

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Ciências**

**Departamento de Biologia Vegetal**



**A Flora Medicinal e Aromática da Herdade da  
Ribeira Abaixo, Grândola (Estação de Campo,  
CBA): caracterização micromorfológica e dos  
óleos essenciais de *Lavandula luisieri***

**Maria Daniela Madelino Feijão**

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

**2011**

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Ciências**

**Departamento de Biologia Vegetal**



**A Flora Medicinal e Aromática da Herdade da  
Ribeira Abaixo, Grândola (Estação de Campo,  
CBA): caracterização micromorfológica e dos  
óleos essenciais de *Lavandula luisieri***

**Maria Daniela Madelino Feijão**

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

**2011**

**Dissertação orientada por:**

**Orientadora interna: Professora Doutora Ana Isabel de Vasconcelos Dias Correia,**  
Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

**Orientadora externa: Professora Doutora Generosa Maria Manso Teixeira Xavier,**  
Departamento de Ciências Farmacológicas, Faculdade de Farmácia da Universidade de  
Lisboa.

## Índice

---

Resumo.....	- 1 -
<i>Abstract</i> .....	- 2 -
1. Introdução.....	- 3 -
1.1. O Género <i>Lavandula</i> .....	- 4 -
1.2. Taxonomia.....	- 4 -
1.3. Caracterização das Espécies em estudo.....	- 5 -
1.3.1. <i>L. luisieri</i> (Rozeira) Rivas-Martinez.....	- 5 -
1.3.2. <i>L. pedunculata</i> (Miller) Cavanille.....	- 6 -
1.4. Caracterização da flor.....	- 6 -
1.5. Metabolismo secundário em plantas.....	- 7 -
1.5.1. Óleos essenciais na quimiotaxonomia.....	- 9 -
1.6. Estruturas secretoras na família Lamiaceae.....	- 10 -
2. Objectivos.....	- 12 -
3. Material e Métodos.....	- 13 -
3.1. Material vegetal.....	- 13 -
3.2. Estudo dos óleos essenciais.....	- 14 -
3.2.1. Extracção.....	- 14 -
3.2.2. Análise e identificação.....	- 14 -
3.2.2.1. Cromatografia Gás-líquido.....	- 14 -
3.2.2.2. Cromatografia Gás-líquido / Espectometria de Massa.....	- 15 -
3.2.3. Análise de dados.....	- 15 -
3.3. Estudo morfológico.....	- 15 -
3.3.1. Microscopia electrónica de varrimento.....	- 15 -
3.3.2. Microscopia óptica em luz visível .....	- 16 -
3.4. Estudo histoquímico.....	- 16 -
3.4.1. Microscopia óptica em luz visível.....	- 16 -
3.4.2. Microscopia óptica de fluorescência.....	- 16 -
4. Resultados.....	- 18 -
4.1. Análise dos óleos essenciais.....	- 18 -
4.2. Morfologia.....	- 23 -
4.2.1. Morfologia e distribuição de tricomas em <i>L. luisieri</i> .....	- 23 -
4.2.1.1. Tricomas não glandulares.....	- 24 -
4.2.1.2. Tricomas glandulares.....	- 24 -
4.2.2. Morfologia e distribuição de tricomas em <i>L. pedunculata</i> .....	- 27 -
4.2.2.1. Tricomas não glandulares.....	- 27 -
4.2.2.2. Tricomas glandulares.....	- 27 -
4.3. Estudo histoquímico em MOV.....	- 31 -

4.3.1. Caracterização de Polissacáridos Totais.....	- 31 -
4.3.2. Caracterização de Pectinas.....	- 31 -
4.3.3. Caracterização de Mucilagens.....	- 31 -
4.3.4. Caracterização de Lípidos Totais.....	- 31 -
4.3.5. Caracterização de Lípidos Ácidos e Neutros.....	- 31 -
4.3.6. Caracterização de Ácidos Gordos.....	- 35 -
4.3.7. Caracterização de Óleos Essenciais e Ácidos Resínicos.....	- 35 -
4.3.8. Caracterização de Terpenóides com grupo Carbonilo.....	- 35 -
4.3.9. Caracterização de Fenóis.....	- 35 -
4.3.10. Caracterização de Taninos.....	- 35 -
4.3.11. Caracterização de Alcalóides.....	- 36 -
4.4. Estudo histoquímico em MOF.....	- 39 -
4.4.1. Autofluorescência.....	- 39 -
4.4.2. Fluorescência Induzida.....	- 39 -
5. Discussão.....	- 44 -
5.1. Análise dos óleos essenciais.....	- 44 -
5.2. Caracterização morfológica.....	- 46 -
5.3. Estudo Histoquímico.....	- 47 -
6. Conclusão e Perspectivas Futuras.....	- 50 -
7. Referências Bibliográficas.....	- 51 -
8. Anexos.....	- 55 -
8.1. Estudo micromorfológico – Protocolos.....	- 55 -
8.2. Estudo Histoquímico – Protocolos.....	- 55 -
8.3. Estudo da Fluorescência Induzida – Protocolo.....	- 58 -

## **Agradecimentos**

---

Aos meus pais Daniel e Maria pela oportunidade de mestrado, sem a ajuda deles não seria possível, por todo o apoio e amor que me deram em todas as alturas e por acreditarem em mim.

Às Professoras Doutoras Generosa Teixeira, Ana Cristina Figueiredo e Ana Isabel Correia pela orientação deste trabalho, pelas condições materiais colocadas à disposição, por todo o apoio e interesse durante este ano, pela ajuda preciosa durante a elaboração desta tese e revisão da mesma.

Ao meu namorado João Pedro, minhas sobrinhas Ana Catarina e Helena, ao meu irmão Nelson e cunhada Liliana por todo o apoio, carinho e bons momentos que me deram e continuam a dar.

Aos meus amigos Sofia e Luís por todo o apoio e companheirismo nesta caminhada em Lisboa.

À Natacha e Marta pela ajuda na destilação dos óleos essenciais e pelos momentos de descontração.

À Marta Daniela, Jorge e Sofia pela ajuda em todas as dúvidas que surgiram durante o trabalho no laboratório.

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

## Abreviaturas e Siglas

---

**°C** – Graus Celsius

**°C/min.** – Graus Celsius por minuto

**CB** – Castelo de Bode

**CBA** – Centro de Biologia Ambiental

**cm** – Centímetro

**cm/s** – Centímetro por segundo

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono

**CoA** – Co-enzima A

**DB1** – Coluna capilar de GCL, com fase imobilizada de metilsilicone

**DB-17HT** – Coluna capilar de GCL, com fase imobilizada de fenilmetilsilicone

**d.i.** – Diâmetro interno

**DIC** – Detector de Ionização de Chama

**DMAPP** – Dimetil pirofosfato

**DNA** – Ácido desoxirribonucleíco

**Esq.** – Esquema

**Est.** – Estampa

**eV** – Electrão-volt

**FM** – Fluorescence microscopy

**FPP** – Farnesil pirofosfato

**GCL** – Cromatografia Gás-Líquido

**GCL/EM** – Cromatografia Gás-Líquido acoplada a Espectrometria de Massa

**GPP** – Geranil pirofosfato

**GGPP** – Geranilgeranil pirofosfato

**h** – Hora

**HRA** – Herdade da Ribeira Abaixo

**IPP** – Isopentenil pirofosfato

**I.R.** – Índice de Retenção

**KV** – Quilovolts

**L.** – *Lavandula*

**L.** – Linnaeus

**LISC** – Herbário do Jardim Botânico da Universidade de Lisboa

**LISI** – Herbário do Instituto Superior de Agronomia

**LM** – Light microscopy

**Máx** – Máximo

**MEE** – Mata Experimental do Escaroupim

**MEV** – Microscopia electrónica de varrimento

**Mill.** – Miller  
**mm** – Milímetro  
**Min** – Mínimo  
**mL/min.** – mililitro/ minuto  
**MOF** – Microscopia óptica de Fluorescência  
**MOV** – Microscopia óptica em luz Visível  
**NEU** – Reagente de produtos naturais – polietileno glicol  
**NID** – Composto não identificado D  
**nm** – Nanómetro  
**NTSYS** – *Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System* **Sin.** – sinónimo  
**PAL** – Fenilalanina amónia liase  
**PAS** – Ácido periódico – reagente de Schiff  
**s** – Segundo  
**Samp.** – Sampaiana  
**Séc.** – Século  
**SEM** – Scanning electron microscopy  
**subsp.** – Subespécie  
**TAL** – Tirosina amónia liase  
**u** – Unidade de massa atómica  
**UPGMA** – Agrupamento segundo a associação média  
**UV** – Radiação Ultra Violeta  
**v** – Vestigial  
**v/f.w.** – Volume/ fresh weight  
**v/p.f.** – Volume/ peso fresco  
**µm** – Micrómetro

## Resumo

---

De entre as plantas aromáticas da Flora de um montado inclui-se a família Lamiaceae, onde encontramos o género *Lavandula*. A taxonomia do género *Lavandula* tem sofrido diversas alterações, devido à sua variabilidade morfológica e capacidade de hidridização. Com este trabalho pretendeu-se aprofundar o estudo de duas espécies, *L. luisieri* e *L. pedunculata*, realizando uma abordagem conjunta através do estudo químico dos seus óleos essenciais e de análise micromorfológica das suas flores.

Os óleos essenciais de várias amostras de ambas as espécies de *Lavandula* colhidas em anos consecutivos foram isolados por hidrodestilação, examinados por CGL, identificados por CGL/EM e sujeitos a análise aglomerativa usando o programa NTSYS. A morfologia e distribuição do indumento de estruturas florais de ambas as espécies foram analisados usando as técnicas de MEV e MOV. Para o estudo histoquímico das duas espécies, utilizaram-se testes destinados à identificação de determinados grupos químicos, observando-se os resultados em MOV. Observou-se ainda a autofluorescência e fluorescência induzida com reagente de NEU em MOF.

Os óleos essenciais das amostras de *L. luisieri* e *L. pedunculata* foram obtidos num intervalo de rendimentos de v-1% e 2% (v/ p.f.). Os monoterpenos oxigenados foram detectados em maior percentagem tanto para *L. luisieri* (33-57%), como para *L. pedunculata* (90-98%). O conjunto de todos os óleos essenciais foram agrupados em três *clusters* (*cluster* I – *L. pedunculata*, *clusters* II e III – *L. luisieri*). O componente com maior percentagem relativa no *cluster* I foi a fenchona (62-70%), no *cluster II* o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (4-20%) e no *cluster III* o 1,8-cineol (11-38%).

Na caracterização micromorfológica das duas espécies verificou-se que apresentam vários tipos de tricomas não glandulares e glandulares, estes últimos distribuídos maioritariamente nas superfícies abaxiais de sépalas e brácteas férteis. Em *L. pedunculata* identificaram-se tricomas que não foram encontrados em *L. luisieri* e correspondem a tricomas capitados tipo III, mistos tipo I e tipo II, e ainda um tipo de tricoma peltado com pedúnculo grande que ainda não havia sido referenciado em termos bibliográficos.

Do estudo histoquímico concluiu-se que os grupos de compostos existentes em *L. luisieri* e *L. pedunculata* foram: polissacáridos totais, pectinas, mucilagens, lípidos (totais, ácidos e neutros e ácidos gordos), terpenóides (óleos essenciais e ácidos resínicos e terpenóides com grupo carbonilo), fenóis e alcalóides. Em MOF foi ainda detectada a presença de flavonóides. A maioria destes compostos foi detectada nas cabeças glandulares dos vários tipos de tricomas.

**Palavras chave:** *L. luisieri*, *L. pedunculata*, óleos essenciais, tricomas, histoquímica, fluorescência.

## **Abstract**

---

The aromatic plants of the Flora of a “montado” comprises the Lamiaceae family, where the genus *Lavandula* is included. The taxonomy of the genus *Lavandula* has undergone several changes due to their morphological variability and ability to hybridization. This work aimed to deepen the study of two species, *L. luisieri* and *L. pedunculata*, carrying out a joint approach by chemical study of its essential oils and micromorphological analysis of the flowers.

The essential oils of several samples of both species of *Lavandula* harvested in consecutive years were isolated by hydrodistillation, examined by GLC, identified by GLC / MS and subjected to analysis using the agglomerative program NTSYS. The morphology and distribution of the indumentum of floral structures of both species were studied using the techniques of SEM and LM. In the histochemical study of the two species, we used selected tests for the identification of certain chemical groups, as well as fluorescence microscopy.

Essential oils from samples of *L. luisieri* and *L. pedunculata* were obtained over a range of yields v-1% and 2% (v/f.w.). The oxygenated monoterpenes were detected in higher percentage for both *L. luisieri* (33-57%) and *L. pedunculata* (90-98%). The set of all essential oils were grouped into three clusters (cluster I – *L. pedunculata*, clusters II and III – *L. luisieri*). The component with the largest percentage was the fenchone (62-70%) in cluster I, trans- $\alpha$ -necrodiyl acetate (4-20%) in cluster II and 1,8-cineole (11-38%) in cluster III.

In the micromorphological characterization of the two species we have found different types of non-glandular and glandular trichomes, the latter mostly distributed on the abaxial surfaces of sepals and fertile bracts. Some types of trichomes were just identified in *L. pedunculata*, such as capitate type III, mixed type I and type II, and even a kind of peltate trichome with large stalk that had not yet been referenced in bibliography.

Histochemical study concluded that the groups of compounds identified in *L. luisieri* and *L. pedunculata* were: total polysaccharides, pectins, mucilages, lipids (total, acidic and neutral fatty acids), terpenoids (essential oils and resin acids and terpenoids with the carbonyl group), phenols and alkaloids. In FM was still detected the presence of flavonoids. Most of these compounds were detected on the heads of the glandular trichomes.

**Keywords:** *L. luisieri*, *L. pedunculata*, essential oils, trichomes, histochemistry, fluorescence.

## 1. Introdução

---

A Herdade da Ribeira Abaixo (HRA) situa-se na orla nascente da Serra de Grândola e constitui a Estação de Campo institucionalmente associada ao Centro de Biologia Ambiental (CBA), uma unidade de Investigação e Desenvolvimento que se encontra sediada na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

A Estação de Campo está situada numa região dominada pelo montado, uma formação vegetal típica do Mediterrâneo. Os montados são ecossistemas característicos do Sudoeste da Península Ibérica, ocupando no nosso país uma área considerável. A sua diversidade climática, sazonalidade acentuada e baixa disponibilidade de água, levaram ao aparecimento de uma vegetação dominada por árvores e arbustos de folha perene e plantas herbáceas anuais, existindo um grande número de espécies, muitas delas endémicas da região.

De entre as famílias botânicas da Flora do montado destacamos, pela sua importância, a família Lamiaceæ, onde se inclui o género *Lavandula*.

Existe um interesse crescente nas propriedades das plantas aromáticas nas indústrias farmacêutica e alimentar e a nível académico. Deste modo, a caracterização e análise das propriedades químicas e biológicas destas plantas são essenciais. A taxonomia da família Lamiaceae tem sido muito discutida devido à sua variabilidade morfológica e à sua capacidade de hibridização (Upson, 2002). Dentro desta família as espécies do género *Lavandula*, *L. luisieri* (Rozeira) Rivas-Martinez (Sin. *L. stoechas* L. subsp. *luisieri* Rozeira) e *L. pedunculata* Miller (Sin. *L. stoechas* L. subsp. *pedunculata* (Mill.) Samp. Ex Rozeira) têm sofrido várias alterações taxonómicas devido a estas variações. A caracterização morfológica tem sido a principal abordagem para a descrição de plantas e sua classificação, apesar dos caracteres morfológicos poderem ser afectados pelas condições do ambiente e pelo estágio fenológico. Os caracteres micromorfológicos têm sido dos mais usados, em Taxonomia devido à sua estabilidade (Salmaki *et al.*, 2009). Uma forma de complementar este tipo de estudos é através da análise de materiais secretados por estruturas presentes nas plantas, os tricomas glandulares, que sintetizam e acumulam quantidades significativas de compostos voláteis. Apesar da metodologia de extração dos compostos voláteis e, por vezes, a sua identificação terem alguns problemas, a composição química destes compostos é usada para distinguir entre espécies próximas ou mesmo híbridos (Figueiredo *et al.*, 2008).

Alguns *taxa* nativos têm recebido pouca atenção mesmo sendo relatados como espécies aromáticas e pouca relevância tem sido dada às suas estruturas glandulares e produtos químicos (Lavoine-Hannequelle e Casabianca, 2004). É interessante este tipo de estudos, pois além de permitirem um maior conhecimento de espécies selvagens e das suas

características, ajuda a clarificar a sua taxonomia. Este trabalho encontra-se na sequência de outros estudos anteriormente iniciados com as mesmas espécies.

### 1.1. O Género *Lavandula*

O nome do género *Lavandula* deriva do latim “lavare”, que significa lavar. Consta de 39 espécies com uma distribuição geográfica ampla: desde a região macaronésica, por toda a costa mediterrânica e, de forma dispersa, pela metade do Norte de África, península Arábica e Sul da Ásia até à Índia. Estas plantas são usadas desde a antiguidade como ornamentais, medicinais, aromatizantes e condimentares e para a obtenção de óleos essenciais (Morales, 2010). As espécies de *Lavandula* existentes em Portugal são denominadas popularmente de alfazema e rosmaninho e são descritas por vários autores pelas suas propriedades terapêuticas (Vasconcelos, 1949; Feijão, 1979; Rodrigues 2002).

### 1.2. Taxonomia

As propriedades medicinais das plantas aromáticas são conhecidas desde tempos antigos. Durante o Renascimento, com a invenção da imprensa, muitos trabalhos reconhecendo as várias espécies de *Lavandula* foram publicados em *herbals*, e incluíam as espécies *L. angustifolia*, *L. latifolia*, *L. multifida*, *L. dentata* e *L. pedunculata* (Upson & Andrews, 2004). No final do séc. XVI, início do séc. XVII, os primeiros taxonomistas, começaram a interessar-se pelo valor intrínseco e científico das plantas e não apenas no seu valor utilitário. No ano de 1700, o botânico Joseph Pitton de Tournefort reconheceu na sua obra *Institutiones Rei Herbariae* os géneros *Lavandula* e *Stoechas* que hoje se considera como um único. Para Tournefort, o género *Lavandula* incluía as espécies *L. multifida* e *L. spica* e o género *Stoechas* as espécies *L. stoechas* e *L. dentata* (Upson & Andrews, 2004).

Na nomenclatura da botânica moderna, que se iniciou no ano de 1753 com a obra *Species Plantarum* e numa época em que apenas as floras Europeia e do Mediterrâneo eram mais bem conhecidas. Linnaeus usou pela primeira vez nomes binomiais e foi o primeiro a atribuir nomes modernos a algumas das espécies então reconhecidas: *L. dentata*, *L. stoechas*, *L. spica* (incluindo *L. angustifolia* e *L. latifolia*) e *L. multifida*. Além destes quatro nomes, Miller atribuiu os primeiros nomes binomiais para *L. canariensis*, *L. angustifolia* e *Stoechas pedunculata* (*L. pedunculata*) (Upson & Andrews, 2004).

