do fungo *Trametes versicolor* nos ensaios com os extractos etanólicos

Extractos Etanólicos a diferentes concentrações	Diâmetro dos micélios de <i>Trametes versicolor</i> (cm)		
	100 mg/L	250 mg/L	500 mg/L
<i>H. elodes</i>	3,5	3,8	7,1
<i>H. perforiatum</i>	5,4	4,4	7,3

Tabela 3. Percentagens de inibição do crescimento micelial (PIC) nos ensaios com extractos etanólicos

Extractos Etanólicos a diferentes concentrações	Percentagem de inibição do crescimento micelial		
	100 mg/L	250 mg/L	500 mg/L
<i>H. elodes</i>	39,3	50,3	17,9
<i>H. perforiatum</i>	56,2	57,3	20,2

IV. DISCUSSÃO

Apesar de nas últimas décadas, muitas espécies de *Hypericum* terem sido estudadas a nível químico, o conhecimento relativo à morfologia e anatomia de estruturas secretoras em espécies de *Hypericum* é ainda muito diminuto. *H. perforatum* a espécie representativa do género é a única que tem merecido destaque em estudos desta natureza. Mais recentemente foram aprofundados conhecimentos num estudo que englobou quatro espécies *H. androsaemum*, *H. calycinum*, *H. hirsinum* subsp. *majus* e *H. linarifolium* (Moura, 2008), sendo esta última de grande interesse dada a presença de glândulas ainda pouco descritas: nódulos pedunculados, descritos anteriormente apenas em *H. elodes* (Bottega *et al.*, 1999; Piovani *et al.*, 2004) e estruturas híbridas, descritas num estudo antigo em *H. balearicum* (Curtis e Lersten, 1990).

Na presente dissertação apresenta-se o estudo morfo-anatómico das glândulas que ocorrem nos diferentes órgãos de quatro espécies de *Hypericum* da flora portuguesa: *H. elodes*, *H. perforatum*, *H. pubescens* e *H. tomentosum*.

As quatro espécies em estudo são ricas em estruturas secretoras, podendo num mesmo órgão coexistir diferentes tipos de canais secretores e de nódulos para além de bolsas e idioblastos.

Nas quatro espécies em estudo foram encontrados nos vasos condutores do caule, folhas, sépalas e brácteas, associados ao floema, canais secretores, que em corte transversal apresentam um lúmen de pequeno calibre rodeado por quatro células epiteliais de parede delgada. Em 2001, Ciccarelli *et al.* (2001b) denominaram estes canais por canais do tipo A, nomenclatura que adoptámos. Em *H. perforatum* os canais do tipo A foram também encontrados nas raízes (Ciccarelli *et al.* 2001b), órgão não englobado no presente estudo. Bottega *et al.* ao estudarem os órgãos florais de *H. elodes* observaram canais do tipo A também no cilindro central (medula) e no cortéx do pedúnculo floral. Tanto num caso como no outro, como não se estudaram esses órgãos nada se pode dizer.

Para além destes canais de pequeno calibre, foram ainda encontrados outros canais de calibre maior, denominados por Ciccarelli *et al.* (2001b) por canais do tipo B e C que ocorrem respectivamente nas pétalas e sépalas e no ovário. Para estes autores, os dois tipos de canais divergem apenas no que respeita ao mecanismo envolvido na formação do seu lúmen. O lúmen dos canais do tipo B tem origem esquizogénica, enquanto que o lúmen dos canais do tipo C tem origem esquizolisigénica. Como não estudamos a origem destes dois tipos de canais secretores e porque nos parecem anatomicamente idênticos e com secretados similares, optamos por incluí-los no mesmo tipo, canais secretores do tipo B. Bottega *et al.* (2004) discordam também no que respeita à separação destes canais em dois tipos. De acordo com estes autores e pelo menos em *H. elodes*, estes canais são anatomicamente semelhantes e os secretados são similares, sendo contudo a sua ontogenia esquizolisigénica pelo que os denominaram por canais secretores do tipo C.