A primeira monografia sobre o género, *De Lavandula*, não foi publicada até 1780 por Lundmark, este trabalho reconhecia seis espécies (Upson & Andrews, 2004). Em 1826 seguiu-se uma segunda monografia, *Histoire Naturelle des Lavandes* por Gingins de la Sarraz, que enumerou doze espécies e agrupou-as em três secções (Upson, 2002). Uma terceira monografia, *A Taxonomic Study of the Genus Lavandula*, foi escrita em 1937 por D. Chaytor, onde se reconheciam 28 espécies agrupadas em cinco secções e acrescidas de

muitos *taxa* infraespecíficos. Foi descrita uma única espécie nova (*L. somaliensis*), uma subespécie (*L. pedunculata* subsp. *lusitanica*) e foi considerada uma nova secção *Subnudae*. A secção *Stoechas* foi revista pelo botânico português Arnaldo Rozeira em 1949, onde reconheceu *L. dentata* como sendo distinta das outras espécies, e dividindo a secção *Stoechas* em duas subsecções: *Dentata* incluindo *L. dentata*, e *Stoechas* incluindo *L. stoechas* e *L. viridis*. Contudo, o aspecto mais significativo deste tratamento foi o de considerar *L. pedunculata* como uma subsp. de *L. stoechas* (Andrews e Upson, 2004). Na segunda edição da *Flora de Portugal*, Pereira Coutinho (1939) descreve sete espécies, *L. multifida* L., *L. spica* L., *L. dentata* L., *L. viridis*, *L. stoechas* L. e a *L. pedunculata*. Na Flora Europeia, Guinea (em Tutin *et al.*, 1972) divide a espécie *L. stoechas* em 6 subespécies diferentes: *stoechas*, *cariensis*, *pedunculata*, *lusitanica*, *luisieri* e *sampaiana*. A *Nova Flora de Portugal* de Amaral Franco (1984), indica cinco espécies estando *L. stoechas* e as suas categorias infraespecíficas distribuídas por duas espécies distintas: *L. luisieri* e *L. pedunculata* (subsp. *pedunculata*, *sampaiana* e *lusitanica*).

Rivas-Martinez *et al.* (1990) propuseram onze novas combinações nomenclaturais relativas a *taxones* ibéricos, entre eles a espécie *L. sampaiana* (Rozeira) (Basinómio: *L. stoechas* subsp. *sampaiana*) e a espécie *L. sampaiana* subsp. *lusitanica* (Chaytor) (Basinómio: *L. pedunculata* var. *lusitanica*). A *Flora Iberica* (Morales, 2010), a obra mais recente que descreve as *Lavandulas* da Península Ibérica, refere 8 espécies: *L. angustifolia* (subsp. *pyrenaica*), *L. latifolia*, *L. lanata*, *L. stoechas* (subsp. *stoechas* e *luisieri*), *L. pedunculata*, *L. viridis*, *L. dentata* e *L. multifida*. Morales, contrariamente a Franco, mantém a espécie *L. stoechas* com duas subespécies (subsp. *stoechas* e *luisieri*). Daqui se depreende que, de acordo com a *Flora Iberica* (Morales, 2010), a designação de *L. luisieri*, adoptada no presente trabalho, é actualmente *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

### 1.3. Caracterização das espécies em estudo

#### 1.3.1. *L. luisieri* (Rozeira) Rivas-Martinez

Esta espécie apresenta-se sob a forma de sub-arbusto lenhoso de 20-60 cm, tomentoso e aromático. As folhas são acinzentado-tomentosas, inteiras, as distais dos ramos férteis com 8-39 x 1.8-7 mm apresentam-se oblongas a lanceoladas, planas ou de margens mais ou menos onduladas. As folhas dos ramos estéreis são menores, mais estreitas e de margens bem revolutas com um pedúnculo com cerca de 0-30 (-50) mm. As flores inserem-se em inflorescências do tipo espiga medindo esta cerca de 15-40 (-50) x 8-15 mm de forma cilíndrica e por vezes ovóide, é pedunculada (5-15 mm), de brácteas férteis cordado-reniformes, mais largas que altas, com nervuras proeminentes, bem reticuladas, tomentosas e de brácteas distais estéreis têm 8-30 (-45) mm, oblanceoladas, geralmente purpúreas ou lilacíneas, raramente brancas. O cálice mede cerca de 3-5 mm, é tomentoso mas de dentes

viloso-ciliados, o dente superior é apicalmente provido dum apêndice obreniforme com 1-3 mm de largura. A corola com 6-8 mm apresenta uma coloração púrpura-anegrada (Franco, 1984)

Para Franco (1984) esta espécie é muito idêntica à *Lavandula stoechas* L., mas esta última distingue-se sobretudo por ter as folhas dos ramos férteis menores (até 30 x 4 mm), pedúnculos com 0-15 (-20) mm, espigas menores (até 35 x 14 mm) e cálices crespo-vilosos.

Na Flora Ibérica Morales (2010) descreve a presença desta espécie designada nesta obra de *L. stoechas* subsp. *luisieri* em várias regiões de Portugal, como o Alto Alentejo, Algarve, Baixo Alentejo, Beira Litoral, Estremadura e Ribatejo.

### 1.3.2. *L. pedunculata* (Miller) Cavanille

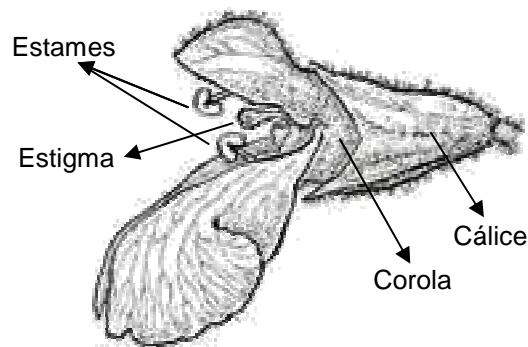
Esta espécie apresenta-se sob a forma de sub-arbusto lenhoso, tomentoso, atingindo até 70 cm. As suas folhas têm uma coloração acinzentada-tomentosa ou verde-acinzentada-tomentosa, são inteiras e de margens onduladas. As folhas distais dos ramos férteis medem cerca de 12-55 x 1-5 mm, são lineares a oblongo-oblongoladas, enquanto que as dos ramos estéreis são menores e mais estreitas. A espiga mede 10-35 x 8-17 mm apresentando uma forma ovóide ou subcilíndrica, de pedúnculo com cerca de 5-24 cm. As brácteas férteis têm 4-7 x 4-6 mm, são mais ou menos obtriangulares e revelam nervuras pouco proeminentes, longitudinais e paralelas. As brácteas estéreis têm 12-30 mm vão de oblongas a lanceoladas, apresentam-se de violáceas a pálido-lilacíneas ou menos vezes brancas. O cálice mede cerca de 4-7 mm, é 13-nérveo, o dente superior apicalmente provido dum apêndice obreniforme com 1.2-1.5 mm de largura. A corola com 6-8 mm apresenta-se com uma coloração púrpura-anegrada (Franco, 1984).

Em Portugal esta espécie pode ser encontrada nas regiões do Alto Alentejo, Algarve, Beira Alta, Baixo Alentejo, Beira Baixa, Beira Litoral, Douro Litoral, Estremadura, Minho e Trás os Montes (Alto Douro) (Morales, 2010).

## 1.4. Caracterização da flor

As flores do género *Lavandula* são vistosas de coloração azul-violeta, encontrando-se reunidas em inflorescências espiciformes terminais derivadas de uma série de ramos cimosos, frequentemente axilares (Upson, 2002). São flores hermafroditas, diclamídeas, pentâmeras, bilabiadas e zigomórficas. O cálice (conjunto de sépalas, Esq. 1.1) é sinsépalo, tubuloso e pode ser regular ou bilabiado, sendo que o lábio superior possui dois lóbulos e o inferior três, com tamanho igual ou com o lábio superior maior ou modificado. A corola (conjunto de pétalas, Esq. 1.1) é simpétala, tubulosa, tendo cerca de três vezes o comprimento do cálice, é bilabiada possuindo o lábio superior dois lóbulos e o inferior três lóbulos menores. O androceu (conjunto de anteras e filete) é formado por 4 estames declinados (Esq. 1.1), curvando para baixo, geralmente são didinâmicos (dois pares de

estames de diferente comprimento), sendo o par anterior mais longo. O gineceu (conjunto estigma, estilete e ovário) é composto por um único estigma, truncado (Esq. 1.1), o ovário é súpero, bicarpelar, bilocular, com 2 óvulos em cada lóculo, mas existe uma constrição em cada lóculo, por falso septo, dando impressão de tetralocular quando adulto. Na base de cada flor encontramos brácteas foliáceas, denominadas folhas ou brácteas florais férteis (Upson, 2002).



**Esquema 1.1** – Representação esquemática da flor do género *Lavandula*. (Adaptado de Judd *et al.* 2008)

### 1.5. Metabolismo secundário em plantas

As plantas produzem uma quantidade vasta e diversa de compostos orgânicos, a maioria dos quais não aparentam participar directamente no crescimento e no desenvolvimento das mesmas. Estas substâncias são, tradicionalmente, referidas como metabolitos secundários, sendo também conhecidos por produtos secundários ou produtos naturais (Croteau *et al.* 2000). Enquanto os produtos do metabolismo primário são encontrados em todas as plantas e desempenham funções metabólicas essenciais (Croteau *et al.* 2000), os produtos do metabolismo secundário incluem compostos que, não sendo directamente necessários ao crescimento e desenvolvimento da planta, são produzidos devido à sua função ecológica de comunicação ou defesa em resposta a condições de stress, a ataques de herbívoros e atracção de polinizadores (Trapp e Croteau, 2001). O metabolismo primário é responsável pela produção de açúcares de cadeia simples, proteínas e ácidos nucleicos, que desempenham funções metabólicas essenciais nas plantas (Zwenger e Basu, 2008).

Os principais metabolitos secundários, de acordo com a sua natureza química, podem ser agrupados em alcalóides, fenóis e terpenos (Croteau *et al.* 2000). Dada a importância que assumem na planta, segue-se uma breve descrição sobre a sua síntese e função.

#### **Alcalóides**

Os alcalóides são uma vasta família de mais de 15.000 metabolitos secundários contendo azoto, encontrando-se em aproximadamente 20% das espécies de plantas

vasculares (Taiz e Zeiger 2002). O átomo de azoto nestas substâncias geralmente faz parte de um anel heterocíclico, que contém átomos de carbono e de azoto. Como um grupo, os alcalóides são mais conhecidos pelos seus efeitos farmacológicos nos animais vertebrados. Tal como o nome sugere a maioria dos alcalóides são alcalinos, geralmente encontrados no citosol (pH 7.2) ou no vacúolo (pH 5-6), o átomo de azoto é protonado, por isso os alcalóides são carregados positivamente sendo geralmente solúveis em água. Os alcalóides são sintetizados a partir de aminoácidos comuns, em particular da lisina, tirosina e do triptofano (Taiz e Zeiger, 2002).

### Fenóis

As plantas produzem uma grande variedade de compostos secundários que contêm um grupo fenólico, um grupo hidroxilo funcional no anel aromático. Estas substâncias são classificadas como compostos fenólicos e são um grupo químico heterogéneo de 10.000 compostos. Os fenóis podem ser biossintetizados por várias vias metabólicas, estando envolvidas duas vias, a do ácido xiquímico e a do ácido malónico. A via do ácido xiquímico está envolvida na biossíntese da maioria dos compostos fenólicos das plantas, enquanto a via do ácido malónico é menos importante nas plantas superiores, sendo responsável pela biossíntese de compostos fenólicos nas bactérias e fungos. A via do ácido xiquímico, converte o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4 fosfato, resultantes da glicólise e da via da pentose fosfato, respectivamente, em aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano. A classe mais abundante de compostos fenólicos das plantas resulta da fenilalanina, esta é convertida em ácido cinâmico pela enzima fenilalanina amónia liase (PAL). O ácido cinâmico é por sua vez convertido em ácido *p*-cumárico. Este último também pode ser produzido directamente a partir da tirosina, pela acção da enzima tirosina amónia liase (TAL). O ácido *trans*-cinâmico, o ácido *p*-cumárico e os seus derivados são compostos fenólicos simples, designados de fenilpropanóides, pois contêm um anel benzénico e uma cadeia lateral de três carbonos. Os flavonóides são uma das maiores classes de fenóis das plantas. Estão presentes na maioria dos tecidos, geralmente nos vacúolos (Croteau *et al.* 2000). Os flavonóides são biossintetizados a partir do ácido *p*-cumárico, este é hidroxilado formando 4-cumarato e, posteriormente, este composto liga-se ao CoA formando 4-cumaril-CoA. Este último serve de substrato à chalcona sintase, enzima chave na produção de flavonóides, isoflavonóides e taninos. Muitos compostos fenólicos simples têm funções importantes nas plantas, como a defesa contra insectos, herbívoros e fungos. As furanocoumarinas são fototóxicas, estas são activadas pela luz na gama dos UV-A (300-400nm). Estes compostos quando activados inserem-se no DNA, ligam-se às bases pirimidínicas, impedindo a transcrição, conduzindo, assim, à morte celular. Os flavonóides são compostos fenólicos que contêm uma variada gama de substâncias coloridas. As antocianinas são o grupo mais vasto de flavonóides pigmentados e são responsáveis pelo

vermelho, rosa, azul e púrpura observados nas plantas. As antocianinas são vitais na atracção de animais para a polinização e dispersão de sementes. As flavonas e os flavonóis são outros dois grupos de flavonóides encontrados nas flores. Estes compostos absorvem a luz a comprimentos de onda mais baixos que as antocianinas, logo não são visíveis ao olho humano, mas são visíveis para os animais. Estas duas classes de flavonóides protegem as células da radiação UV-B excessiva (Taiz e Zeiger, 2002).

### **Terpenos**

Os terpenos são a maior e mais diversificada família de produtos naturais, agrupando-se de acordo com a adição sucessiva de unidades em  $C_5$  de isopreno, podendo ser classificados em hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ). São sintetizados a partir do metabolismo primário através da via do ácido mevalónico ou da via do metileritritol fosfato. Através destas vias é formada uma molécula de isopentenil pirofosfato, IPP, ou o seu isómero dimetialil pirofosfato (DMAPP). O IPP é a molécula activa, composta por cinco carbonos e unidade estrutural de todos os terpenos. O IPP e o DMAPP condensam-se originando geranyl pirofosfato (GPP), o precursor em  $C_{10}$  dos monoterpenos. O GPP pode ligar-se a outra molécula de IPP, dando origem a um composto em  $C_{15}$ , o farnesil pirofosfato (FPP), precursor dos sesquiterpenos. A adição de uma nova molécula de IPP origina um composto em  $C_{20}$ , o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), precursor dos diterpenos. Finalmente, a dimerização do FPP e do GGPP origina triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ), respectivamente. Muitas plantas contêm misturas de monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, chamados de óleos essenciais, que dão um odor característico à folhagem da planta. Eles são frequentemente encontrados em pêlos ou tricomas glandulares projectados para o exterior da epiderme e servem para “anunciar” a toxicidade da planta, repelindo potenciais herbívoros mesmo antes de estes a morderem. Nos tricomas glandulares, os terpenos são armazenados num espaço extracelular modificado na parede da célula (Taiz e Zeiger, 2002).

#### **1.5.1. Óleos essenciais na quimiotaxonomia**

Os óleos essenciais, também conhecidos por essências, são misturas complexas de substâncias voláteis biossintetizadas por organismos vivos. Eles são utilizados na alimentação, em fragrâncias, em cosmética e na indústria farmacêutica (Başer 1995). Os constituintes dos óleos essenciais podem existir sob a forma de hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, amins, entre outros. Apesar da complexidade da composição química dos óleos essenciais, os terpenos são os constituintes maioritários, nomeadamente os mono-, sesqui- e diterpenos. Os restantes compostos dividem-se em fenilpropanóides, ácidos gordos e ésteres derivados destes ácidos gordos (Başer 1995). Nas plantas, os óleos

essenciais podem ser encontrados em canais secretores, idioblastos, tricomas secretores, bolsas e osmóforos. Em muitos casos encontram-se glicosilados, ocorrendo a separação por hidrólise da ligação glicosídica. Podem estar também associados a gomas (oleogomoresina) ou resinas (oleoresinas) e a liberação do óleo essencial destas combinações naturais pode ocorrer por destilação (Başer 1995).

A utilização dos metabolitos secundários na quimiotaxonomia das plantas tem vindo a ser reconhecida (Vieira *et al.* 2001). A existência de quimiotipos pode ser definida pela produção de óleos essenciais em plantas da mesma espécie, que apresentem diferenças acentuadas quer na composição química quer nas suas propriedades associadas (Torras *et al.*, 2007). Essas variações químicas intraespecíficas não são resultado apenas da simples presença ou ausência de um composto químico, estando associadas a determinados factores que podem influenciar a produção, tais como variações fisiológicas, condições ambientais, variações geográficas, factores genéticos e evolutivos e condições político-sociais (Figueiredo *et al.*, 2008).

### **1.6. Estruturas secretoras na família Lamiaceae**

As espécies da família Lamiaceae possuem estruturas secretoras externas, tricomas glandulares ou secretores, localizados na epiderme de órgãos aéreos, podendo variar em densidade e morfologia. Esses tricomas secretores podem ser de dois tipos, peltados e capitados (Martins, 2002).

Segundo Werker *et al.* (1985) estes dois tipos de tricomas diferem em termos de estrutura e no modo de secreção. Os tricomas peltados consistem numa célula base, uma célula pedunculada larga e curta cutinizada nas paredes exteriores e uma cabeça circular com células secretoras dispostas em um ou dois círculos concêntricos. O número de células varia, normalmente entre 4 a 12, de acordo com a espécie. Os compostos secretados acumulam-se no espaço subcuticular, entre a parede celular e a cutícula. Com a maturação a acumulação de substâncias pode levar a um aumento considerável desta área (Esq. 1.2). Grande parte do material secretado é lipofílico, como os óleos essenciais, mas também pode incluir outro tipo de compostos, como polissacáridos.

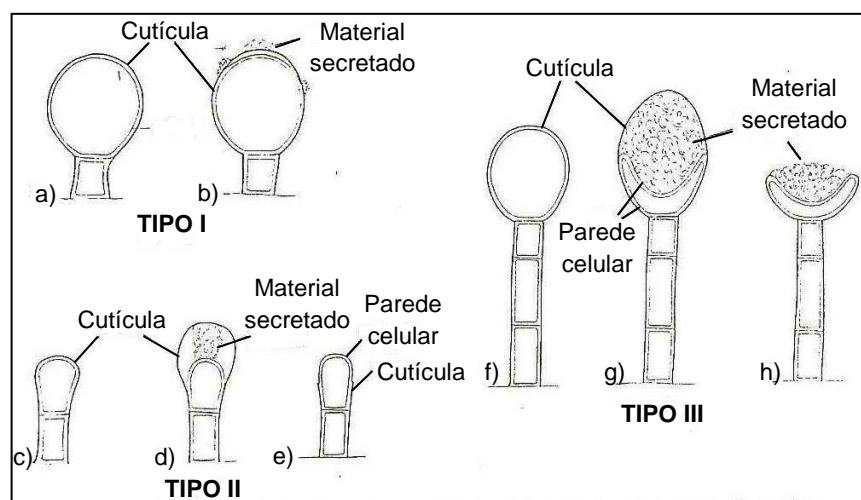
Os tricomas capitados são morfologicamente mais variados e podem ser divididos em vários tipos de acordo com a sua estrutura bem como o seu modo de secreção (Werker *et al.*, 1985)

Tipo I – Consiste em uma a duas células no pedúnculo, e uma, ou duas células secretoras na cabeça, de forma circular ou de pêra (Esq. 1.2.). Gotas de substâncias polissacáridas e lipofílicas podem ser encontradas na parte superior da célula da cabeça. O material secretado acumula-se num pequeno espaço subcuticular e a sua libertação dá-se através de poros localizados na cutícula.

Tipo II – Consiste em uma a duas células no pedúnculo e uma cabeça unicelular alongada tão estreita na sua base como as células do pedúnculo, e ligeiramente alargada na extremidade distal (Esq. 1.2). O material secretado é acumulado num espaço subcuticular maior do que o encontrado nos tricomas capitados tipo I, e a sua libertação dá-se através da ruptura da cutícula.

Tipo III – Consiste em duas a cinco células alongadas no pedúnculo, que ostentam uma célula arredondada na cabeça. Neste tipo de tricoma o material é igualmente

secretado para um espaço subcuticular. Pode acontecer o colapso de parte da parede celular, dando uma forma de taça à célula colapsada. Eventualmente a cutícula rompe, parte do material secretado é libertado e o restante permanece dentro da “taça” (Esq. 1.2).



**Esquema 1.2** – Esquema dos três tipos de tricomas capitados, em sucessivas fases de secreção. Tipo I: a) Antes da secreção; b) Após a secreção, observando-se gotas de material secretado no topo da célula da cabeça. Tipo II: c) Antes da secreção; d) Na fase de secreção, os materiais de secreção acumulam-se no espaço subcuticular; e) Após a secreção; a cutícula permanece apenas na parte inferior da cabeça nas paredes exteriores. Tipo III: f) Antes da secreção; g) Os materiais secretados acumulam-se entre a cutícula e a parede celular; h) Após a secreção, parte dos materiais secretados permanecem no exterior da célula da cabeça. (Adaptado de Werker *et al.*, 1985)

## 2. Objectivos

---

Com o presente trabalho pretende-se contribuir para um melhor conhecimento do género *Lavandula*, mais propriamente das espécies *L. luisieri* e *L. pedunculata*. Serão abordados os seguintes aspectos:

- Colheita e herborização das espécies em estudo;
- Extração dos óleos essenciais;
- Análise e identificação da composição química dos óleos essenciais.
- Estudo da distribuição e da micromorfologia das estruturas secretoras que ocorrem nas flores e caracterização histoquímica dos principais grupos de compostos presentes.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material vegetal

Este trabalho vem no seguimento de outros iniciados pelos orientadores com a flora da HRA. Aí foram feitas colheitas de materiais de *L. luisieri*, que posteriormente se estenderam a outros locais do país, tendo parte desse material sido mais tarde identificado como *L. pedunculata*. Exemplares do género *Lavandula*, *L. luisieri* e *L. pedunculata* utilizados nos diferentes ensaios, foram obtidos de populações silvestres em fase floral, colhidas em locais e datas registados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Espécies de *Lavandula* em estudo, códigos utilizados, datas e locais de colheita. HRA- Herdade da Ribeira Abaixo, Grândola. CB- Barragem de Castelo de Bode, zona de embarque Ilha do Lombo. MEE- Mata Experimental do Escaroupim, Salvaterra de Magos.

Espécie	Código	Colheita	
		Data	Local
<i>L. pedunculata</i>	MEE_08*	Abril de 2008	
<i>L. pedunculata</i>	MEE_10*/**	Junho de 2010	MEE
<i>L. pedunculata</i>	MEE_11**	Maio de 2011	
<i>L. luisieri</i>	LCB_10*	Maio de 2010	CB
<i>L. luisieri</i>	HRA_07a*	Julho de 2007	
<i>L. luisieri</i>	HRA_08a*	Junho de 2008	
<i>L. luisieri</i>	HRA_09a*	Junho de 2009	HRA
<i>L. luisieri</i>	HRA_10a*/**	Julho de 2010	
<i>L. luisieri</i>	HRA_11a**	Maio de 2011	
<i>L. luisieri</i>	HRA_10b*	Julho de 2010	HRA
<i>L. luisieri</i>	HRA_07c*	Julho de 2007	
<i>L. luisieri</i>	HRA_08c*	Junho de 2008	HRA
<i>L. luisieri</i>	HRA_09c*	Junho de 2009	
<i>L. luisieri</i>	HRA_07d*	Julho de 2007	
<i>L. luisieri</i>	HRA_08d*	Junho de 2008	HRA
<i>L. luisieri</i>	HRA_10d*	Julho de 2010	
<i>L. luisieri</i>	HRA_07e*	Julho de 2007	
<i>L. luisieri</i>	HRA_08e*	Junho de 2008	HRA
<i>L. luisieri</i>	HRA_09e*	Junho de 2009	
<i>L. luisieri</i>	HRA_10e*	Julho de 2010	
<i>L. luisieri</i>	HRA_07f*	Julho de 2007	HRA
<i>L. luisieri</i>	HRA_09f*	Junho de 2009	

\* análise dos óleos essenciais. \*\* caracterização morfológica e histoquímica.

Para o estudo dos óleos essenciais foram utilizadas as partes aéreas de todas as amostras de ambas as espécies (Tab. 3.1) com excepção das amostras colhidas em 2011. Foram armazenadas em embalagens de papel a -20°C até análise.

Os estudos micromorfológicos e histoquímicos incidiram apenas sobre flores e brácteas férteis dos exemplares de *L. pedunculata* (MEE\_10) e *L. luisieri* (HRA\_10a). Nestes estudos foram usados materiais colhidos em 2010, herborizados, fixados e frescos, estes colhidos já em 2011 (MEE\_11 e HRA\_11a) (Tab. 3.1).

Exemplares de herbário foram depositados no Herbário do Jardim Botânico da Universidade de Lisboa (LISC) e do Instituto Superior de Agronomia (LISI).

## **3.2. Estudo dos óleos essenciais**

### **3.2.1. Extração**

Os óleos essenciais foram isolados por hidrodestilação, durante 3h, num aparelho do tipo Clevenger de acordo com a Farmacopeia Europeia (Council of Europe, 2007). A componente volátil foi isolada com uma velocidade de destilação de 3 ml/min. Sempre que necessário utilizou-se *n*-pentano destilado na recuperação do óleo essencial, e, se requerido, a componente volátil foi concentrada a um volume mínimo em *vial*, sob fluxo de azoto. As amostras de óleo foram armazenadas a -20°C até análise.

### **3.2.2. Análise e identificação**

A análise dos componentes dos óleos essenciais foi efectuada com recurso à técnica de Cromatografia Gás-Líquido (CGL), procedendo-se às identificações dos mesmos num aparelho de CGL acoplado a um aparelho de espectrometria de massa (CGL/EM). Os dados obtidos foram tratados e analisados usando o programa de software *Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System* (NTSYS).

#### **3.2.2.1. Cromatografia Gás-líquido**

As análises de CGL foram efectuadas num cromatógrafo Perkin Elmer 8700 equipado com dois Detectores de Ionização de Chama (DIC), um sistema de tratamento de dados e um injector, no qual foram instaladas duas colunas de polaridade diferente: DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone, (30m x 0,25mm d.i., espessura de filme 0,25µm; J & W Scientific Inc.) e DB-17HT de sílica fundida (30m x 0,25mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.). A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida isotérmica durante 10min. Temperatura do injector e dos detectores, 290°C e 280°C, respectivamente. Gás de arrastamento, hidrogénio, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s. Relação de repartição de fluxo, 1:50. A composição

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

### **3.2.2.2. Cromatografia Gás-líquido / Espectrometria de massa**

Nas análises de CGL/EM utilizou-se um Autosystem XL equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30m x 0,25mm d.i., espessura de filme 0,25µm; J & W Scientific Inc.) ligado a um Perkin-Elmer Turbomass (versão de programa 4.1). A temperatura do forno foi programada de 45 a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida isotérmica durante 10min; temperatura da linha de transferência, 280°C; temperatura da câmara de ionização, 220°C; gás de arrastamento, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s; relação de repartição de fluxo, 1:40; energia de ionização, 70eV; gama de massas, 40-300u; tempo de varrimento, 1s. A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção, em relação aos dos *n*-alcanos C<sub>9</sub>-C<sub>21</sub> e espectros de massa, com os de padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida no laboratório do Centro de Biotecnologia Vegetal.

### **3.2.3. Análise de dados**

A composição percentual dos óleos essenciais foi utilizada na determinação da relação entre as diferentes amostras, pela análise aglomerativa (de *cluster*), usando o programa NTSYS (NTSYS- pc software, version 2.2, Exeter Software, Setauket, New York) (Rohlf, 2000). A correlação foi seleccionada como medida de semelhança e utilizou-se o agrupamento segundo a associação média (UPGMA) na definição dos *clusters*. O grau de correlação foi avaliado de acordo com Pestana e Gageiro (2000) em: muito elevado (0,9-1), elevado (0,7-0,89), moderado (0,4-0,69), baixo (0,2-0,39) e muito baixo (<0,2).

## **3.3. Estudo morfológico**

### **3.3.1. Microscopia electrónica de varrimento (MEV)**

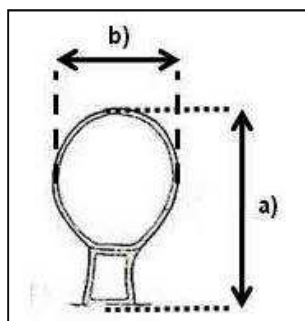
Os materiais vegetais foram observados em MEV, sendo previamente submetidos a tratamentos de fixação, desidratação, secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub> e metalização, cujos protocolos se apresentam em anexo, no Protocolo 8.1.

As observações foram efectuadas num MEV da marca Jeol JSM-5220 LV, a 15 KV, com sistema digital de aquisição directa de imagem. As medições e contagens foram calculadas em imagens, tendo em consideração as diferentes ampliações.

### 3.3.2. Microscopia óptica em luz visível (MOV)

Observaram-se ambas as páginas de cada peça floral, sépalas, pétalas, estigmas, grãos de pólen e brácteas férteis com o intuito de obter informação sobre a caracterização e distribuição do indumento. Foram ainda feitos cortes manuais com o auxílio de uma lupa binocular Nikon SMZ-2T. Procedeu-se à identificação do tipo de tricomas e efectuaram-se medições dos mesmos. Nos tricomas as medições foram realizadas de acordo com o Esquema 3.1. Os resultados obtidos tiveram origem numa média de 10 observações.

Para a observação de materiais em MOV recorreu-se a um microscópio Nikon Labophot-2 e a aquisição de imagens foi feita recorrendo a uma máquina fotográfica Nikon FX-35W, com adaptador semiautomático Nikon PFX e um filtro azul Cokin 80A e utilizando película Kodak Gold 100 ASA.



**Esquema 3.1** – Modo de leitura das medições efectuadas nos diferentes tipos de tricomas: a) média  $\pm$  desvio padrão ; b) média  $\pm$  desvio padrão.

## 3.4. Estudo histoquímico

### 3.4.1. Microscopia óptica em luz visível (MOV)

Nos testes histoquímicos foram utilizados materiais vegetais secos, frescos e fixados. Estes testes foram dirigidos aos principais grupos de metabolitos secundários localizados em estruturas secretoras e também nos diferentes tecidos das plantas em estudo. Na Tabela 3.2 encontra-se a listagem de testes histoquímicos efectuados. Os protocolos detalhados destes testes, bem como os respectivos controlos e resultados esperados encontram-se em anexo no Protocolo 8.2.

### 3.4.2. Microscopia óptica de fluorescência (MOF)

O estudo histoquímico foi complementado com o recurso a microscopia de fluorescência. Foram usados materiais vegetais frescos onde foi observada a autofluorescência e a fluorescência induzida utilizando o reagente de NEU para a detecção de flavonóides e aloína (Wagner e Blader 1996), o protocolo encontra-se detalhado em anexo no Protocolo 8.3. Para estes testes foi usado um microscópio Olympus BX 60 com equipamento fotográfico Olympus DP 50 e sistema de aquisição de imagem Studio Lite. Os filtros usados

foram: filtro de excitação de luz UV, 340-380nm, com filtro de barreira, 430nm; e filtro de excitação de luz azul, 450-490nm, com filtro de barreira, 515nm.

**Tabela 3.2** – Testes histoquímicos efectuados no presente estudo.

<b>Tipo de substância detectada</b>		<b>Teste histoquímico</b>
<b>Hidratos de Carbono</b>	Polissacáridos Totais	<b>PAS</b> (McManus, 1948)
	Pectinas	<b>Vermelho de Ruténio</b> (Johasen, 1940)
<b>Mucilagens</b>	Totais	<b>Ácido Tânico / Cloreto de Ferro</b> (Pizzolato e Lillie, 1973)
<b>Lípidos</b>	Totais	<b>Vermelho de Sudão IV</b> (Pearse, 1980)
	Ácidos e Neutros	<b>Sulfato Azul do Nilo</b> (Ganter e Jollès, 1969, 1970)
	Ácidos Gordos	<b>Acetato de Cobre / Ácido Rubeânico</b> (Ganter e Jollès, 1969, 1970)
<b>Terpenóides</b>	Óleos essenciais e ácidos resínicos	<b>Reagente de Nadi</b> (David e Carde, 1964)
	Com grupo Carbonilo	<b>2-4-Dinitrofenilhidrazina</b> (Ganter e Jollès, 1969, 1970)
<b>Fenóis</b>	Totais	<b>Cloreto de Ferro III</b> (Johasen, 1940)
	Taninos	<b>Vanilina Clorídrica</b> (Gardner, 1975)
<b>Alcalóides</b>		<b>Reagente de Wagner</b> (Furr e Mahlberg, 1981)

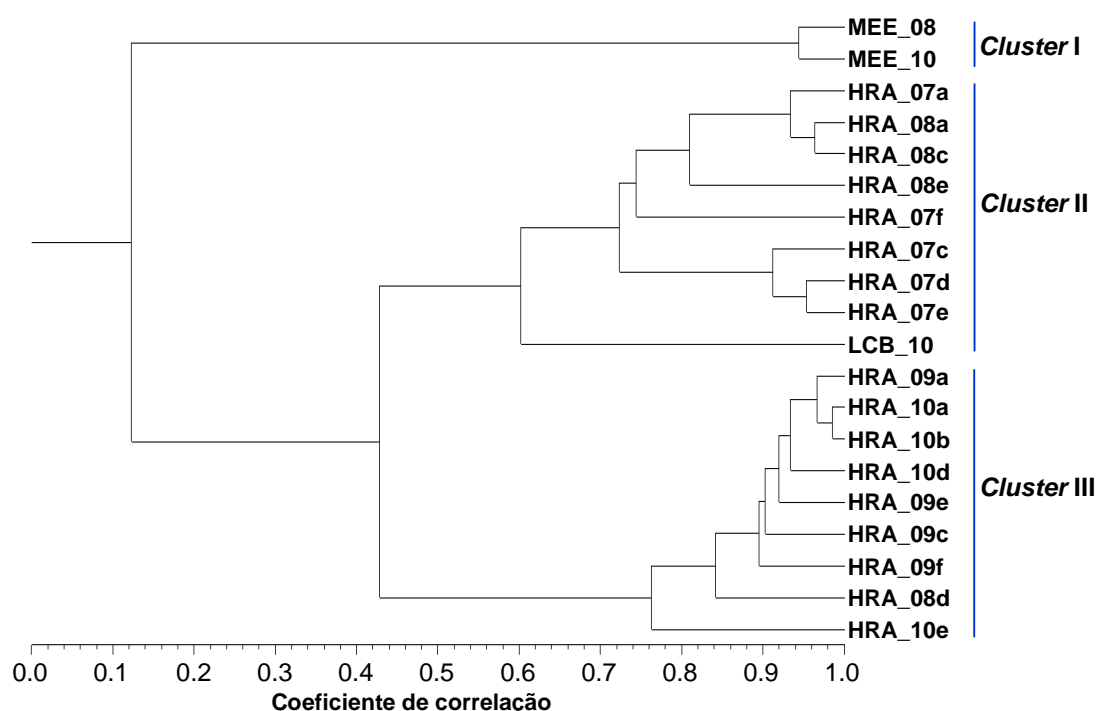
## 4. Resultados

### 4.1. Análise dos óleos essenciais

Os óleos essenciais isolados das diferentes amostras das duas espécies de *Lavandula* colhidas durante a fase de floração apresentaram uma coloração amarela e um odor relativamente forte.

Determinou-se o intervalo máximo (Máx) e mínimo (Min) de variação de percentagens de rendimento e de componentes identificados em cada óleo essencial, que se encontram listados em função do seu índice de retenção (I.R.) na coluna cromatográfica DB-1 (Tab. 4.1). Não tendo sido possível avaliar o rendimento da amostra MEE\_08 (Esq. 4.1) considerou-se aqui, apenas o rendimento obtido com a amostra MEE\_10, para efeitos de comparação com a bibliografia, que foi de 2% (v/p.f.). Em relação à variação do rendimento para as diferentes amostras de *L. luisieri* esta encontra-se num intervalo de v-1% (v/p.f.).

A composição percentual dos óleos essenciais foi utilizada na determinação da relação entre as diferentes amostras por análise aglomerativa em grupos (*cluster analysis*). A correlação foi seleccionada como medida de semelhança e utilizou-se o UPGMA na definição dos *clusters*. Os resultados da análise aglomerativa em grupos são expressos em dendrogramas, como o do Esquema 4.1.



**Esquema 4.1** – Dendrograma obtido pela análise de *clusters* da composição percentual de óleos essenciais de *L. luisieri* e *L. pedunculata* com base na correlação e usando o método UPGMA.

A análise de *clusters* dos componentes identificados nas amostras dos óleos essenciais agrupou as vinte amostras em três grandes grupos que correspondem aos três *clusters* diferenciados no Esquema 4.1. O coeficiente de correlação entre o *cluster* I e os *clusters* II e III apresenta um valor bastante baixo, aproximadamente 0.1, o que demonstra um distanciamento químico entre os óleos essenciais das amostras pertencentes a estes *clusters*. A composição do óleo essencial da amostra de LCB\_10 mostrou-se mais correlacionada ( $S_{corr} \geq 0.6$ ), com a dos óleos essenciais isolados das amostras colhidas em HRA em 2007 e 2008. As amostras pertencentes aos *clusters* II e III apresentaram algum afastamento químico na composição dos seus óleos essenciais, pois a correlação entre estes foi de cerca de 0.4.

Ao agrupar os componentes dos óleos essenciais isolados das duas espécies de *Lavandula* (Tab. 4.1) verificou-se que os monoterpenos oxigenados foram detectados em maior percentagem tanto para a *L. luisieri*, (*clusters* II e III) que foi de 33-57%, como para a *L. pedunculata* que foi de 90-98%. Em relação aos hidrocarbonetos monoterpênicos estes foram detectados nas duas espécies de *Lavandula* em menor percentagem em comparação com os monoterpenos oxigenados (Tab. 4.1). Os componentes não terpênicos encontraram-se presentes em percentagens reduzidas por vezes vestigiais, para as duas espécies de *Lavandula* (Tab. 4.1). O componente com maior percentagem relativa no *cluster* I foi a fenchona (62-70%) seguida do 1,8-cineol (7-28%) e da cânfora (4-5%) (Tab. 4.2). No *cluster* II o componente que se revelou com maior percentagem foi o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (4-20%) seguido de 1,8-cineol (1-17%), 5-metileno-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enona (2-13%), limoneno (v-9%), NID (3-8%), acetato de lavandulol (5-7%), 3,5-dimetilo-1,4,4-trimetilciclopenteno (4-7), viridiflorol (1-6%), cânfora (v-6%), pulegona (v-6%), e *trans*- $\alpha$ -necrodol (1-5%) (Tab. 4.2). Relativamente ao *cluster* III o componente que se revelou dominante foi o 1,8-cineol (11-38%) seguido de limoneno e 5-metileno-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enona ambos com (3-16%), pulegona (v-11%),  $\alpha$ -pineno (1-9%), cânfora (v-8%), acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (v-7%), viridiflorol (2-6%), NID (1-6%), fenchona (v-6%), e acetato de lavandulol (1-5%) (Tab. 4.2).

**Tabela 4.1.** Composição percentual dos componentes dos óleos essenciais isolados das partes aéreas dos diferentes indivíduos de *L. luisieri* e *L. pedunculata*. Os valores representam o intervalo máximo (Máx) e mínimo (Min) de variação para cada componente em cada cluster. Componentes maioritários ( $\geq 5\%$  em pelo menos uma das amostras).