As glândulas translúcidas ou bolsas são as estruturas mais abundantes nas folhas de espécies de *Hypericum* e parecem estar confinadas a estes órgãos. Nas quatro espécies em estudo distribuem-se por toda a lâmina da folha e em *H. elodes* e *H. perforatum* parecem ter origem num maciço de células subjacente à epiderme adaxial, enquanto que em *H. pubescens* e *H. tomentosum* parecem ter origem no centro da lâmina. Bolsas com origem num maciço de células próximo da epiderme adaxial foram também descritas em *H. perforatum*, enquanto que bolsas que se formam no centro do mesófilo foram descritas em *H. balearicum* (Curtis e Lersten, 1990). As bolsas são constituídas por um lúmen rodeado por um epitélio glandular unisseriado com número de células variável e por uma bainha constituída por uma ou duas camadas de células. O lúmen da bolsa aumenta durante a diferenciação e desenvolvimento da

bolsa e a pressão do secretado no lúmen faz com que as células da bainha sofram achatamento tangencial. No que refere às bolsas as nossas observações são semelhantes às realizadas por Curtis e Lersten (1990) e Ciccarelli *et al.* (2001b) em *H. perforatum* e *H. balearicum* e em *H. perforatum*, respectivamente.

Nas folhas de *H. perforatum*, *H. pubescens* e *H. tomentosum* ocorrem para além das estruturas já referidas, bolsas e canais do tipo A, e nódulos internos. Estes formam-se a partir de maciços de células que se localizam junto à epiderme abaxial e que estão rodeados por duas ou três camadas de células que constituem uma bainha. Ao longo do processo de diferenciação e desenvolvimento do nódulo, as células da bainha vão-se tornando achatadas. O achatamento destas deve-se à proliferação celular que ocorre no interior da estrutura onde as células secretoras se dispõem numa forma compacta. Os nódulos são visíveis nos órgãos desde fases precoces de desenvolvimento. Nódulos semelhantes foram descritos em *H. perforatum* por Curtis e Lersten (1990), Fornasiero *et al.* (1998), Ciccarelli *et al.* (2001a) e Onelli *et al.* (2002) e em *H. richeri* por Fornasiero *et al.* (2000). No decurso do desenvolvimento observámos no interior dos nódulos, sinais de desorganização celular que se traduzia em pequenas rupturas nas paredes e lise celular, dando origem a espaços intercelulares de tamanho variável que conferiam ao nódulo um aspecto laxo. Neste aspecto os nossos resultados são contraditórios com os de Curtis e Lersten (1990) e Ciccarelli *et al.* (2001b) que em *H. perforatum* dizem apenas observar uma desorganização citoplasmática ligeira, contudo as imagens mostram secretado nos espaços intercelulares das células constituintes dos nódulos. Já Weill (1903) observou formação de cavidade no interior de nódulos maduros de *H. perforatum*. Embora tenhamos estudado esta espécie, nunca observamos a formação de uma cavidade no interior dos nódulos, mas as células apresentavam sinais nítidos de degenerescência celular e estavam separados por espaços intercelulares, alguns de dimensões consideráveis. Para além disso, só estudamos órgãos jovens e maduros numa fase activa da planta (plena floração). Por outro lado, Fornasiero *et al.* (1998) referem que os nódulos de *H. perforatum* estão cheios de material granuloso não se conseguindo identificar as células que o constituem, devido à sua desorganização total. Já Onelli *et al.* (2002) ao estudarem a ultraestrutura dos nódulos de *H. perforatum*, mencionaram e mostraram haver degenerescência celular sem que haja formação de um verdadeiro lúmen, mas as imagens parecem-nos inconclusivas quanto à presença ou não de um verdadeiro lúmen.

Contrariamente às bolsas, os nódulos internos não ocupam todo o espaço do mesofilo, ficando uma camada de parênquima em paliçada entre o nódulo e a epiderme adaxial o que foi também observado e referenciado por Curtis e Lersten (1990).