Componentes	I.R.	<i>L. pedunculata</i>		<i>L. luisieri</i>			
		<i>Cluster I</i>		<i>Cluster II</i>		<i>Cluster III</i>	
		Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx
$\alpha$ -Tujeno	924	v	v				
<b>3,5-Dimetileno-1,4,4-trimetilciclopenteno</b>	<b>930</b>			3.9	<b>7.3</b>	1.8	3.9
<b><math>\alpha</math>-Pino</b>	<b>930</b>	0.4	1.6	1.3	2.4	0.8	<b>8.7</b>
$\alpha$ -Fencheno	938	v	0.3				
Canfeno	938	0.3	0.5	v	0.2	v	0.5
Sabineno	958	v	v	v	0.1	v	0.1
6-Metil-5-hepten-2-ona	960	v	v	v	v	v	0.1
1-Octen-3-ol	961	v	v	v	v	v	0.1
$\beta$ -Pino	963	v	v	v	0.8	v	0.5
Dehidro-1,8-cineole	973	v	0.1	0.3	1.4	0.3	1.0
$\beta$ -Mirceno	975	v	0.1	v	0.3	v	0.6
3,4,4-Trimetil-2-ciclohexene-1-ona	996			v	0.7	v	1.0
$\alpha$ -Terpineno	1002	v	0.2	v	v	v	0.4
<i>p</i> -Cimeno	1003	0.5	0.6	v	0.7	v	0.8
<b>1,8-Cineole</b>	<b>1005</b>	<b>6.7</b>	<b>28.1</b>	0.6	<b>17.4</b>	<b>11.2</b>	<b>38.3</b>
<b>Limoneno</b>	<b>1009</b>	v	3.4	0.2	<b>8.7</b>	3.4	<b>15.9</b>
<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	1017			v	1.6	v	0.4
$\gamma$ -Terpineno	1035	v	0.1	v	1.0	v	0.6
<b>2,3,4,5-Tetrametil-2-ciclopenten-1-ona*</b>	<b>1038</b>	v	0.2	v	3.0	1.1	2.4
Óxido de <i>cis</i> -linalol	1045	v	0.4	v	0.5	v	0.5
<b>Fenchona</b>	<b>1050</b>	<b>62.4</b>	<b>70.1</b>	v	3.0	v	<b>6.6</b>
Óxido de <i>trans</i> -linalol	1059	v	0.2	v	0.3	v	0.5
6-Metil-3,5-heptadien-2-ona	1064			v	0.3	v	0.4
Terpinoleno	1064	v	v				
<i>n</i> -Nonanal	1073	v	v	v	1.8	v	1.0
Linalol	1074	v	0.9	0.2	3.0	v	3.6
Crisantenona	1081			v	0.2	v	0.2
<i>endo</i> -Fenchol	1085	0.7	1.4				
$\alpha$ -Canfolenal	1088	v	0.4	v	0.1	v	0.4
<b>Cânfora</b>	<b>1095</b>	3.6	<b>5.0</b>	v	<b>6.2</b>	0.2	<b>8.4</b>
<i>trans</i> -Pinocarveol	1106	v	0.2	v	1.1	v	1.0

Componentes	I.R.	<i>L. pedunculata</i>		<i>L. luisieri</i>			
		<u>Cluster I</u>		<u>Cluster II</u>		<u>Cluster III</u>	
		Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx
<i>cis</i> -Verbenol	1110	v	0.2	v	1.1	v	1.7
<i>trans</i> -Verbenol	1114	0.6	1.1	v	2.7	v	1.8
<b><i>trans</i>-<math>\alpha</math>-Necrodol</b>	<b>1114</b>			0.8	<b>5.4</b>	0.1	1.8
Pinocarvona	1121	v	0.2	v	0.2	v	0.6
$\delta$ -Terpineol	1134	v	v	v	v	v	0.6
Borneol	1134	v	0.2				
$\alpha$ -Felandrol*	1134	v	v	v	0.5	v	0.6
NI C	1137			1.5	3.0	0.5	1.5
Lavandulol	1142			v	0.2	v	0.4
<i>p</i> -Metil acetofenona	1143	v	0.2				
<i>cis</i> - $\alpha$ -Necrodol	1147	v	v	0.3	2.2	0.6	1.3
<i>p</i> -Cimen-8-ol	1148	0.3	1.0				
<b>5-Metileno-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enona</b>	<b>1152</b>			2.2	<b>12.6</b>	2.6	<b>15.8</b>
Mirtenal	1153	v	0.2	v	0.5	v	0.4
$\alpha$ -Terpineol	1159	v	0.3	v	0.3	v	0.1
Verbenona	1164	0.3	1.7	v	0.2	0.1	0.6
<i>trans</i> -Carveol	1189	v	0.3	v	0.7	v	0.2
Acetato de $\alpha$ -fenchilo	1201	v	0.2				
<b>Pulegona</b>	<b>1210</b>	v	v	v	<b>5.7</b>	v	<b>11.0</b>
Carvone	1210	v	0.6				
Acetato de fenil etilo	1228	v	0.2				
Acetato de linalilo	1245	v	0.2				
Acetato de bornilo	1265	v	0.1	v	3.9	v	1.7
<b>Acetato de <i>trans</i>-<math>\alpha</math>-necrodilo</b>	<b>1265</b>			3.9	<b>19.9</b>	0.4	<b>7.3</b>
<b>NI D</b>	<b>1267</b>			2.5	<b>8.4</b>	0.6	<b>5.6</b>
Acetato de liratilo*	1267			v	4.0	v	1.6
<b>Acetato de lavandulol</b>	<b>1278</b>	v	0.2	<b>5.2</b>	<b>7.2</b>	0.7	4.7
Acetato de <i>cis</i> - $\alpha$ -necrodilo	1285	v	0.1	0.7	2.9	0.7	2.9
Acetato de dihidrocarveol	1288	v	v	v	1.7	0.3	1.2
Acetato de mirtenilo	1290			v	1.2	v	1.2
Eugenol	1327			v	0.5	v	0.2
Acetato de nerilo	1353			v	v	v	0.3
Ciclosativeno	1363			v	0.8	v	0.9
$\alpha$ -Copaeno	1375			v	0.2	v	1.2

Componentes	I.R.	<i>L. pedunculata</i>		<i>L. luisieri</i>			
		<u>Cluster I</u>		<u>Cluster II</u>		<u>Cluster III</u>	
		Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx
$\beta$ -Cariofileno	1414			v	1.5	v	0.4
$\alpha$ -Humuleno	1447			v	0.4	v	0.3
<i>allo</i> -Aromadendreno	1456			v	0.8	v	0.1
$\gamma$ -Muuroleno	1469			v	0.3	v	0.1
Germacreno-D	1474			v	0.4	v	0.6
$\beta$ -Selineno	1476			v	0.5	v	0.4
Valenceno	1484			v	0.7	v	0.2
Viridifloreno	1487			v	v	v	0.3
$\gamma$ -Cadineno	1500			v	1.6	v	0.3
<i>trans</i> -Calameneno	1505			v	v	v	0.2
$\delta$ -Cadineno	1505			v	2.3	v	0.4
$\alpha$ -Calacoreno	1525			v	v	v	0.2
Selina-3,7(11)-dieno	1530			v	1.7	0.3	1.1
$\beta$ -Vetiveneno	1542			v	0.6	v	0.2
Óxido de $\beta$ -cariofileno	1561			v	1.2	v	0.6
Globulol	1566			v	0.6	v	0.5
<b>Viridiflorol</b>	<b>1569</b>				<b>1.4</b>	<b>5.8</b>	<b>1.8</b>
Ledol	1580				1.1	3.8	1.0
T-Cadinol	1616	v	v	v	1.4	v	0.5
$\alpha$ -Muurolol	1618			v	1.1	v	0.2
$\beta$ -Eudesmol	1620			v	v	v	0.2
<i>n</i> -Heptadecano	1700			v	v	v	v
Ácido hexadecanóico	1908			v	v	v	v
<i>n</i> -Octadecanol	2071			v	v	v	v

**% Identificação** **97.5** **99.1** **71.0** **82.0** **77.5** **92.3**

#### Componentes agrupados

Hidrocarbonetos monoterpénicos	1.5	6.5	2.5	12.0	6.5	19.7
Monoterpenos oxigenados	90.4	97.6	32.6	51.2	33.5	56.7
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos		v	0.9	6.7	0.9	2.5
Sesquiterpenos oxigenados	v	v	3.4	11.0	3.0	9.8
Fenilpropanóides		v	v	0.5	v	0.2
Ácidos gordos		v	v	v	v	v
Outros	v	0.6	8.2	20.4	7.5	22.6

Componentes	<i>L. pedunculata</i>		<i>L. luisieri</i>				
	I.R.	<u>Cluster I</u>		<u>Cluster II</u>		<u>Cluster III</u>	
		Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx
<b>Rendimento (% v/p.f.)</b>	<b>v</b>	<b>1.5</b>	<b>0.1</b>	<b>0.8</b>	<b>0.2</b>	<b>1.0</b>	

I.R. - Índice de retenção relativo aos *n*-alcanos C<sub>9</sub>-C<sub>21</sub> na coluna cromatográfica DB1; v - vestigial (<0.05%);

\* - Identificação baseada apenas no espectro de massa.

**Tabela 4.2** – Resumo dos constituintes maioritários (≥ 5%) dos óleos essenciais das diferentes amostras das espécies *L. pedunculata* e *L. luisieri* da Tabela 4.1.

Espécie	Cluster	Constituintes maioritários (≥ 5%)
<i>L. pedunculata</i>	Cluster I	Fenchona (62.4-70.1%), 1,8-cineol (6.7-28.1%) e cânfora (3.6-5.0%).
<i>L. luisieri</i>	Cluster II	Acetato de <i>trans</i> - $\alpha$ -necrodilo (3.9-19.9%), 1,8-cineol (0.6-17.4%), 5-metileno-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enona (2.2-12.6%), limoneno (0.2-8.7%), NID (2.5-8.4%), acetato de lavandulol (5.2-7.2%), 3,5-dimetilo-1,4,4-trimetilciclopenteno (3.9-7.3), cânfora (v-6.2%), pulegona (v-5.7%), viridiflorol (1.4-5.8%) e <i>trans</i> - $\alpha$ -necrodol (0.8-5.4%)
<i>L. luisieri</i>	Cluster III	1,8-Cineole (11.2-38.3%), limoneno (3.4-15.9%), 5-metileno-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enona (2.6-15.8%), pulegona (v-11.0%), $\alpha$ -pineno (0.8-8.7%), cânfora (0.2-8.4), acetato de <i>trans</i> - $\alpha$ -necrodilo (0.4-7.3%), fenchona (v-6.6%), NID (0.6-5.6%), viridiflorol (1.8-5.5%) e acetato de lavandulol (0.7-4.7%).

## 4.2. Morfologia

As duas espécies do género *Lavandula* estudadas apresentam flores com características comuns ao género e descritas anteriormente e ambas revelam estigmas de tipo truncado (Est. 1A). As anteras abrem longitudinalmente libertando grãos de pólen cuja superfície da exina é microperfurada. Estes numa perspectiva polar têm uma forma hexagonal com seis fendas ou colpos (Est. 1B), e em visão equatorial apresentam uma forma elíptica/circular (Est. 1C).

### 4.2.1. Morfologia e distribuição de tricomas em *L. luisieri*

Em ambas as espécies as flores e brácteas férteis comportam tricomas de dois tipos distintos, não glandulares e glandulares. Os resultados obtidos neste estudo encontram-se resumidos na Tabela 4.3.

#### **4.2.1.1. Tricomas não glandulares**

Os tricomas não glandulares são de dois tipos, tectores estrelados e tectores unisseriados. Os tricomas tectores estrelados são pluricelulares, com um número variável de braços, entre 2 a 6 (Est. 1D), suportados por um pé com  $28 \pm 11 \mu\text{m}$ . São maioritários na epiderme abaxial das sépalas e das brácteas férteis encontrando-se igualmente na epiderme adaxial de ambas mas em menor número. Nas pétalas não se identificaram tricomas deste tipo. Os tricomas tectores unisseriados (Est. 1E) são pluricelulares, com  $640 \pm 241 \mu\text{m}$  de comprimento, encontram-se maioritariamente nos ápices da superfície abaxial das sépalas e das brácteas e igualmente em grande número no ápice das epidermes adaxial e abaxial das pétalas. Ambos os tipos de tricomas não glandulares apresentam uma superfície verrugosa.

#### **4.2.1.2. Tricomas glandulares**

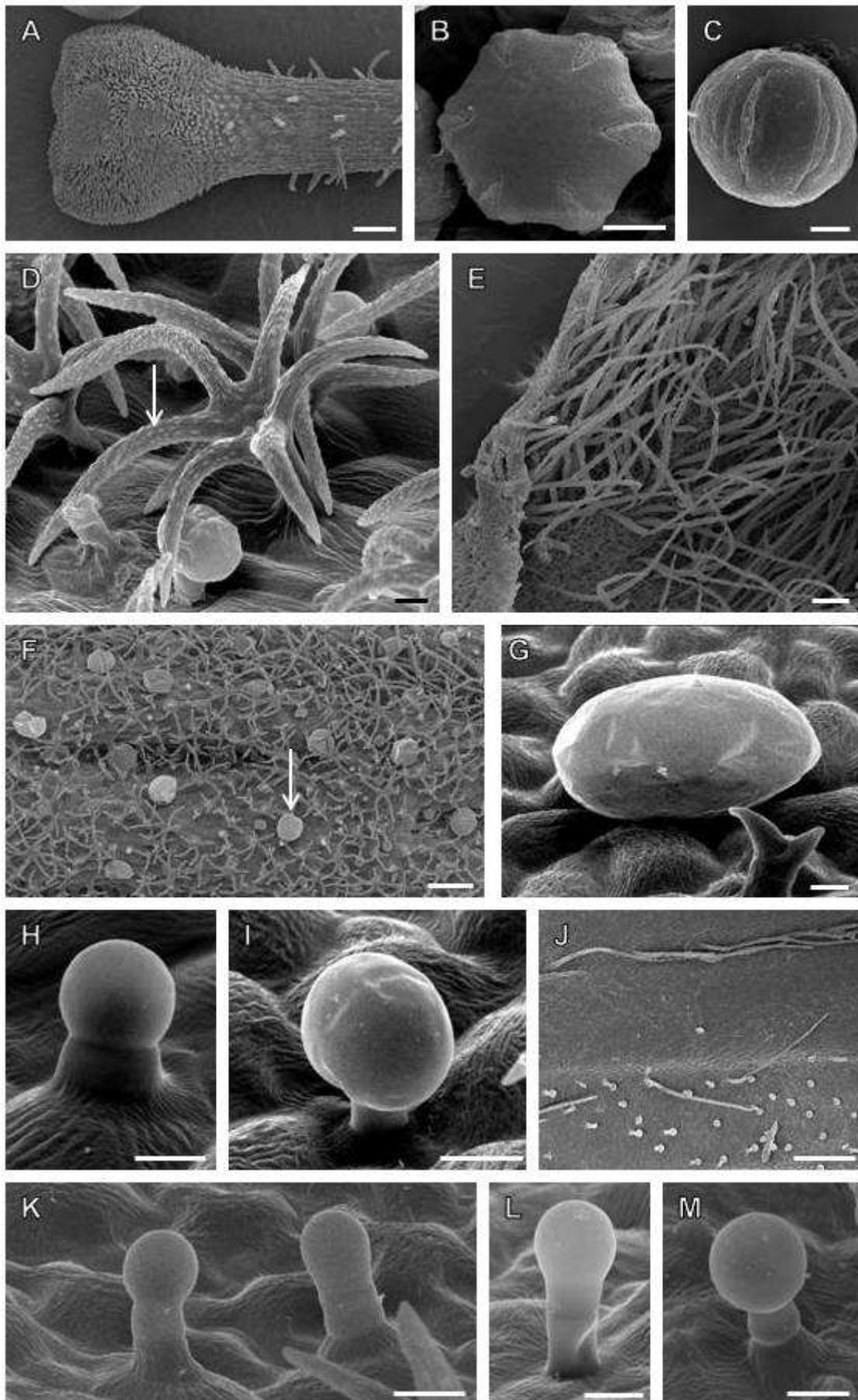
Nesta espécie os tricomas glandulares ou secretores observados pertencem ao tipo peltado e capitado. Os tricomas peltados (Est. 1F e 1G) foram observados apenas nas epidermes abaxiais das sépalas e das brácteas férteis. Apresentam uma cabeça com  $45 \pm 8 \times 57 \pm 5 \mu\text{m}$ , que pode suportar entre 8 a 12 células. Os tricomas capitados observados são de dois tipos: capitados tipo I que podem apresentar uma cabeça unicelular (Est. 1H) ou bicelular (Est. 1I). As suas medidas variam entre  $20 \pm 4 \times 14 \pm 3 \mu\text{m}$  e de  $26 \pm 4 \times 23 \pm 3 \mu\text{m}$ , respectivamente. Estes encontram-se em ambas as epidermes das brácteas férteis e sépalas, sendo maioritários na epiderme abaxial de ambas, não se verificando a sua existência nas pétalas. Os tricomas capitados tipo II (Est. 1J, 1K, 1L e 1M), com  $26 \pm 3 \times 12 \pm 2 \mu\text{m}$ , encontram-se sempre na extremidade da sépala e bráctea fértil, nos espaços entre nervuras. Foram ainda identificados na parte central da superfície adaxial da pétala.

---

**Estampa 1** – Microfotografias de flores e brácteas férteis de *L. luisieri* em MEV.

**A** – pormenor do estigma truncado (75x, barra = 100 µm); **B** – perspectiva polar de um grão de pólen na antera: pormenor da forma hexagonal (2000x, barra = 10 µm); **C** – perspectiva equatorial de um grão de pólen isolado: pormenor da forma elipsoidal (3500x, barra = 5 µm); **D** – epiderme abaxial da bráctea fértil: tricoma tector do tipo estrelado com 6 braços (seta) (750x, barra = 10 µm); **E** – pétala: inserção de tricomas tectores no ápice da página adaxial (100x, barra = 100 µm); **F** – visão geral da superfície abaxial da sépala, observando-se tricomas não glandulares estrelados e tricomas peltados (seta) (100x, barra = 100 µm); **G** – superfície abaxial da bráctea fértil: tricoma peltado (750x, barra = 10 µm); **H** – página adaxial da bráctea fértil: tricoma capitado tipo I com cabeça unicelular (2000x, barra = 10 µm); **I** – epiderme abaxial da bráctea fértil: tricoma capitado tipo I com cabeça bicelular (2000x, barra = 10 µm); **J** – visão geral da superfície adaxial da sépala (75x, barra = 100 µm); **K** – página adaxial da sépala: tricomas capitados tipo II (1000x, barra = 10 µm); **L** – epiderme adaxial da bráctea fértil: tricoma capitado tipo II (2000x, barra = 10 µm); **M** – superfície adaxial da pétala: tricoma capitado tipo II (2000x, barra = 10 µm)

Estampa 1



#### 4.2.2. Morfologia e distribuição de tricomas em *L. pedunculata*

Em ambas as espécies as flores e brácteas férteis comportam tricomas de dois tipos distintos, não glandulares e glandulares. Os resultados obtidos neste estudo encontram-se resumidos na Tabela 4.3.

##### 4.2.2.1. Tricomas não glandulares

Os tricomas não glandulares nesta espécie apresentam uma textura lisa e são de dois tipos, tectores estrelados e tectores unisseriados. Os tricomas tectores estrelados apresentam um número de braços entre 2 a 3, suportados por um pé com  $300 \pm 146 \mu\text{m}$ . São maioritários na epiderme abaxial das sépalas e das brácteas férteis encontrando-se em menor número na epiderme adaxial de ambas. Nas pétalas não se identificaram tricomas destes tipo. Os tricomas tectores unisseriados são pluricelulares, encontram-se maioritariamente nos ápices da superfície abaxial das sépalas e das brácteas férteis e igualmente em grande número no ápice e zona central das epidermes adaxial e abaxial das pétalas.

##### 4.2.2.2. Tricomas glandulares

Os tricomas glandulares observados nesta espécie são do tipo peltado e capitado. Os tricomas peltados (Est. 2A) foram observados apenas nas epidermes abaxiais das sépalas e das brácteas férteis, sempre com dimensões idênticas, cerca de  $55 \pm 10 \times 73 \pm 8 \mu\text{m}$ . A sua cabeça possui entre 8-12 células (Est. 2B).

Foi ainda observado, apenas na epiderme abaxial de brácteas férteis e de sépalas, um outro tipo de tricoma peltado - tricoma peltado de pedúnculo grande (Est. 2C e 2D). Este tricoma apresenta um pedúnculo unicelular grande,  $65 \pm 31 \times 21 \pm 5 \mu\text{m}$ , que suporta uma cabeça,  $25 \pm 7 \times 50 \pm 14 \mu\text{m}$ , cujo número de células não conseguimos determinar. Estas células da cabeça encontram-se dispostas num mesmo plano, cobertas por uma cutícula.

Nesta espécie os tricomas capitados são de três tipos: capitados tipo I que podem apresentar uma cabeça bicelular (Est. 2E) e unicelular (Est. 2F), medindo respectivamente  $25 \pm 4 \times 18 \pm 3 \mu\text{m}$  e de  $23 \pm 2 \times 21 \pm 3 \mu\text{m}$ . Estes encontram-se em ambas as epidermes das brácteas férteis e sépalas, sendo maioritários na epiderme abaxial de ambas. Nas pétalas apenas nas extremidades foram detectados tricomas capitados tipo I com cabeça unicelular, em número reduzido.

Os tricomas capitados tipo II nesta espécie apresentam-se também com uma cabeça unicelular (Est. 2G e 2H) e bicelular (Est. 2I), estes últimos em menor número e possuem respectivamente  $40 \pm 8 \times 12 \pm 3$  e  $46 \pm 9 \times 13 \pm 3 \mu\text{m}$ . Neste tipo de tricomas, capitados tipo II, uma das células do pedúnculo, normalmente a basal, pode ser muito mais alongada do que a célula distal (Est. 2I). Estes tricomas encontram-se maioritariamente na epiderme

abaxial de brácteas férteis e sépalas, existindo também nas superfícies adaxiais de ambas e na parte central da superfície adaxial da pétala.

Os tricomas capitados do tipo III encontram-se em menor número e apenas nas epidermes abaxiais de sépalas e brácteas férteis, não se apresentando nas pétalas.

Foi ainda observado outro tipo de tricomas distribuídos pelas epidermes abaxiais de brácteas férteis e sépalas. Estes tricomas combinam características dos tricomas tectores estrelados e dos tricomas secretores capitados de tipo II. Essa combinação pode apresentar-se de dois modos: i) um pedúnculo pluricelular que suporta dois a três braços em que apenas um tem extremidade secretora - tricoma misto tipo I (Est. 2J); ii) um pedúnculo pluricelular que suporta dois braços, ambos com extremidade secretora - tricoma misto tipo II (Est. 2K).

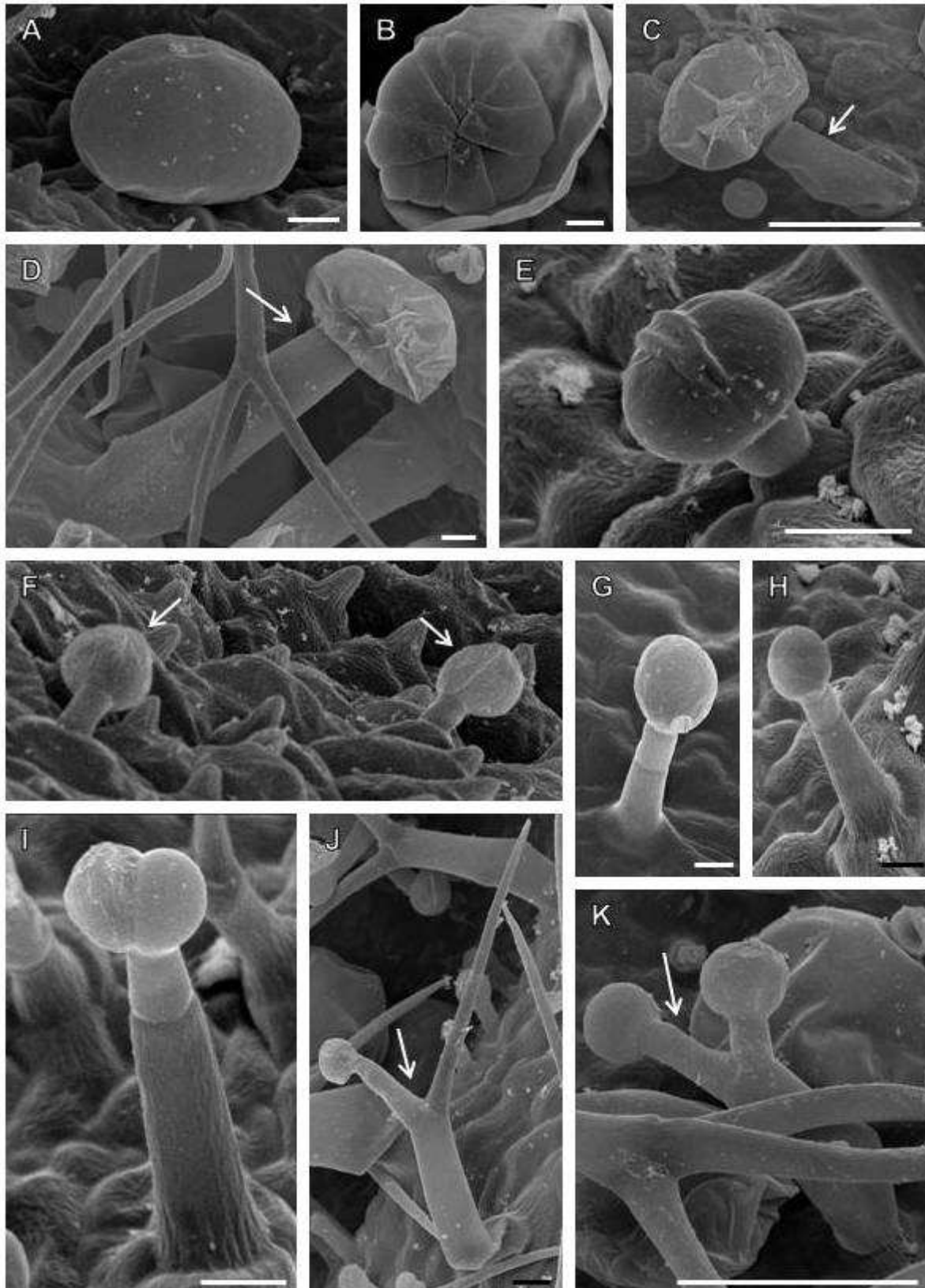
**Tabela 4.3** – Distribuição dos diferentes tipos de tricomas nas superfícies de brácteas férteis, sépalas e pétalas de *L. luisieri* e *L. pedunculata*. (+++ muitos; ++ alguns; + raros; – não se aplica; (A) ápice; (EN) entre nervuras; (PC) parte central).

Espécie	Tipo de tricoma	Bráctea fértil		Sépala		Pétala	
		abaxial	adaxial	abaxial	adaxial	abaxial	adaxial
<i>L. luisieri</i>	Tector unisseriado	+++ (A)	+ (A)	+++ (A)	+ (A)	+++ (A)	+++ (A)
	Tector estrelado	+++	+	+++	+	–	–
	Peltado	+++	–	+++	–	–	–
	Capitado tipo I	+++	+	+++	+	–	–
	Capitado tipo II	++ (A, EN)	–	++ (A, EN)	–	–	++ (PC)
<i>L. pedunculata</i>	Tector unisseriado	+++ (A)	+ (A)	+++ (A)	+ (A)	+++ (A e PC)	+++ (A e PC)
	Tector estrelado	+++	+	+++	+	–	–
	Peltado	+++	–	+++	–	–	–
	Peltado com pedúnculo grande	+++	–	+++	–	–	–
	Capitado tipo I	+++	+	+++	+	+ (A)	+ (A)
	Capitado tipo II	+++	+	+++	+	–	++ (PC)
	Capitado tipo III	+	–	+	–	–	–
	Misto tipo I	+++	–	+++	–	–	–
	Misto tipo II	+++	–	+++	–	–	–

---

**Estampa 2** – Microfotografias de flores e brácteas férteis de *L. pedunculata* em MEV.

**A** – epiderme abaxial da bráctea fértil: tricoma peltado (750x, barra = 10  $\mu\text{m}$ ); **B** – página abaxial da sépala: tricoma peltado sem cutícula, pormenor das células da cabeça (1500x, barra = 10  $\mu\text{m}$ ); **C** – tricoma peltado com pedúnculo grande (seta) (500x, barra = 50  $\mu\text{m}$ ); **D** – página abaxial da sépala: tricoma peltado com pedúnculo grande (seta) (750x, barra = 10  $\mu\text{m}$ ); **E** – superfície abaxial da bráctea fértil: tricoma capitado tipo I com cabeça bicelular (2000x, barra = 10  $\mu\text{m}$ ); **F** – página adaxial da pétala: tricomas capitados tipo I com cabeça unicelular (setas) (500x, barra = 50  $\mu\text{m}$ ); **G** – página abaxial da bráctea fértil: tricoma capitado tipo II com cabeça unicelular (1000x, barra = 10  $\mu\text{m}$ ); **H** – página adaxial da sépala: tricoma capitado tipo II com cabeça unicelular (1000x, barra = 10  $\mu\text{m}$ ); **I** – página abaxial da bráctea fértil: tricoma capitado tipo II com cabeça bicelular e célula basal do pedúnculo alongada (2000x, barra = 10  $\mu\text{m}$ ); **J** – página abaxial da sépala: tricoma misto tipo I (seta) (750x, barra = 10  $\mu\text{m}$ ); **K** – página abaxial da sépala: tricoma misto tipo II (seta) (500x, barra = 50  $\mu\text{m}$ ).



### **4.3. Estudo histoquímico em MOV**

Foram realizados vários testes histoquímicos para a detecção dos principais grupos químicos presentes nas estruturas secretoras das espécies em estudo. Para cada teste foi efectuado o respectivo controlo, de acordo com a bibliografia.

#### **4.3.1. Caracterização de Polissacáridos Totais**

A aplicação do PAS na detecção de polissacáridos totais revelou resultados semelhantes nas duas espécies. Estes foram positivos, pelo aparecimento da cor rosa, a nível dos conteúdos secretores das células da cabeça dos tricomas peltados (Est. 3A). Resultados idênticos mas com diferentes intensidades foram observados nos conteúdos secretores das células da cabeça e do pedúnculo dos tricomas capitados tipo I e tipo II (Est. 3B). Em *L. pedunculata* foram ainda detectadas colorações rosa nas secreções dos tricomas mistos tipo I e tipo II (Est. 3C) e tricomas peltados de pedúnculo grande (Est. 3D).

#### **4.3.2. Caracterização de Pectinas**

A detecção de pectinas com a utilização de vermelho de Ruténio deu resultados positivos nas células da cabeça dos tricomas peltados (Est. 3E) e tricomas capitados tipo I que coraram de vermelho. Esta coloração apresentou-se igualmente nas secreções celulares e subcuticulares de tricomas capitados tipo II (Est. 3F), de tricomas mistos tipo I (Est. 3F), tricomas mistos tipo II (Est. 3G) e tricomas peltados de pedúnculo grande (Est. 3H).

#### **4.3.3. Caracterização de mucilagens**

A aplicação do Ácido Tânico/ Tricloreto de Ferro na detecção de mucilagens revelou resultados positivos, através de cor negra-azulada apenas nas células secretoras que formam a cabeça dos tricomas peltados (Est. 3I e 3J). Resultados positivos foram também encontrados nas células da cabeça e respectivos conteúdos de tricomas capitados tipo I e tipo II (Est. 3K), tricomas mistos tipo I (Est. 3L) e mistos tipo II, e ainda nos tricomas peltados com pedúnculo grande (Est. 3M).

#### **4.3.4. Caracterização de lípidos totais**

A coloração vermelha obtida com o vermelho de Sudão III evidencia a presença de lípidos totais em todos os tipos de tricomas glandulares, como os capitados tipo I (Est. 3N) e tipo II (Est. 3O) estudados, através da coloração vermelho-laranja.

#### **4.3.5. Caracterização de lípidos ácidos e neutros.**

A detecção de lípidos ácidos e neutros com o azul do Nilo revelou que ambos se encontram presentes nos tricomas peltados: de cor rosa, os lípidos neutros ao nível da secreção subcuticular e de cor azul, os lípidos ácidos, no interior das células da cabeça de

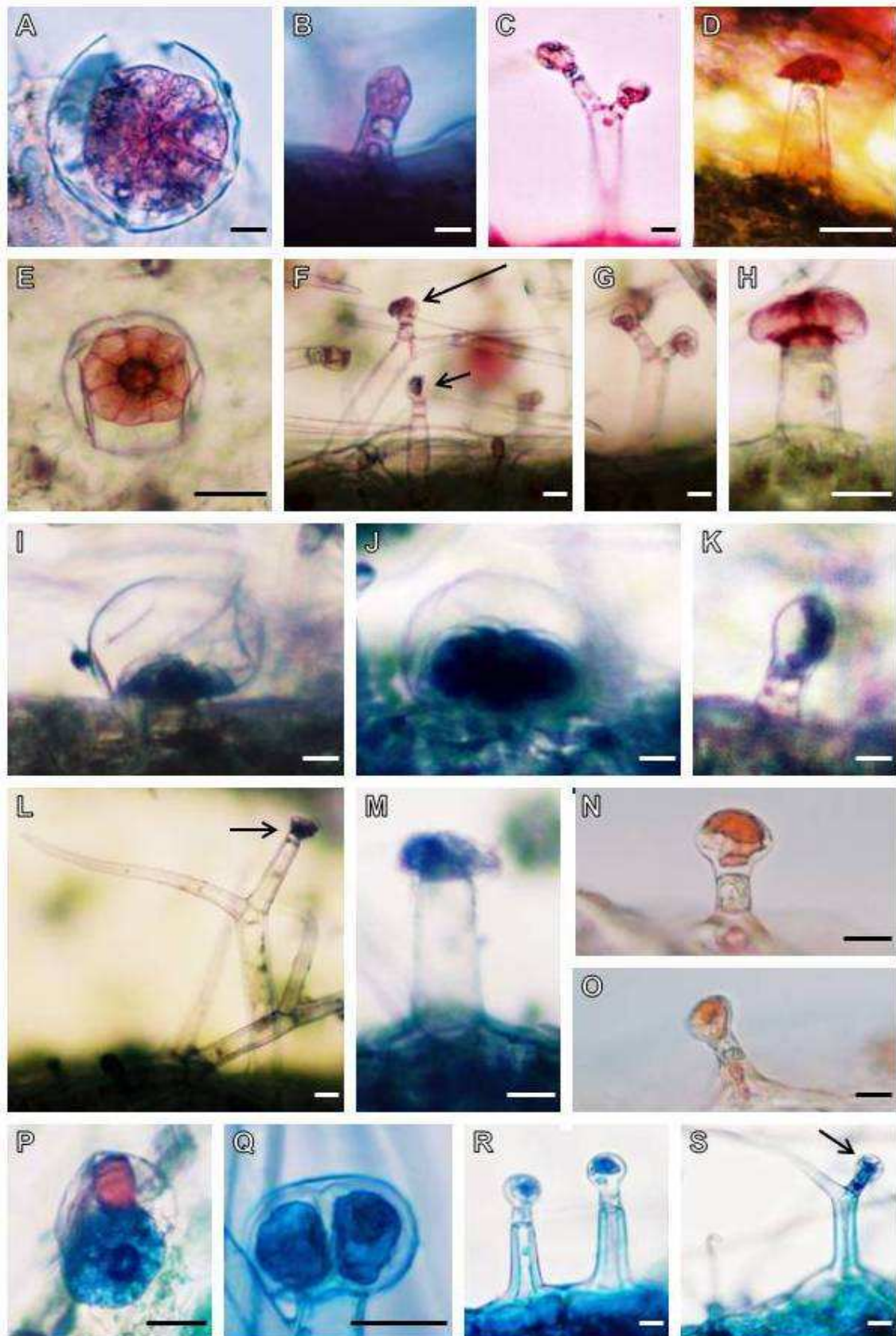
tricomas peltados (Est. 3P). A coloração azul foi igualmente identificada nas secreções celulares das cabeças dos tricomas capitados tipo I (Est. 3Q) e tipo II (Est. 3R), dos tricomas mistos tipo I (Est. 3S) e tipo II e dos tricomas peltados com pedúnculo grande.

---

**Estampa 3** – Tricomas glandulares de brácteas férteis e sépalas de *L. luisieri* (A, B, I, K, N, O, P, Q) e *L. pedunculata* (C, D, E, F, G, H, J, L, M, R, S) submetidos a testes histoquímicos (MOV).

**A** – Tricoma peltado: conteúdo das células secretoras corado com o PAS (barra = 10 µm); **B** – Tricoma capitado tipo II: secretado da cabeça e pedúnculo corado com PAS (barra = 10 µm); **C** – Tricoma misto tipo II: Secreções da cabeça e pontilhado no pedúnculo corado com PAS (barra = 10 µm); **D** – Tricoma peltado com pedúnculo grande: Cabeça corada com PAS (barra = 50 µm); **E** – Tricoma peltado: Células da cabeça coradas com vermelho de Ruténio/ acetato de Cobre (barra = 25 µm); **F** – Tricoma misto tipo I (seta longa) e tricoma capitado tipo II (seta curta): conteúdos secretores corados com vermelho de Ruténio/ acetato de Cobre (barra = 15 µm); **G** – Tricoma misto tipo II: secreções coradas com vermelho de Ruténio/ acetato de Cobre (barra = 15 µm); **H** – Tricoma peltado com pedúnculo grande: células do pescoço e cabeça coradas com vermelho de Ruténio/ acetato de Cobre (barra = 25 µm); **I, J** – Tricoma peltado: secreções das células da cabeça coradas com ácido Tânico/ cloreto de Ferro III (barra = 10 µm); **K** – Tricoma capitado tipo I: secreção corada com ácido Tânico/ cloreto de Ferro III (barra = 10 µm); **L** – Tricoma misto tipo I (seta): secreção da cabeça glandular corada com ácido Tânico/ cloreto de Ferro III (barra = 10 µm); **M** – Tricoma peltado de pedúnculo grande: cabeça corada com ácido Tânico/ cloreto de Ferro III (barra = 25 µm); **N** – Tricoma capitado tipo I: cabeça e célula basal corados com vermelho de Sudão III (barra = 10 µm); **O** – Tricoma capitado tipo II: secreções da cabeça e célula base coradas com vermelho de Sudão III (barra = 10 µm); **P** – Tricoma peltado: conteúdos secretores na cabeça, corados com azul do Nilo, cor rosa, os lípidos neutros e cor azul os lípidos ácidos (barra = 25 µm); **Q** – Tricoma capitado tipo I: células da cabeça coradas com azul do Nilo (barra = 10 µm); **R** – Tricomas capitados tipo II: secreções da cabeça coradas com azul do Nilo (barra = 10 µm); **S** – Tricoma misto tipo I (seta) : cabeça e pedúnculo do braço glandular corados com azul do Nilo (barra = 5 µm).

Estampa 3



#### **4.3.6. Caracterização de ácidos gordos**

No teste com Acetato de Cobre/ Ácido Rubeânico, obtiveram-se reacções positivas, de cor verde escuro, confirmando a presença de ácidos gordos nos conteúdos secretores das células da cabeça e dos espaços subcuticulares dos tricomas peltados (Est. 4A). Resultados idênticos foram obtidos nas secreções celulares da cabeça de tricomas capitados tipo I e tipo II, de tricomas mistos tipo I (Est. 4B) e tipo II (Est. 4B) e de tricomas peltados com pedúnculo grande.