Tanto as glândulas translúcidas como os nódulos observados distribuem-se nas regiões internervuras e estão rodeados por uma extensa rede de feixes vasculares, não havendo contudo qualquer tipo de contacto entre ambos. Os nossos resultados estão em concordância com os de Curtis e Lersten (1990) para *H. perforatum*, mas contrariam o descrito por Green (1884) que menciona uma relação topográfica estreita entre os nódulos e as nervuras.

Os nódulos pedunculados, presentes na margem das sépalas e brácteas de *H. elodes*, *H. perfoliatum* e *H. tomentosum* e de pétalas de *H. perfoliatum* foram anteriormente descritos de forma superficial em *H. elodes* (Bottega *et al.*, 2004) e detalhadamente em *H. linarifolium* (Moura, 2008). Os nódulos pedunculados são, do ponto de vista estrutural, emergências glandulares não vascularizadas, sendo esta característica glandular restrita ao nódulo negro presente no topo do pedúnculo. Contrariamente ao que observámos nos nódulos internos, os nódulos pedunculados apresentam evidências de que, numa fase avançada do desenvolvimento, se pode formar uma cavidade no seu interior. Contudo nas espécies agora estudadas não é nítido que isso aconteça, mas em *H. linarifolium*, os estádios finais do desenvolvimento dos nódulos aparentemente forma-se uma cavidade (Moura, 2008). Os nódulos são estruturas evolutivamente muito interessantes. Admitindo-se de um modo geral as estruturas secretoras internas são mais primitivas, são os idioblastos que armazenam no vacúolo os compostos que produzem, e pensando-se que um maciço de idioblastos terá evoluído no sentido de formar estruturas multicelulares complexas, bolsas e canais, então possivelmente os nódulos pedunculados serão estruturas mais primitivas que os tricomas glandulares.

Na antera de *H. elodes* existe uma protuberância glandular que encerra interiormente uma pequena glândula translúcida, facto que está em concordância com os resultados de Bottega *et al.* (1999). Por outro lado, em *H. perfoliatum*, *H. pubescens* e *H. tomentosum*, cada antera apresenta na região interlobular num volumoso nódulo, tal como Ciccarelli *et al.* (2001b) descreveram para *H. perforatum* e Moura (2008) descreveu para *H. linarifolium*. Contrariamente ao que observamos nas espécies que abrangemos neste estudo, os nódulos das anteras de *H. linarifolium* apresentam uma cavidade em estádios ontogénicos tardios. Este último autor ainda descreveu na zona interlobular em anteras uma protuberância elíptica em *H. androsaemum*, uma protuberância de cor amarelo pálido em *H. hircinum* subsp. *majus* e uma cavidade reniforme em *H. calycinum*.

Nas brácteas, sépalas e pétalas de *H. perfoliatum* podem ocorrer para além de nódulos pedunculados, nódulos internos alongados (vitas) ou nódulos internos esféricos e canais secretores que podem constituir estruturas híbridas parcialmente constituídas por nódulos e

canais. A única diferença entre os nódulos que ocorrem nas folhas e os que ocorrem nestes órgãos, alongados ou não, resume-se ao facto destes ocuparem toda a lâmina, sendo os seus limites as epidermes adaxial e abaxial. As estruturas híbridas são muito invulgares e a sua natureza dupla de nódulo e de canal poderá suportar a hipótese de que evolutivamente os canais se formaram a partir dos nódulos. Estas estruturas foram descritas pela primeira vez em pétalas de *H. balearicum* e *H. perforatum* (Curtis e Lersten, 1990). Estes autores descrevem-nas como quimeras, tubos híbridos, que sugerem que canais e nódulos partilham a mesma informação genética e podem alterara facilmente o modo de desenvolvimento. É curioso notar que Ciccarelli *et al.* (2001) não visualizaram estas estruturas, embora tenham estudado as pétalas e sépalas de *H. perforatum*. Estruturas híbridas são também referidas por Moura (2008) em *H. linarifolium*.