#### **4.3.7. Caracterização de óleos essenciais e ácidos resínicos**

Com a aplicação de reagente de Nadi os óleos essenciais coram de azul e os ácidos resínicos coram de vermelho escuro. Nos nossos resultados observou-se uma coloração azul e azul-violeta revelando resultados positivos ao nível do conteúdo subcuticular e das células secretoras da cabeça e do pedúnculo dos tricomas peltados (Est. 4C e 4D). Resultados idênticos foram observados em algumas células do pedúnculo e nos secretados das células da cabeça de tricomas capitados tipo I (Est. 4E e 4F) e de tricomas capitados tipo II (Est. 4G). Foram ainda identificados óleos essenciais e resínicos nos conteúdos secretores das células da cabeça de tricomas mistos tipo I (Est. 4H) e tipo II, e de tricomas peltados com pedunculo grande (Est. 4I).

#### **4.3.8. Caracterização de terpenóides com grupo carbonilo**

A detecção de terpenóides com grupo carbonilo utilizando 2,4-dinitrofenilhidrazina revelou resultados positivos pelo aparecimento de uma coloração amarela ao nível da cabeça de tricomas peltados, conteúdos secretores celulares e subcuticulares (Est. 4J). Resultados positivos foram igualmente obtidos em tricomas capitados tipo I e tipo II, em tricomas mistos tipo I e tipo II e em tricomas peltados com pedúnculo grande.

#### **4.3.9. Caracterização de fenóis**

A aplicação de Cloreto de Ferro III na detecção de fenóis revelou resultados positivos com diferentes intensidades de cor negra-acastanhada. Estes resultados foram observados a nível das paredes celulares da célula do pedúnculo e da cabeça dos tricomas peltados (Est. 4K), na cabeça dos tricomas capitados tipo I e tipo II (Est. 4L) tricomas mistos tipo I e tipo II, e ainda dos tricomas peltados com pedúnculo grande.

#### **4.3.10. Caracterização de Taninos**

O teste com vanilina clorídrica para a detecção de taninos deu resultados negativos para os conteúdos secretores de todos os tipos de tricomas observados.

#### **4.3.11. Caracterização de alcalóides**

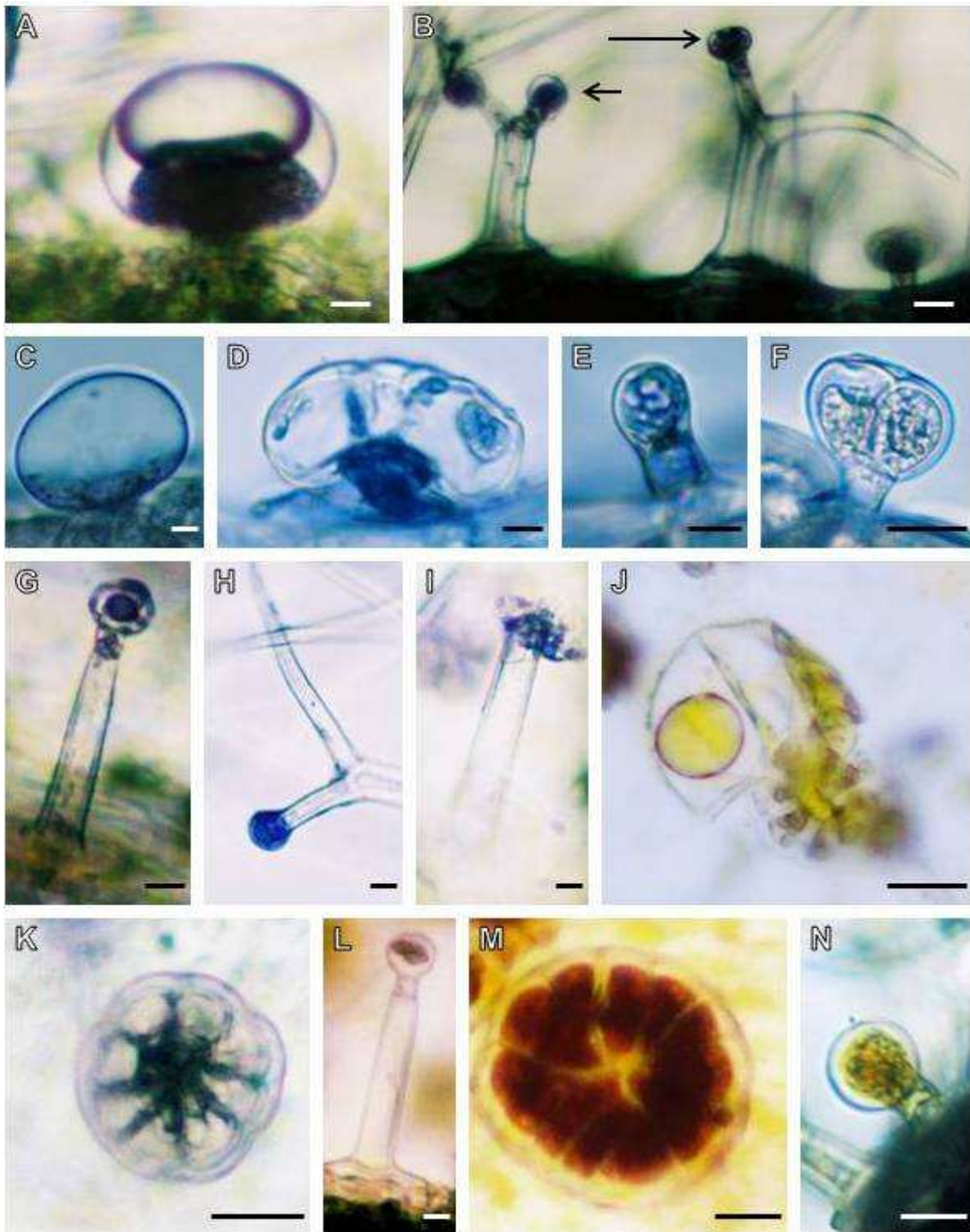
A detecção de alcalóides com o reagente de Wagner revelou resultados positivos com diferentes intensidades de cor castanha. Estes resultados foram obtidos ao nível das próprias células da cabeça dos tricomas peltados (Est. 4M) e capitados tipo I (Est. 4N), Os alcalóides foram ainda encontrados nos tricomas capitados tipo II, nos tricomas mistos tipo I e tipo II, e ainda nos tricomas peltados com pedúnculo grande. Em todos os casos os conteúdos dos espaços subcuticulares não se encontram corados.

---

**Estampa 4** – Tricomas glandulares de brácteas férteis e sépalas de *L. luisieri* (C, E, F, K, N) e *L. pedunculata* (A, B, D, G, H, I, J, L, M) submetidos a testes histoquímicos (MOV).

**A** – Tricoma peltado: conteúdo das células secretoras e espaço subcuticular corados com acetato de Cobre/ Ácido Rubeânico (barra = 10 µm); **B** – Tricoma misto tipo I (seta grande) e tricoma misto tipo II (seta pequena): secreções das cabeça glandulares coradas com acetato de Cobre/ Ácido Rubeânico (barra = 15 µm); **C** – Tricoma peltado: conteúdo subcuticular ligeiramente corado com Nadi (barra = 10 µm); **D** – Tricoma peltado: conteúdos secretores subcuticulares e células da cabeça e pescoço corados com Nadi (barra = 10 µm); **E** – Tricoma capitado tipo I: cabeça e pedúnculo, corados com Nadi (barra = 15 µm); **F** – Tricoma capitado tipo I: células secretoras ligeiramente coradas com Nadi (barra = 15 µm); **G** – Tricoma capitado tipo II: secreções coradas com Nadi (barra = 10 µm); **H** – Tricoma misto tipo I: cabeça glandular corada com Nadi (barra = 10 µm); **I** – Tricoma peltado com pedúnculo grande: cabeça corada com Nadi (barra = 10 µm); **J** – Tricoma peltado: secreções coradas com 2,4-dinitrofenilhidrazina (barra = 10 µm); **K** – Tricoma peltado: paredes celulares das células da cabeça coradas com cloreto de Ferro III (barra = 25 µm); **L** – Tricoma capitado tipo II: secreção subcuticular corada com cloreto de Ferro III (barra = 10 µm); **M** – Tricoma peltado: células da cabeça coradas com o reagente de Wagner (barra = 10 µm); **N** – Tricoma capitado tipo I: célula da cabeça corada com o reagente de Wagner (barra = 10 µm);

Estampa 4



#### **4.4. Estudo histoquímico em MOF**

Foram realizados testes histoquímicos de autofluorescência e fluorescência induzida para a detecção de compostos fenólicos presentes nas estruturas secretoras das espécies em estudo.

##### **4.4.1. Autofluorescência**

Os tricomas localizados nas peças florais exibem autofluorescência azul e amarelo esverdeado, de intensidade e tonalidade diversa, quando sujeitas a luz UV e azul, respectivamente. Essa radiação emitida revela a presença de diferentes compostos fenólicos.

Sob radiação UV obteve-se autofluorescência azul, a nível das células da cabeça e dos conteúdos subcuticulares dos tricomas peltados (Est. 5A, 5B e 5C). Nos tricomas capitados tipo I (Est. 5D, 5E e 5F) e tipo II (Est. 5G e 5H) a autofluorescência azul emitida tem diferentes intensidades e tons, sendo que por vezes é quase nula, o mesmo acontecendo nos tricomas mistos tipo I (Est. 5I e 5J) e mistos tipo II. Nos tricomas peltados com pedúnculo grande a fluorescência azul emitida é muito intensa ao nível das células da cabeça e em alguns pontos da parede celular da célula do pedúnculo (Est. 5K). Com excitação na banda da luz azul detectou-se autofluorescência amarelo esverdeado ao nível de todos os tipos de tricomas (Est. 5L, 5M, 5N, 5O, 5P, 5Q). Resultados positivos foram ainda obtidos ao nível dos conteúdos secretores da cabeça dos tricomas mistos tipo I (Est. 5R) e tipo II e nos tricomas peltados com pedúnculo grande (Est. 5S). Neste último tipo de tricoma o pedúnculo continua a apresentar focos de maior emissão de fluorescência amarelo esverdeado.

##### **4.4.2. Fluorescência induzida**

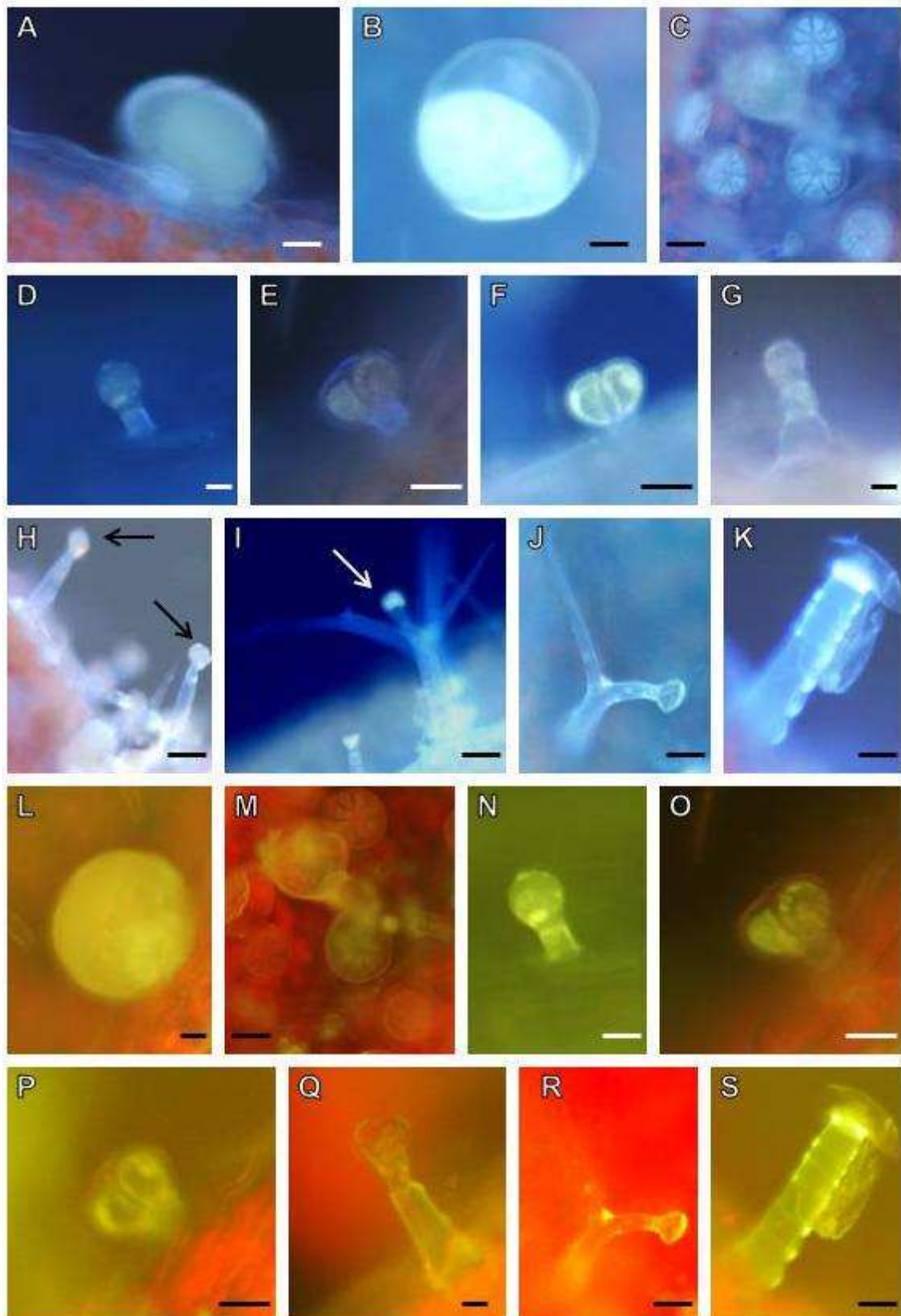
Com a aplicação de reagente de Neu os tricomas peltados (Est. 6A) exibiram uma fluorescência azul em luz UV mais intensa do que a obtida sem o fluorocromo. Nos tricomas capitados tipo I (Est. 6B e 6C), as células da cabeça revelaram uma fluorescência castanha enquanto a célula do seu pedúnculo apresentou fluorescência azul. Outros tipos de tricomas, como os capitados tipo II, mistos e peltados com pedúnculo grande, revelaram, ao nível do pedúnculo e da cabeça, fluorescência azul, emitida em diferentes intensidades e tons.

---

**Estampa 5** –Tricomas glandulares de sépalas de *L. luisieri* (A, B, D, E, G, L, N, O) e *L. pedunculata* (C, F, H, I, J, K, M, P, Q, R, S) submetidos a autofluorescência em luz UV (A a K) e azul (L a S) (MOF).

**A, B e C** – Tricomas peltados: conteúdo das células secretoras exibindo autofluorescência azul (barra: A = 10 µm; B = 10 µm; C = 25 µm); **D** – Tricoma capitado tipo I com cabeça unicelular: autofluorescência azul nas secreções da cabeça e do pedúnculo (barra = 10 µm); **E** – Tricoma capitado tipo I com cabeça bicelular: cutícula e pedúnculo com autofluorescência azul (barra = 10 µm); **F** – Tricoma capitado tipo I com cabeça bicelular: células secretoras exibindo autofluorescência azul (barra = 10 µm); **G** – Tricoma capitado tipo II: autofluorescência azul nos conteúdos secretores (barra = 10 µm); **H** – Tricomas capitados tipo II (setas): conteúdos secretores com autofluorescência azul (barra = 20 µm); **I** – Tricoma misto tipo I: cabeça glandular exibindo autofluorescência azul (barra = 20 µm); **J** – Tricoma misto tipo I: autofluorescência azul nas paredes da cabeça e pescoço (barra = 20 µm); **K** – Tricoma peltado com pedúnculo grande: secreções das células do pescoço e parede lateral da célula do pedúnculo exibindo autofluorescência azul (barra = 25 µm); **L e M** – Tricoma peltado: secreções com autofluorescência amarela (barra: L = 10 µm; M = 25 µm); **N** – Tricoma capitado tipo I com cabeça unicelular: autofluorescência amarela na cabeça e pedúnculo (barra = 10 µm); **O e P** – Tricoma capitado tipo I com cabeça bicelular: células secretoras da cabeça e pedúnculo exibindo autofluorescência amarela (barra = 10 µm); **Q** – Tricoma capitado tipo II: autofluorescência amarela na cabeça e paredes laterais do pedúnculo (barra = 10 µm); **R** – Tricoma misto tipo I: cabeça glandular com autofluorescência amarela (barra = 20 µm); **S** – Tricoma peltado com pedúnculo grande: conteúdos secretores do pescoço e parede lateral da célula do pedúnculo exibindo autofluorescência amarela (barra = 25 µm).

Estampa 5



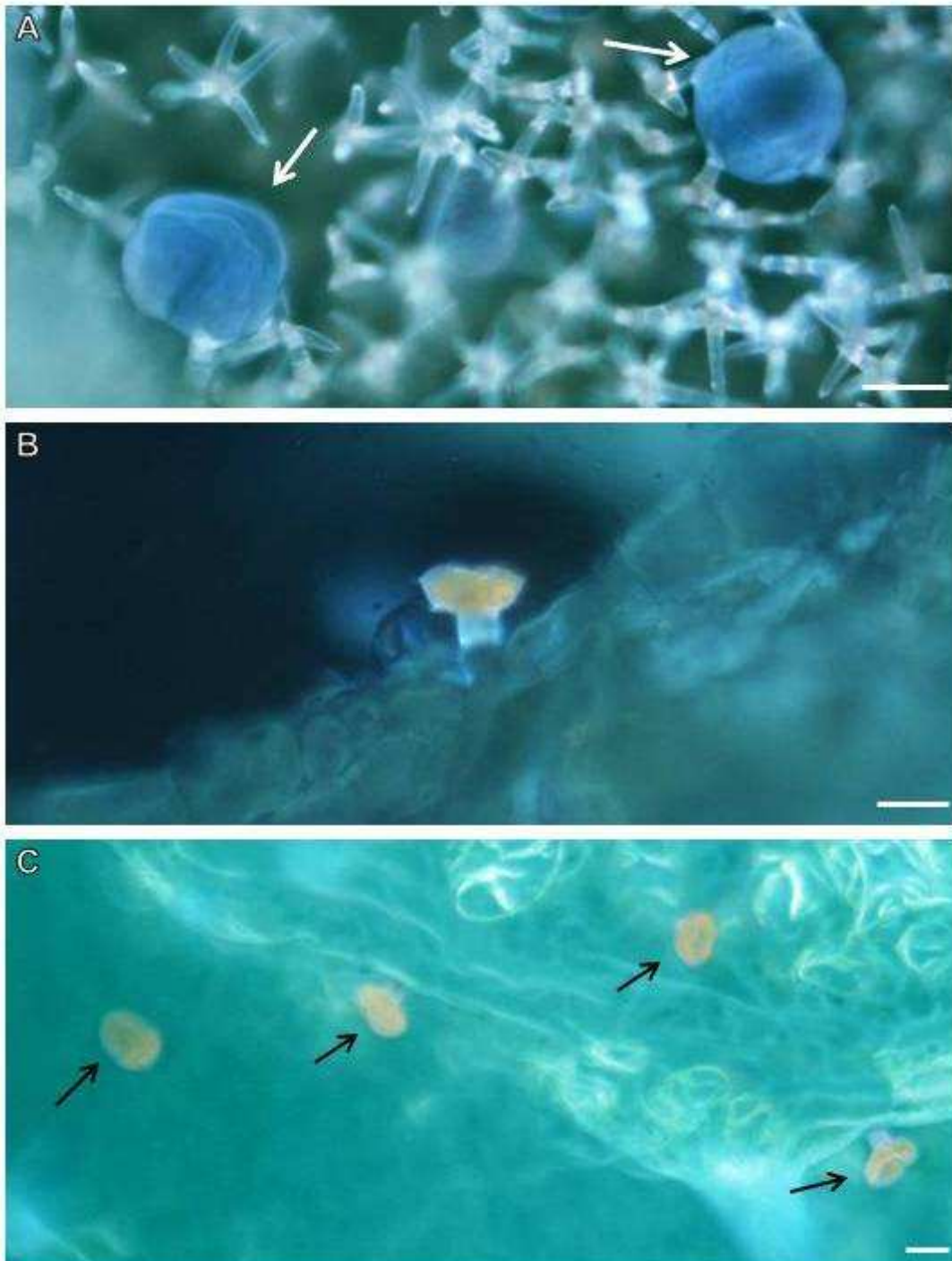
---

**Estampa 6** –Tricomas glandulares de sépalos de *L. luisieri* (A, B) e *L. pedunculata* (C) submetidos a fluorescência induzida em luz UV (MOF).