Em *H. elodes*, *H. pubescens* e *H. tomentosum*, no ápice das folhas, na superfície adaxial em posição subterminal, observamos estruturas que possivelmente correspondem a hidátodos. Em *H. elodes* no ápice da folha, o tufo de papilas poderá corresponder a um hidátodo tricomatoso e em *H. pubescens* e *H. tomentosum* parece existir um hidátodo de epitema em que o exsudado é libertado por poros aquíferos presentes em grande número nessa região da folha. Em nenhum dos casos foi contudo, observada gutação em plantas de campo, mas observamos esse processo em plantas de *H. perfoliatum* por nós cultivadas e onde não sabemos se existem ou não hidátodos.

Nas espécies agora estudadas é generalizada a presença de idioblastos taniníferos nas epidermes de folhas, brácteas e sépalas, a envolver os feixes e a revestir as paredes do ovário. Numerosos trabalhos relacionam a ocorrência dos compostos fenólicos com a protecção do embrião, contra o ataque de agentes patogénicos (Suárez & Engleman 1980 *in* Martins e Oliveira, 2001). Quando o fruto é deiscente, é frequente os taninos concentrarem-se principalmente nos tegumentos das sementes (Martins e Oliveira, 2001), tal como observámos. Encontramos também nos órgãos florais, anteras e receptáculo, e nas folhas numerosos idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio. Estes dois tipos de idioblastos são descritos como tendo várias funções entre elas, de defesa contra a herbivoria. Assim, a sua presença nas células das paredes do ovário e nas células das tecas das anteras podem ser a de protecção dos óvulos e do pólen, respectivamente.

No que respeita ao estudo histoquímico do secretado das diferentes estruturas para detecção *in situ* das principais classes de compostos químicos podemos dizer que no geral as bolsas estão envolvidas na síntese de óleos essenciais. Contrariamente ao referido por Ciccarelli *et al.* (2001b) para *H. perforatum* não foram detectados alcalóides nos secretados

quer dos canais quer das bolsas. Há que ter em conta que estes autores não mencionam os controlos que utilizaram e usaram por vezes corantes inespecíficos, como o Lugol, para detecção de alcalóides. Bottega *et al.* (2004) ao estudar *H. elodes* referem a presença de lípidos e óleos essenciais, classes de compostos que também detectamos, mas também referem tal como os autores anteriores a presença de alcalóides, neste caso usando reagentes mais específicos, mas também não menciona controlos. Contrariamente ao esperado, o secretado contido nas bolsas não reagiu positivamente ao teste com o Reagente de Nadi, sendo o resultado inespecífico já que o secretado corou de amarelo alaranjado. Em *H. perforatum* não se identificam por testes histoquímicos óleos essenciais nas folhas colhidas antes de ocorrer a floração. De acordo com Curtis e Lersten (1990) a composição do secretado sofre alteração de acordo com a fase, vegetativa ou floral, em que as plantas se encontram.

Em relação aos canais secretores do floema, podemos afirmar que estes produzem uma oleoresina uma vez que o secretado corou roxo intenso com o Reagente de Nadi. Este resultado está de acordo com os obtidos por Ciccarelli *et al.* (2001b) que afirma haver produção de óleo essencial, resinas e lípidos nos canais tipo A. O facto do calibre destes canais ser demasiado pequeno, associado à dificuldade de fazer cortes finos em órgãos muito delicados, dificultam a interpretação dos resultados, mas nas espécies nas quais foi possível observar bem *in vivo*, os canais no floema o resultado foi sempre de presença de uma oleoresina. Contudo, em *H. androsaemum*, *H. calycinum* e *H. linarifolium* (Moura, 2008) os canais do tipo A parecem produzir só óleo essencial, mas, nos canais do mesmo tipo de *H. hircinum* também foi detectada uma oleoresina (Moura, 2008). Maggi *et al.* (2004) referem em *H. androsaemum*, *H. hirsutum*, *H. hyssopifolium*, *H. montanum*, *H. perforatum*, *H. richeri* e *H. tetrapterum* apenas a presença de óleos essenciais tanto nas bolsas como nos canais, mas apenas usaram como corante o Vermelho Sudão que apenas detecta lípidos gerais. Também neste estudo foram detectados flavonóides no secretado dos canais e hipericina nos nódulos negros. Ciccarelli *et al.* (2001a) menciona, a detecção de taninos, alcalóides, e substâncias do tipo pectinas em nódulos negros, mas não descreve controlos e para além do Lugol utilizado para detectar alcalóides usa Dicromato de Potássio para detecção de taninos, reacção muito inespecífica. Bottega *et al.* (2004) detectaram lípidos e oleoresinas nos nódulos pedunculados. No nosso estudo, os resultados histoquímicos relativos à composição química dos nódulos foi sempre inconclusiva visto que a cor vermelha a negra destas estruturas mascarou sempre os resultados, sendo impossível a sua interpretação. A natureza do secretado negro produzido e armazenado pelas células nodulares é difícil de estudar *in situ*. As dificuldades que enfrentamos foram também referidas por Curtis e Lersten (1990) visto que ao seccionar o material fresco, o