**A** – Tricomas peltados (setas): conteúdos secretores corados com reagente de NEU (barra = 25 µm);

**B** – Tricoma capitado tipo I: secreções coradas com reagente de NEU (barra = 10 µm) **C** – Tricomas capitados tipo I: conteúdos secretores corados reagente de NEU (barra = 10 µm).

Estampa 6



## 5. Discussão

---

### 5.1. Análise dos óleos essenciais

Como foi referido as espécies em estudo apresentam estruturas secretoras externas onde se sintetizam e acumulam óleos essenciais. No nosso estudo utilizámos o método de hidrodestilação para a extracção desses compostos.

Os óleos essenciais extraídos das partes aéreas das amostras de *L. luisieri* tiveram rendimentos entre 0.1 e 1.0% (% v/p.f.) Num estudo feito com *L. luisieri* Baldovini *et al.* (2005) obtiveram um rendimento em óleo essencial de 0.2% (v/p), o que está de acordo com os nossos resultados. Igualmente de acordo encontram-se os rendimentos dos óleos essenciais entre 0.1 e 0.9% (% v/p), obtidos por González-Coloma (2006) num estudo efectuado em folhas e flores da mesma espécie. Zuarte *et al.* (2009) obtiveram um intervalo de rendimentos entre 0.5 e 1.1% (v/p) em óleos essenciais de *L. pedunculata*, no nosso estudo o rendimento obtido para esta espécie encontra-se acima deste intervalo, tendo sido obtido um valor de 2% (% v/ p.f.).

Dos resultados obtidos verifica-se uma homogeneidade da fracção principal em todos os óleos essenciais dos exemplares em estudo, existindo contudo diferenças nos seus componentes principais (Tab. 4.1 e 4.2).

Nos óleos essenciais de *L. pedunculata* obteve-se como componente principal a fenchona seguida do 1,8-cineol e da cânfora. Estes dados corroboram com dados anteriores obtidos a partir de populações da mesma espécie colhidas no Norte e no Centro de Portugal Continental, em que a fenchona foi o componente dominante, seguida do 1,8-cineol e da cânfora (Tab. 4.1 e 4.2) (Zuarte *et al.* 2009). A composição dos óleos essenciais de *L. pedunculata* obtidos neste estudo mostram similaridades com os descritos para a espécie *L. stoechas* subsp. *stoechas* de outras regiões do mediterrâneo nomeadamente Espanha, Chipre, Grécia, Córsega e Turquia. Apesar de *L. pedunculata* e *L. stoechas* subsp. *stoechas* serem morfológicamente bem distintas, os seus óleos essenciais consistem nos mesmos componentes maioritários e no mesmo polimorfismo químico (em Zuarte *et al.* 2009).

Os óleos essenciais de *L. luisieri* são caracterizados pela presença de derivados de necrodano como o *trans*- $\alpha$ -necrodol e o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (Tab. 5.1) (Sanz *et al.*, 2004; Baldovini *et al.*, 2005). Garcia-Vallejo *et al.* (1994) e Lavoine-Hanneguelle e Casabianca (2004) referem igualmente que o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo era mesmo o composto dominante nos óleos essenciais de *L. luisieri* colhidas no Sudoeste da Península Ibérica. Um outro estudo com populações de *L. luisieri* colhidas no sudeste da região da Beira Interior de Portugal Continental (González-Coloma *et al.* 2011) revelou que o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo foi o componente maioritário dos óleos essenciais (Tab. 5.1). Estes dados vão de encontro aos obtidos no presente estudo em relação ao componente maioritário dos óleos essenciais pertencentes ao *cluster* II, que foi precisamente o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo.

Alguns dos exemplares de *L. luisieri* incluídos no nosso estudo e reunidos no *cluster* III contrariam esta evidência pois os óleos essenciais obtidos apresentam como composto maioritário o 1,8-cineol. Contudo resultados semelhantes foram obtidos por Miguel *et al.* (2009) em óleos essenciais de *L. luisieri* colhidas no Algarve (Tab. 5.1).

Assim, nos óleos essenciais isolados das diferentes amostras de *L. luisieri* foi detectada a presença de dois componentes dominantes distintos, acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo (*cluster* II) e 1,8-cineol (*cluster* III), sendo ambos detectados em óleos essenciais isolados de amostras colhidas em anos consecutivos na HRA, com excepção de uma amostra pertencente ao *cluster* II, a qual foi colhida na BCB. O polimorfismo químico obtido entre estes dois *clusters* e o facto de a colheita não ter sido efectuada exactamente no mesmo indivíduo em anos consecutivos diferentes e sim em amostras de indivíduos que se encontravam próximos entre si no mesmo local leva a considerar a existência de dois quimiotipos nas amostras da espécie *L. luisieri*, o acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo e o 1,8-cineol. Sendo esta uma possível explicação para os dois aglomerados de óleos essenciais de amostras da mesma espécie e baixa correlação entre eles.

**Tabela 5.1** – Constituintes maioritários ( $\geq 5\%$ ) dos óleos essenciais das espécies *L. pedunculata* e *L. luisieri* colhidas em Portugal e Espanha e respectivos autores dos estudos.

Espécie	Local de colheita	Constituintes maioritários ( $\geq 5\%$ )	Bibliografia
<i>L. pedunculata</i>	Mirandela, Bragança, Guarda e Coimbra	Fenchona (1.3-59.7%), 1,8-cineol (2.4-55.5%) e cânfora (3.6-48.0%).	Zuarte <i>et al.</i> 2009
	Trás-os-Montes Coimbra	Fenchona (0.6-48.7%), cânfora (3.6-32.4%), 1,8-cineol (2.4-24%), $\alpha$ -pineno (4.8-6.9%) e linalol (3.4-5.2%).	Zuarte <i>et al.</i> 2010
<i>L. luisieri</i>	Algarve (Faro, Loulé e Vila Real de Santo António)	1,8-Cineol (25.7-34.3%), acetato de <i>trans</i> - $\alpha$ -necrodilo (11.3-17.5%), <i>trans</i> - $\alpha$ -necrodol (2.8-8.2%), fenchona (0.2-6.6%) e 2,3,5,5-tetrametil-4-metileno-2-ciclopenteno-1-ona (2.4-5.1%).	Miguel <i>et al.</i> 2009
	Penamacor	Acetato de <i>trans</i> - $\alpha$ -necrodilo (42.8%), cânfora (10.5%) e p-cimeno (8.8%).	González-Coloma <i>et al.</i> 2011
	Sul de Toledo	Referência a 1,8-cineol, fenchona e cânfora.	Sanz <i>et al.</i> 2004
	Sevilha	Referência a <i>trans</i> - $\alpha$ -necrodol, acetato de <i>trans</i> - $\alpha$ -necrodilo e 1,8-cineol.	Baldovini <i>et al.</i> 2005

González-Coloma *et al.* (2006) mostraram que os óleos essenciais de *L. luisieri* diferem de acordo com a parte da planta da qual o óleo essencial foi isolado bem como o local de colheita do material vegetal. O que também pode justificar os resultados obtidos para a espécie *L. luisieri*. Além disso à que ter em conta vários outros factores, como as condições ambientais, factores genéticos, entre outros. Todos estes factores podem influenciar a composição química dos óleos (Figueiredo *et al.* 2008). Um outro factor a ter em conta é o do manuseamento experimental e que tendo algumas extracções utilizado equipamento com especificidades diferentes isso pode, igualmente, ter algum reflexo no rendimento e composição final do óleo essencial.

## 5.2. Caracterização morfológica

No género *Lavandula* o estigma é único e pode apresentar-se bilobado, capitado ou truncado (Upson *et al.* 2002). Isto vai de encontro às nossas observações, pois para ambas as espécies estudadas o estigma apresentou-se único e truncado. A forma dos grãos de pólen e a ornamentação da superfície da exina estão de acordo com outros membros da família Lamiaceae (Teixeira e Branco, 2006).

Os nossos resultados estão em conformidade com estudos anteriores em Lamiaceae, confirmando a utilidade dos caracteres micromorfológicos na identificação taxonómica (Giuliani *et al.* 2008) e torna possível estabelecer relações sistemáticas entre espécies. Ambos os taxa revelaram tricomas não glandulares do tipo estrelado nas sépalas e brácteas férteis, sendo mais abundantes nas epidermes abaxiais; os tricomas unisseriados observaram-se em sépalas, pétalas e brácteas férteis sendo mais abundantes na epiderme adaxial das pétalas. Os tricomas unisseriados já haviam sido referenciados por outros autores para outras espécies da mesma família (Abdullah, 1991; Grubešić, 2007, Celep, 2011), assim como os tricomas não glandulares do tipo estrelado (Zuarte *et al.* 2011; Rezakhanl e Talebi, 2010).

Também os tricomas glandulares, tricomas peltados e capitados, observados nas várias estruturas forais são idênticos aos encontrados em folhas de outras espécies de Lamiaceae (Werker *et al.* 1985; Antunes e Sevinate Pinto, 1991; Bourett *et al.* 1994; Ascensão *et al.* 1995; Gavalas *et al.* 1998) e também semelhantes aos anteriormente descritos para as folhas em *L. luisieri* (Teixeira e Correia, 2009). Nas duas espécies os tricomas peltados não apresentaram nenhuma diversidade na sua morfologia, e apresentaram-se apenas nas páginas abaxiais das sépalas e brácteas férteis, não sendo visíveis em pétalas. Se atendermos a que os tricomas peltados são aqueles que maior quantidade de óleos essenciais armazenam verificamos que, de acordo com as nossas observações, as pétalas serão as estruturas florais que menos quantidade desses compostos apresentam.

Os tricomas capitados variam muito a nível morfológico, principalmente na sua estrutura e dimensão (Werker *et al.* 1985). De acordo com o nosso estudo as sépalas e brácteas

férteis de *L. luisieri* suportam dois diferentes tipos de tricomas capitados, os capitados tipo I e tipo II enquanto as pétalas suportam apenas o tipo II. Em *L. pedunculata* existem três tipos de tricomas capitados nas sépalas e brácteas férteis, os capitados tipo I, tipo II e tipo III, sendo que este último é minoritário. Nesta espécie apenas dois tipos foram identificados nas pétalas, os capitados tipo I e tipo II. O número de tricomas capitados nas duas espécies de *Lavandula* estudadas é idêntica, verificou-se uma maior abundância na epiderme abaxial de sépalas e brácteas férteis e epiderme adaxial das pétalas. Um estudo anterior em folhas de *L. luisieri* e *L. pedunculata* subsp. *sampaiana* revelaram igualmente os mesmos dois tipos de tricomas capitados na primeira espécie e os mesmos três tipos de tricomas capitados na segunda espécie (Teixeira, comunic. pessoal).

A espécie *L. pedunculata* revelou outros dois tipos de tricomas nas epidermes abaxiais das sépalas e brácteas férteis. Estes tricomas combinam características dos tricomas tectores estrelados e dos tricomas secretores capitados de tipo II. Por este motivo optámos neste estudo pela designação de tricomas mistos tipo I (um pedúnculo pluricelular que suporta dois a três braços, em que apenas um braço tem extremidade secretora) e mistos tipo II (um pedúnculo pluricelular que suporta dois braços, ambos com extremidade secretora). Estes resultados corroboram um estudo anterior obtido para a mesma espécie, colhida em Portugal na zona centro e sujeita a micropropagação, em que foram identificados dois tipos de tricomas com as mesmas características morfológicas (Zuarte *et al.* 2010). Os referidos autores classificaram estes tipos de tricomas de outra forma, os que nomeamos tricomas mistos tipo I e mistos tipo II eles designaram respectivamente de tricomas mistos ramificados e de tricomas bifurcados.

No nosso estudo foi ainda detectado na espécie *L. pedunculata* um outro tipo de tricoma peltado, com uma única célula basal de grandes dimensões e para o qual não foi encontrada nenhuma referência bibliográfica. Neste tipo de tricoma não foi possível fazer a sua completa caracterização, quanto ao número de células na cabeça.

### 5.3. Estudo histoquímico

Os resultados dos testes histoquímicos revelaram que as secreções acumuladas nos tricomas glandulares de brácteas férteis e sépalas das espécies em estudo têm uma composição complexa. Apresentaram diferentes modos de secreção e quase todos revelaram secreções mistas, hidrofílicas e lipofílicas na sua natureza. Os testes com PAS, vermelho de Ruténio e ácido Tânico/ Tricloreto de Ferro para a detecção de polissacáridos totais, pectinas e mucilagens respectivamente, revelaram a presença destes em todos os tipos de tricomas detectados. A presença de polissacáridos nas secreções de tricomas glandulares em espécies de Lamiaceae já havia sido referida por outros autores (Ascensão *et al.*, 1999; Corsi e Bottega, 1999; Marine *et al.*, 2010) assim como a presença de pectinas (Marine *et al.*, 2010) e a presença de mucilagens (Ascensão e Pais, 1998; Corsi e Bottega,

1999). Através dos testes com vermelho de Sudão III, azul do Nilo e acetato de Cobre/ ácido Rubeânico observaram-se respectivamente lípidos totais, lípidos ácidos e ácidos gordos em todos os tipos de tricomas e ainda lípidos neutros nas secreções subcuticulares de tricomas peltados.

A presença de lípidos totais nas secreções de tricomas peltados e capitados e de lípidos ácidos em tricomas peltados já havia também sido referida em estudos anteriores com *Mentha cervina* L. (Rodrigues *et al.*, 2008). Em luz visível, utilizando o reagente de Nadi, foi detectada a presença de uma mistura de óleos essenciais e ácidos resínicos. Dado apresentarem uma cor azul e azul-violeta pressupõem-se que haja uma predominância de óleos essenciais. Estes resultados também foram verificados por Kirchoff *et al.* (2008). O teste com 2,4-dinitrofenilhidrazina revelou a presença de terpenóides com grupo carbonilo através de uma coloração amarela, mas segundo este teste (Ganter e Jollés 1969, 1970) a presença de terpenóides com grupo carbonilo é revelada através de uma coloração vermelho-alaranjada. Esta coloração amarela pode ter sido devido a uma eventual alteração do reagente. Marine *et al.* (2010) num estudo efectuado em tricomas glandulares de *Satureja subspicata* (Lamiaceae) observaram que estes possuíam fenóis e taninos na sua composição. No nosso estudo em ambas as espécies observaram-se resultados idênticos excepto na presença de taninos a qual deu negativa. No último teste efectuado em luz visível verificou-se que os alcalóides fazem igualmente parte das secreções dos vários tipos de tricomas glandulares de brácteas férteis e sépalas de ambas as espécies de *Lavandula*. A presença de alcalóides em secreções de tricomas de Lamiaceae já havia sido referida por outros autores (Corsi e Bottega, 1999; Pachkore, 2011) assim como a sua ausência (Ascensão e Pais, 1998; Ascensão 1999). De referir que o teste utilizado na detecção de alcalóides contém iodo na sua composição, podendo ter também afinidade para outros grupos de compostos como por exemplo as proteínas. Convém também referir que no conteúdo celular normal coexistem vários tipos de compostos, o que pode levar a que os resultados de testes histoquímicos não sejam por vezes suficientemente claros e esta não deverá ser a única via para a detecção da presença de compostos do metabolismo secundário.

Muitos compostos fenólicos em várias plantas são autofluorescentes quando excitados com radiação UV, exibindo um espectro de emissão de fluorescência com forte emissão na região azul-verde (400-550 nm) (em Schoenwaelder, 2008). Um trabalho realizado em diferentes espécies de Lamiaceae (*L. album*, *L. purpureum*, *L. cardiaca*, *M. vulgare*, *S. officinalis* e *G. speciosa*) demonstrou a elevada presença de polifenóis nesta família (Matkowski e Piotrowska, 2006). Este estudo vai de encontro aos resultados obtidos, uma vez que por microscopia de fluorescência se observou autoflorescência azul na cabeça de tricomas glandulares em UV e amarela em luz azul indicativa da presença de fenóis. Os flavonóides são um conjunto de substâncias que ocorre em todas as espécies pertencentes

à família das Lamiaceae, embora cada gênero ou espécie apresente variações relativamente ao tipo de flavonóides que contêm (Upson *et al.*, 2000).

O reagente de Neu, um reagente padrão para a detecção de flavonóides e aloína, forma complexos com compostos fenólicos emitindo colorações específicas fluorescentes sob luz UV. O tratamento com o reagente de NEU gera em luz UV (365 nm) fluorescência laranja e amarelo-verde em flavonas, fluorescência verde-escuro em flavanonas e fluorescência azul brilhante intensa em ácidos carboxílicos fenólicos (Wagner e Blader, 1996). Nos nossos resultados a aplicação do reagente de NEU nas sépalas de ambas as espécies de *Lavandula* revelou fluorescência de cor laranja na cabeça de tricomas capitados tipo I, indicativa da presença de flavonóides do tipo flavonas e fluorescência de cor azul no pedúnculo destes e nos restantes tipos de tricomas detectados, revelando a presença de flavonóides do tipo ácidos carboxílicos fenólicos. Apesar dos testes histoquímicos em luz visível darem resultados semelhantes, revelando compostos químicos também semelhantes nos vários tipos de tricomas, em fluorescência isso não se verifica. Este tipo de observação pode ser considerado mais preciso pois permite distinguir diferentes tipos de compostos químicos dentro de uma mesma classe, neste caso os fenóis, mesmo em baixas concentrações.

## 6. Conclusão e Perspectivas Futuras

---

No presente trabalho procedeu-se à aplicação de metodologias para a identificação dos componentes voláteis, de amostras de duas espécies de *Lavandula* endémicas na flora Portuguesa. Os monoterpenos oxigenados revelaram-se a fracção principal em todos os óleos essenciais de *Lavandula*, existindo diferenças nos componentes maioritários que se confirmaram com a análise de *clusters*. Estas diferenças, levaram a considerar três quimiotipos, o quimiotipo fenchona nas amostras de *L. pedunculata*, e os quimiotipos acetato de *trans*- $\alpha$ -necrodilo e 1,8-cineol nas amostras de *L. luisieri*. Os dados obtidos corroboraram os existentes na bibliografia.

A caracterização morfológica tem sido a principal abordagem para a descrição de uma planta e sua classificação, sendo os caracteres micromorfológicos os mais usados, em Taxonomia devido à sua estabilidade. As flores e brácteas férteis de *L. luisieri* e *L. pedunculata* apresentaram vários tipos de tricomas glandulares e não glandulares descritos na bibliografia para a família Lamiaceae, havendo uma maior abundância destes nas epidermes abaxiais de sépalas e brácteas férteis. Neste trabalho reportamos pela primeira vez um tipo de tricoma presente na espécie *L. pedunculata* que se caracteriza por ter uma cabeça semelhante à do tricoma peltado e um pedúnculo muito grande.

Do estudo histoquímico em MOV foi retirada a informação relativa aos grupos de compostos existentes em *L. luisieri* e *L. pedunculata*, sendo que foi identificada a presença de polissacáridos, pectinas, mucilagens, lípidos (totais, ácidos e neutros e ácidos gordos), terpenóides (óleos essenciais e ácidos resínicos e terpenóides com grupo carbonilo), fenóis e alcalóides em ambas as espécies. As cabeças glandulares dos vários tipos de tricomas destacaram-se por conterem a maioria dos compostos supracitados, sendo pois o seu local de acumulação. EM MOF reafirmou-se a presença de fenóis nos vários tipos de tricomas estudados, que puderam ser discriminados através do reagente de NEU verificando-se dois tipos de flavonóides nos tricomas capitados tipo I e peltados, o que pode deixar transparecer diferentes vias de síntese de compostos para os diferentes tipos de tricomas.

No futuro, será interessante fazer a extracção de óleos essenciais de amostras dos mesmos indivíduos de *L. luisieri* e *L. pedunculata* em anos consecutivos, valorizando a potencial influência das espécies que coexistem no local nos componentes voláteis das espécies de *Lavandula*. Seria igualmente curioso fazer um estudo de ontogenia dos tricomas presentes em ambas as espécies, de forma a caracterizá-los, e principalmente para obter mais informação sobre os tricomas peltados com pedúnculo grande. Os óleos essenciais das duas espécies em estudo poderiam ser submetidos a ensaios de actividade biológica, nomeadamente as actividades antimicrobiana, antioxidante e citotóxica.

## 7. Referências Bibliográficas

---

- Abdullah RD, (1991). Trichome types in the Genus *Otostegia Benth.* (Lamiaceae). 1. *O. fruticosa* var. *fruticosa* (Forssk.) Briq. and *O. fruticosa* var. *schimperii* (Boiss.) Tackh. *J. King Saud Univ.* 3: 23-30.
- Andrews S & Upson T, (2004). The Genus *Lavandula*. Timber press, Inc. USA. pp. 103-106. (ISBN 0881926426).
- Antunes T e Sevinate-Pinto I, (1991). Glandular trichomes of *Teucrium scorodonia* L. morphology and histochemistry. *Flora* 185: 65-70.
- Ascensão L, Marques N, Pais MS, (1995). Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Ann Bot.* 75: 619-626.
- Ascensão L, Mota L, Castro M de M, (1999). Glandular Trichomes on the Leaves and Flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, Distribution and Histochemistry. *Ann. Bot.* 84: 437-447.
- Ascensão L e Pais MS, (1998). The Leaf Capitate Trichomes of *Leonotis leonurus*: Histochemistry, Ultrastructure and Secretion. *Ann. Bot.* 81: 263-271.
- Baldovini N, Lavoine-Hanneguelle S, Ferrando G, Dusart G, Lizzani-Cuvelier L, (2005). Necrodane monoterpenoids from *Lavandula luisieri*. *Phytochemistry* 66: 1651-1655.
- Başer KHC, (1995). Analysis and quality assessment of essential oils. Em: Silva KT (ed). A manual on the essential oil industry. United Nations Industrial Development Organization. Viena. pp 155-172.
- Bourett TM, Howard RJ, O'Keefe DP, Hallahan DL, (1994). Gland development on leaf surfaces of *Nepeta racemosa*. *Int. J. Plant Sci.* 155: 623-632.
- Celep F, Kahraman A, Atalay Z, Doğan M, (2011). Morphology, anatomy and trichome properties of *Lamium truncatum* Boiss. (Lamiaceae) and their systematic implications. *AJCS* 5(2):147-153.
- Council of Europe (COE) (2007). European Directorate for the Quality of Medicines. European Pharmacopoeia. 6th Ed. Strasbourg.
- Corsi G e Bottega S, (1999). Glandular Hairs of *Salvia officinalis*: New Data on Morphology, Localization and Histochemistry in Relation to Function. *Ann. Bot.* 84: 657-664.
- Coutinho AXP, (1939). Flora de Portugal (Plantas Vasculares). Bertrand, 2ª ed. Lisboa.
- Croteau R, Kutchan T, Lewis N, (2000). Natural products (secondary metabolites). Em: Buchanan B, Gruissem W, Jones R, (eds). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 1ª ed. American Society of Plant Physiologist. Maryland. pp 1250-1318.
- David R e Carde JP, (1964). Coloration différentielle des pseudophylles de *Pin maritime* au moyen du reactif de Nadi. *C. R. Acad. Sci. Paris, ser. D* 258: 1338-1340.
- Feijão RO, (1979). Medicina pelas Plantas. Livraria Progresso Editora, Lisboa.

- Figueiredo AC, Barroso J, Pedro L, Scheffer J, (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.* 23: 213-226.
- Franco JA, (1984) Nova Flora de Portugal (Continente e Açores) Vol. II *Clethraceae – Compositae*, Lisboa.
- Furr Y e Mahlberg PG, (1981). Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *J. Nat. Prod.* 44: 153-159.
- Ganter P e Jollès G, (1969,1970). *Histologie normale et pathologique*. Vols. 1, 2 Gauthier-Villars, Paris.
- Garcia-Vallejo MI, Garcia-Vallejo MC, Sanz J, Bernabé M, Velasco-Negueruela A, (1994). Necrodanes Derivatives in *Lavandula luisieri*, New Compounds to the plant kingdom. *Phytochemistry* 36: 43-45.
- Gardner RO, (1975). Vanillin-Hydrochloric acid as a histochemical test for tannin. *Stain Technol.* 50: 315-317.
- Gavalas N, Bosabalidis AM, Kokkini S, (1998). Comparative study of leaf anatomy and essential oils of the hybrid *Mentha 3 villosa-nervata* and its parental species *M. longifolia* and *M. spicata*. *Isr. J. Plant Sci.* 46: 27-33.
- Giuliani C, Pellegrino R, Tirillini B, Bini LM, (2008). Micromorphological and chemical characterisation of *Stachys recta* subsp. *serpentini* (Fiori) Arrigoni in comparison to *Stachys recta* L. subsp. *recta* (Lamiaceae). *Flora* 203:376-385.
- González-Coloma A, Delgado F, Rodilla J, Silva L, Sanz J, Burillo J, (2011). Chemical and biological profiles of *Lavandula luisieri* essential oils from western Iberia Peninsula populations. *Biochem. System. and Ecol.* 1-8.
- González-Coloma A, Martin-Benito D, Mohamed N, Garcia-Vallejo MC, Soria AC, (2006). Antifeedant Effects and Chemical Composition of Essential Oils from different populations of *Lavandula luisieri* L. *Biochem. Syst. Ecol.* 34: 609-616.
- Grubešić RJ, Vladimir-Knežević S, Kremer D, Kalođera Z, Vuković J, (2007). Trichome micromorphology in *Teucrium* (Lamiaceae) species growing in Croatia. *Biologia, Bratislava* 62(2): 148-156.
- Johansen DA, (1940). *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, Nova Iorque.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ, (2008). *Plant Systematics – A Phylogenetic approach*, 3<sup>rd</sup> ed. Sinauer Associates Inc., USA.
- Kirchoff BK, Shan-Shan H, Liao JP, (2008). The Capitate and Peltate Glandular Trichomes of *Lavandula pinnata* L. (Lamiaceae): Histochemistry, Ultrastructure and Secretion. *J. Torrey Bot. Soc.* 135: 155-167.
- Lavoine-Hannequelle S e Casabianca H, (2004). New compounds from the essential oil and absolute of *Lavandula luisieri* L. *J. Essent Oil Res.* 16: 445-448.

- Marin M, Jasníc N, Lakusić D, Duletic-Lausević S, Ascensão L, (2010). The micromorphological, Histochemical and Confocal Analysis of *Satureja subspicata* Bartl. Ex Vis. Glandular Trichomes. *Arch. Biol. Sci.* 62(4): 1143-1149.
- Martins MBG, (2002). Estudos de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura em folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata* x *suaveolens* (Lamiaceae). *Bragantia* 61: 205-218.
- Matkowski A e Piotrowska M, (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia* 77: 346–353.
- McManus JFA, (1948). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 23: 99-108.
- Miguel MG, Matos F, Duarte J, Venâncio F, Moiteiro C, Correia AID, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, (2009). Antioxidant capacity of the essential oils from *Lavandula luisieri*, *L. stoechas* subsp. *lusitanica*, *L. stoechas* subsp. *lusitanica* x *L. luisieri* and *L. viridis* grown in Algarve (Portugal). *J. Essent. Oil Res.* 21: 327-336.
- Morales R (2010) *Lavandula*. Em: Flora Iberica, Real Jardín Botánico CSIC, Madrid.
- Pachkore GL, Dhale DA, Dharasurkar NA, (2011). Antimicrobial and phytochemical screening of *Hyptis suaveolens* (L.Poit) Lamiaceae. *Inter. Mult. Res. J.* 1(4): 01-03.
- Pizzolato TD e Lillie RD, (1973). Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. *J. Histochem. Cytochem.* 21: 56-64.
- Pearse AGE, (1980). *Histochemistry: Theoretical and applied*. 4ª ed. Longman Group Limited.
- Salmaki Y, Zarre S, Jamzad Z, Brauchler C (2009) Trichome micromorphology of Iranian *Strachys* (Lamiaceae) with emphasis on its systematic implication. *Flora* 204: 371-381.
- Pestana MH e Gageiro JN, (2000). *Análise de Dados para Ciências Sociais. A complementaridade do SPSS*. Edições Sílabo, Lisboa, pp. 563.
- Rezakhanl A e Talebi SM, (2010). Trichomes morphology of *stachys lavandulifolia vahl.* (Labiatae) of Iran. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 2: 3755-3763.
- Rivas-Martinez S et al., (1990). De flora ibérica notulae sparsae I. *Itinera Geobot.* 3: 137-138.
- Rodrigues JSC, (2002). Plantas Medicinais, Gráfica de Coimbra, Coimbra.
- Rodrigues L, Monteiro P, Póvoa O, Teixeira G, Moldão M, Figueiredo AC, Monteiro A, (2008) Morphology of secretory structures and essential oil composition in *Mentha cervina* L. from Portugal. *Flavour Fragr. J.* 23: 340–347.
- Rohlf JF, (2000). *NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, Applied Biostatistics Inc., Nova Iorque.
- Sanz J, Soria AC, Garcia-Vallejo MC, (2004). Analysis of Volatile Components of *Lavandula luisieri* L. by Direct Thermal Desorption-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1024: 139-146.

- Schoenwaelder MEA, (2008) The Biology of Phenolic Containing Vesicles. *Algae* 23(3): 163-175.
- Taiz L e Zeiger E, (2002). Plant physiology. 3ª edição. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. pp 283-308.
- Teixeira G e Branco M, (2006). Pólen. Série Didáctica Botânica. Monteiro A. e Moreira I. (Eds.) ISAPress Ed., Lisboa, 66 pp. (ISBN 972-8669-22-4).
- Teixeira G e Correia AI, (2009). Micromorphological studies on *Lavandula luisieri* with emphasis on leaves trichomes. 76-77. Abstracts of the Joint Congress of the Spanish and Portuguese Microscopy Societies. Segovia, Spain, June 16-19, 2009. (M-26778-2009).
- Torras J, Grau MD, López JF, Heras FX, (2007). Analysis of essential oils from chemotypes of *Thymus vulgaris* in Catalonia. *J. Sci. Food Agric.* 87: 2327-2333.
- Trapp SC e Croteau RB, (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* 158: 811-832.
- Tutin *et al.* (1972). Flora Europaea, Cambridge Univ. Press.
- Upson T, (2002). The taxonomy of the genus *Lavandula* L. Em: Lis-Balchin, Maria, Ed. 2002, Lavander, the genus *Lavandula*, Medicinal and Aromatic Plants- Industrial profiles, Taylor & Francis, Londres e Nova Iorque.
- Upson TM, Grayer RJ, Greenham JR, Williams CA, Al-Ghamdi F, Chen FH, (2000). Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 28: 991-1007.
- Vasconcelos JC, (1949). Plantas Mediciniais e aromáticas, Ministério da Economia, Lisboa.
- Vieira RF, Grayer RJ, Paton A, Simon JE, (2001). Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 29: 287-304.
- Wagner H e Blader S, (1996). Plant Drug Analysis. 2ª ed. Springer. Berlin, Alemanha.
- Weker E, Ravid U, Putievsky E, (1985). Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. *Isr. J. Bot.* 34: 31-45.
- Zuarte M, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Dinis AM, Canhoto JM, Salgueiro LR, (2009). Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Lavandula pedunculata* (Miller) Cav. *Chem & biodiv.* 6: 1283-1292.
- Zuarte MR, Dinis AM, Cavaleiro C, Salgueiro LR, Canhoto JM, (2010). Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Ind. Crops Prod.* 32: 580-587.
- Zwenger S e Basu C, (2008). Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnol. Mol. Ver.* 3: 1-7.

## 8. Anexos

---

### 8.1. Estudo micromorfológico – Protocolos

#### Fixação

O material foi fixado numa solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato de sódio (pH 7.0; 1M) durante um mínimo de 3 h, sendo posteriormente feita uma lavagem com o mesmo tampão, durante 24 h, e três lavagens em água, cada uma com 10 min. A fixação foi feita a uma temperatura de 4°C.

#### Desidratação

A desidratação do material vegetal foi efectuada com o auxílio de soluções aquosas de concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70 e 100 %), estando este submergido entre 30 a 60 min. em cada uma.

#### Secagem e metalização

A secagem pelo método do ponto crítico de CO<sub>2</sub> foi efectuada num aparelho *Critical Point Polaron*. Posteriormente procedeu-se à montagem do material em pioneses cobertos com fita adesiva dupla, seguida de metalização com ouro, sob vácuo, num metalizador Jeol JFC-1200.

### 8.2. Estudo Histoquímico – Protocolos

#### Detecção de Polissacáridos totais

##### Ácido Periódico / Reagente de Schiff (P.A.S.) (McManus, 1948)

Ácido periódico a 1%	10 min.
Lavagem rápida em água	
Reagente de Schiff (ao abrigo da luz)	30 min.
Lavagem em metabissulfito de sódio a 0.5%	3 x 2 min.
Lavagem e posterior montagem em água	

**Controlo negativo:** Cortes não tratados com ácido Periódico

**Resultado esperado:** Os polissacáridos coram de rosa vivo

---

**Detecção de Pectinas****Vermelho de Ruténio/ Acetato de Cobre (Johansen, 1940)**

Vermelho de Ruténio, preparado no momento (8 mg em 10 mL de solução aquosa de acetato de cobre a 10%)	1-10 min.
Lavagem em solução aquosa de acetato de cobre a 10%	1-10 min.
Montagem em água	

**Resultado esperado:** As pectinas coram de vermelho

**Detecção de Mucilagens****Ácido Tânico/ Cloreto de Ferro III (Pizzolato e Lillie, 1973)**

Solução aquosa de ácido Tânico a 5%	10-20 min.
Lavagem em água	5-10 min.
Solução aquosa de Tricloreto de Ferro a 3%	10-20 min.
Lavagem em água e posterior montagem em água	

**Controlo negativo:** Cortes previamente tratados com apenas um dos reagentes

**Resultado esperado:** As mucilagens coram de negro-azulado

**Detecção de Lípidos totais****Vermelho de Sudão III (Johansen, 1940)**

Vermelho de Sudão III a 0.3% em etanol a 70%	5-15 min.
Lavagem rápida em etanol 70%	
Lavagem e posterior montagem em água	

**Controlo negativo:** Cortes previamente tratados com  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$  (66:33:4:1), à temperatura ambiente, durante 1h.

**Resultado esperado:** Os lípidos coram de vermelho-laranja.

**Detecção de Lípidos Ácidos e Neutros****Sulfato Azul do Nilo (Ganter e Jollès, 1969, 1970)**

Solução de Sulfato Azul do Nilo a 1% (60°C)	2 min.
Ácido acético a 1%	½ a 2 min.
Lavagem e posterior montagem em água	

**Controlo negativo:** Cortes previamente tratados com  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$  (66:33:4:1), à temperatura ambiente, durante 1h.

**Resultado esperado:** Os lípidos neutros coram de rosa e os ácidos de azul.

### Detecção de Ácidos Gordos

#### Acetato de Cobre/ Ácido Rubeânico (Ganter e Jollès, 1969, 1970)

Solução de acetato de cobre a 0.05%	60 min.
Solução de Na <sub>2</sub> EDTA a 0.1% em tampão fosfato de sódio (0.1M, pH 7.1)	5 min.
Lavagem em água	10 min.
Ácido rubeânico 0.1% em etanol 70%	30 min.
Lavagem em etanol 70%	5 min.
Lavagem rápida e posterior montagem em água	

**Controlo negativo:** Cortes previamente tratados com CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O/HCl (66:33:4:1), à temperatura ambiente, durante 1h.

**Resultado esperado:** Os ácidos gordos coram de verde escuro.

### Detecção de Óleos essenciais e Ácidos resínicos

#### Reagente de Nadi (David e Carde, 1964)

Reagente de Nadi, preparado no momento (ao abrigo da luz)	60-90 min.
Lavagem em tampão fosfato de sódio (0.1M, pH 7.0)	2 min.
Montagem em água	

**Controlo negativo:** Cortes previamente tratados com CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O/HCl (66:33:4:1), à temperatura ambiente, durante 1h.

**Resultado esperado:** Os óleos essenciais coram de azul e os ácidos resínicos coram de vermelho tinto.

### Detecção de Terpenóides com grupo Carbonilo

#### 2,4-Dinitrofenilhidrazina (Ganter e Jollès, 1969, 1970)

Solução saturada de 2,4-dinitrofenilhidrazina em HCl 2N (25°C)	10 min.
Lavagem rápida e posterior montagem em água	

**Controlo negativo:** Cortes previamente tratados com CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O/HCl (66:33:4:1), à temperatura ambiente, durante 1h.

**Resultado esperado:** Os terpenóides com grupo carbonilo coram de vermelho-alaranjado.

**Detecção de Fenóis****Cloreto de Ferro III (Johansen, 1940)**

Solução aquosa de cloreto de Ferro III a 10% 5-10 min.

Lavagem rápida e posterior montagem em água

**Controlo negativo:** Cortes previamente tratados com  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$  (66:33:4:1), à temperatura ambiente, durante 1h.

**Resultado esperado:** Os fenóis coram de negro-acastanhado.

**Detecção de Taninos****Vanilina (Gardner, 1975)**

Solução de vanilina a 0.5% em HCl 5-10 min.

Montagem em HCl a 9%

**Controlo negativo:** Cortes previamente tratados com  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$  (66:33:4:1), à temperatura ambiente, durante 1h.

**Resultado esperado:** Os taninos coram de castanho.

**Detecção de Alcalóides****Reagente de Wagner (Furr e Mahlberg, 1981)**

Reagente de Wagner 5-10 min.

Lavagem rápida em água e montagem em água

**Controlo negativo:** Cortes previamente tratados com ácido tartárico 5% em etanol 95%, durante 48-72 h.

**Resultado esperado:** Os alcalóides coram de castanho avermelhado.

**8.3. Estudo da Fluorescência induzida – Protocolo****Detecção de Flavonóides**

**Reagente de produtos naturais – polietileno glicol (NP/PEG) (= reagente de NEU) (Wagner e Blader 1996)**

10 mL de difenilboriloxietilamina (NP)

8 mL de polietileno glicol-4000 etanólico (PEG)

**Controlo negativo:** Autofluorescência

**Resultado esperado:** É produzida uma fluorescência intensa em UV-365nm. O comportamento da fluorescência é dependente da estrutura.