secretado se dissolve ocultando as células. Estes resultados contrariam as observações de Höhnel (1881), Green (1884) e Weill (1903) que referem ser o secretado uma substância sólida e resinosa. Todavia, de acordo com a bibliografia, os nódulos negros produzem hipericina.

Não foram encontrados valores de MIC nos óleos essenciais/extractos etanólicos de *H. elodes* e *H. perforiatum*, no entanto os resultados obtidos dão-nos indicação de que o crescimento do micélio do fungo registou um decréscimo com o aumento da concentração testada. Este facto pode ser indicação de que perante uma concentração mais elevada a testar se poderá estar perante uma inibição total de crescimento do fungo. O baixo rendimento destas espécies em óleos essenciais e a elevada quantidade de material vegetal necessária para fazer os extractos não permitiu que o estudo fosse continuado até chegar ao valor da MIC para cada espécie.

V. CONCLUSÕES

1. As quatro espécies de *Hypericum* estudadas (*H. elodes*, *H. perforiatum*, *H. pubescens* e *H. tomentosum*) apresentam uma grande variedade de estruturas secretoras tanto em órgãos vegetativos como florais. Em todas estas espécies ocorrem canais secretores do tipo A no caule, folhas, brácteas, sépalas e pétalas, canais secretores do tipo B nas brácteas, sépalas e ovário e bolsas nas folhas. Em *H. elodes*, cada antera apresenta uma glândula translúcida interlobular.
2. *H. perforiatum*, *H. pubescens* e *H. tomentosum* apresentam nódulos negros internos nas margens das folhas e um por cada antera. Adicionalmente, podem ainda ser observado nódulos negros na margem das sépalas e pétalas de *H. pubescens*.
3. Na margem das brácteas e sépalas de *H. elodes*, *H. perforiatum* e *H. tomentosum* ocorrem nódulos pedunculados, nas duas últimas espécies estes nódulos estão também presentes na margem das pétalas.
4. Apenas em *H. perforiatum* foram observadas estruturas híbridas em brácteas, sépalas e pétalas.

5. De um modo geral as bolsas secretam óleos essenciais ricos em compostos fenólicos, os canais eliminam oleorresinas e os nódulos contêm essencialmente hipericina.
6. Os óleos essenciais e extractos etanólicos avaliados não revelaram a presença de concentrações mínimas inibitórias contra o basidiomycete *T. versicolor*, sendo no entanto significativo o decréscimo micelial obtido ao longo do estudo efectuado.

VI. PRESPECTIVAS FUTURAS

Os resultados apresentados nesta dissertação, levam-nos a considerar a continuação deste estudo, propondo as seguintes abordagens:

- Realizar estudos de anatomia em órgãos muito jovens para observar a ontogenia das diferentes estruturas secretoras.
- Estudar mais detalhadamente espécimens de *H. perforiatum*, espécie onde se observa uma grande diversidade de estruturas secretoras, algumas delas com características híbridas de calan e nódulo.
- Estudar detalhadamente novas espécies do género *Hypericum* de para tentar compreender as possíveis relações evolutivas entre glândulas.

- Estudar em pormenor espécies de outras famílias de Angiospérmicas onde possam ser encontradas estruturas secretoras semelhantes.
- Testar novos protocolos de fixação e de inclusão para preservar melhor os secretados.
- Realizar a ultraestrutura das células glandulares para esclarecer os processos ontogénicos que presidem à formação das diferentes estruturas secretoras.
- Utilizar outros testes histoquímicos para esclarecer a composição química dos secretados nomeadamente dos nódulos.
- Complementar os estudos histoquímicos com análises de composição química por técnicas de espectrometria de Massa e cromatografia líquida de alta precisão (HPLC).
- Adaptar os protocolos dos ensaios de actividades antifúngicas, testando outras concentrações.
- Avaliar outras actividades biológicas em espécies do género *Hypericum*.
- Utilizar compostos isolados na avaliação de novas actividades biológicas.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beerhues, L. (2006). Hyperforin. *Phytochemistry* 67: 2201-2207
- Bertoli, A., Giovannini, A., Ruffoni, B., Guardo, A. D., Spinelli, G., Mazzetti, M. e Pistelli, L. (2008). Bioactive constituent production in St. John's Wort *in vitro* hairy roots. regenerated plant lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 5078–5082
- Bottega, S., Garbari, F. e Pagni, A. M. (2004). *Hypericum elodes* L. (Clusiaceae): The secretory structure of the flower. *Israel Journal of Plant Sciences* 52: 51-57
- Boubakir, Z., Beuerle, T., Liu, B. e Beerhues, L (2005). The first prenylation step in hyperforin biosynthesis. *Phytochemistry* 66: 51-57
- Cain, A. J. (1947). The use of Nile Blue in the examination of lipids. *Quarternary Journal of Microscopy Science* 88:111-116
- Charrière-Ladreix, Y. (1976). Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. *Planta* 129:167-174.
- Ciccarelli, D., Andreucci, A. C. e Pagni, A. M (2001a). The “black nodules” of *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum*: Morphological, anatomical, and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Israel Journal of Plant Sciences* 49: 33-40

- Ciccarelli, D., Andreucci, A. C. e Pagni, A. M. (2001b). Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): Morphological, anatomical, and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of Botany* 88: 637-644
- Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S. e Hirata, T. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour and Fragrance Journal* 19: 62-68
- Carmandia, F. M. e Aedo, C. (2005). LVIII. GUTTIFERAE: in Flora Ibérica: plantas vasculares da Península Ibérica e Ilhas Baleares. Real Jardim Botânico CSIC 2ª Ed.
- Çırak, C. (2007). Seed germination protocols for *ex situ* conservation of some *Hypericum* species from Turkey. *American Journal of Plant Physiology* 2: 287-294
- Çırak, C., Radušienė, J. e Çamas, N. (2008). Pseudohypericin and hyperforin in two Turkish *Hypericum* species: variation among plant parts and phenological stages. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 377-382
- Çırak, C., Radušienė, J., Janulis, V. e Ivanauskas, L. (2007). Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: variation among plant parts and phenological stages. *Botanica Helvetica* 117: 29-36
- Çırak, C., Radušienė, J., Janulis, V., Ivanauskas, L. e Arslan, B. (2007). Chemical constituents of some *Hypericum* species growing in Turkey. *Journal of Plant Biology* 50: 632-635
- Cordeiro, C. H. G., Chung, M. C. e Sacramento, L. V. S. (2005). Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15: 272-278
- Couladis, M., Badisa, R. B., Baziou, P., Chaudhuri, S. K., Pilarinou, E., Verykokidou, E. e Harvala, C. (2002). Antioxidant and cytotoxic activities of *Hypericum* sp. on brine shrimps and human cancer cell lines. *Phytoterapy Research* 16: 719-722
- Couladis, M., Baziou, P., Petrakis, P.V. e Harvala, C. (2001). Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. growing in different locations in Greece. *Flavour and Fragrance Journal* 16: 204-206
- Curtis, J. D. e Lersten, N. R. (1990). Internal secretory structures in *Hypericum* (Clusiaceae): *H. perforatum* L. and *H. balearicum*. *New Phytology* 114: 571-580
- David, R. e Carde, J. P. (1964). Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 258:1338-1340
- Demirci, B., Baser, K. H. C., Crockett, S. L. e Khan, I. A. (2005). Analysis of the volatile constituents of Asian *Hypericum* L. (Clusiaceae, Hyperidoideae) Species. *Journal of Essential Oil Research* 17: 659-663
- Erken, S., Malyer, H., Demirci, F., Demirci, B. e Baser, H. C. (2001). Chemical investigations on some *Hypericum* species growing in Turkey-I. *Chemistry of Natural Compounds* 37: 434-438
- Anonymous, (1996). European Pharmacopoeia, 3a Edição. Council of Europe, Strasbourg 121-122.
- Feder, N. e O'Brien, T. P. (1968). Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* 55:123-142

- Fornasiero, R. B., Bianchi, A. e Pinetti, A. (1998). Anatomical and ultrastructural observations in *Hypericum perforatum* L. leaves. *Journal of Herbs, Spices & medical Plants* 5: 21-33
- Fornasiero, R. B., Maffi, L., Benvenuti, S. e Bianchi, A. (2000). Morphological and phytochemical features of secretory structures in *Hypericum richeri* (Clusiaceae). *Nordic Journal of Botany* 20: 427-434
- Franco, J. A. (1971). Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). 1ª Edição, Lisboa, 1: 447-453
- Furr, M. e Mahlberg, P. G. (1981). Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44:153-159
- Gabe, M. (1968). Techniques histologiques. *Masson & Cie*, Paris
- Ganter, P. e Jollès, G. (1969). Histochimie normale et pathologique. *Gauthier-Villars*, Paris, v.1, 2
- Hardman, R. e Sofowora, E. A. (1972). Antimony trichloride as test reagents for steroids, specially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. *Stain Technol* 47: 205-208
- Hosni, K., Msaâda, K., Taârit, M. B, Hammami, M. e Marzouk, B. (2010). Bioactive components of three *Hypericum* species from Tunisia: a comparative study. *Industrial Crops and Products* 31: 158-163
- Hosni, K., Msaâda, K., Taârit, M. B, Ouchikh, O., Kallel, M. e Marzouk, B. (2008). Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum tomentosum* L. growing wild in Tunisia. *Industrial crops and products* 27: 308-314
- Jensen, W. A. (1962). Botanical histochemistry: principles and practice. *Freeman*, San Francisco
- Johansen, D. A. (1940). Plant microtechnique. *McGraw-Hill*, New York
- Kitanov, G. M. e Nedialkov, P. T. (1998). Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 26: 647-653
- Kirk Junior, P. W. (1970). Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technology* 45:1-4
- Kızıl, G., Toker, Z., Özen, H. Ç. e Aytekin, Ç. (2004). The antimicrobial activity of essential oils of *Hypericum scabrum*, *Hypericum scabroides* and *Hypericum triquetrifolium*. *Phytoterapy Research* 18: 339–341
- Lieutaghi, P. (2002). O Grande Livro das Ervas. Temas e Debates 1ª Ed. Lisboa
- Martins, M. A. G. e Oliveira, D. M. T. (2001). Morfo-anatomia e ontogênese do fruto e da semente de *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze (Fabaceae: Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 24: 109-121
- Moura, B. T. (2008). Dissertação de Mestrado: Estruturas secretoras em espécies de *Hypericum* (Cluseaceae) da flora portuguesa. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
- Nakata, P. A. (2003). Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science* 164: 901-909
- Nogueira, T., Duarte, F., Tavares, R., Curto, M. J. M., Capelo, J. e Freitas, A. C. (1999). Comparative study of the aromas of *Hypericum* L. species from Portugal using olfactoscopy. *Flavour and Fragrance Journal* 14: 195-199

- Neu, R. e Neuhoff, E. **(1957)**. Eine Methode zur Identifizierung papierchromatographisch aufgetrennter lavone und ihrer Spaltprodukte, dargestellt am Kämpferol aus *Aesculus hippocastanum* L. *Naturwissenschaften* 44: 10-10
- Nogueira, T., Marcelo-Curto, M. J., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Rubiolo, P. e 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* 36: 40-50
- Norma Europeia prEN 113:1994. Wood preservatives. Method of test for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes-Determination of the toxic values.
- Onelli, E., Rivetta, A., Giorgi, A., Bignami, M., Cocucci, M. e Patrignani, G. **(2002)**. Ultrastructural studies on the developing secretory nodules of *Hypericum perforatum*. *Flora* 197: 92-102
- Opitz, S.; Schnitzler, J. P; Hause, B. e Schneidr, B. **(2003)**. Histochemical analysis of phenylphenalenone-related compounds in *Xiphidium caeruleum* (Haemodoraceae). *Planta* 216:881-889
- Pearse, A. G. E. **(1985)**. Histochemistry theoretical and applied. 4th ed. *Churchill Livingstone*, London
- Petrakis, P. V., Couladis, M. e Roussis, V. **(2005)**. A method for detecting the biosystematic significance of the essential oil composition: the case of five Hellenic *Hypericum* L. species. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 873-898
- Pieroni, A. Quave, C. L. e Santoro, R. F. **(2004)**. Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* 95: 373-384
- Piovan, A., Filippini, R., Caniato, R., Borsarini, A., Maleci, L. B. e Cappelletti, E. M. **(2004)**. Detection of hypericins in the “red glands” of *Hypericum elodes* by ESI-MS/MS. *Phytochemistry* 65: 411-414
- Rapsida, A., lauk, L. e Ragusa, S. **(2003)**. A quantitative morphological analysis of some *Hypericum* species. *Pharmaceutical Biology* 41: 1-6
- Rego, J. C., Benkiki, N., Chosson, E., Kabouche, Z., Seguin, E. e Costentin, J. **(2007)**. Antidepressant-like effects of hyperfoliatin, a polyisoprenylated phloroglucinol derivative from *Hypericum perforatum* (Clusiaceae) is associated with an inhibition of neuronal monoamines uptake. *European Journal of Pharmacology* 569: 197-203
- Rocha, F. **(1996)**. Nomes vulgares de plantas existentes em Portugal. Direcção Geral de Protecção de Culturas, Lisboa
- Soelberg, J., Jørgensen, L. B. e Jäger, A. K. **(2007)**. Hyperforin accumulates in the translucent glands of *Hypericum perforatum*. *Annals of Botany* 99: 1097-1100
- Touafek, O., Nacer, A., Kabouche, A. e Kabouche, Z. **(2005)**. Analysis of the essential oil of Algerian *Hypericum perforatum* (L). *Flavour and Fragrance Journal* 20: 669-670
- Viana, M. G., Albuquerque, C. C., Medeiros, E. V., Viana, F. A. e Silva, K. M. B. **(2008)**. Evaluation of the fungicide potential of ethanolic extracts of *Senna alata* against *Monosporascus cannonballus*. *Ciências Agrotecnológicas* 32: 1387-1393

- Voda, K., Boh, B., Vrtačnik, M. e Pohleven, F. **(2003)**. Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 51: 51-59
- Wu, Q. L., Wang, S. P., Du, L. J., Yang, J. S. e Xiao, P. G. **(1998)**. Xanthonenes from *Hypericum japonicum* and *Hypericum henryi*. *Phytochemistry* 49: 1395-1402
- Yoder, L. R. e Mahlberg, P. G. **(1976)**. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany* 63: 1167-1173
- Zobayed, S. M. A., Afreen, F., Goto, E. e Kozai, T. **(2006)**. Plant-environment interactions: accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. *Annals of Botany* 98: 793-804

VIII. ESTAMPAS