



2014



## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estruturas secretoras em Medronheiro (*Arbutus unedo* L.):  
caracterização morfológica, estrutural e histoquímica e  
avaliação da atividade proteásica da secreção



Vera Lúcia Almeida Dias

2014





# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Estruturas secretoras em Medronheiro (*Arbutus unedo* L.): caracterização morfológica, estrutural e histoquímica e avaliação da atividade proteásica da secreção

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Augusto Manuel Ferreira Dinis (Universidade de Coimbra)

Vera Lúcia Almeida Dias

2014

Estudo financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, projeto PTDC/AGR-FOR/3746/2012 - *Arbutus unedo* plants and products quality improvement for the agro-forestry sector, com apoio do COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade.

**Apoios:**





*“Segue o teu destino, rega as tuas plantas, ama as tuas rosas, o resto é a sombra de árvores alheias.”*

Fernando Pessoa



## AGRADECIMENTOS

Espero com estas palavras conseguir expressar todo o meu agradecimento a todos os que tanto me apoiaram durante este percurso e ajudaram a concretizá-lo. Com muito orgulho, obrigado!

Aos meus orientadores, Professores Doutores Augusto Dinis e Jorge Canhoto, que sempre estiveram presentes para me ajudar, apoiar e orientar ao longo de todo o trabalho. Pelas sugestões, comentários e análises críticas construtivas, pela paciência durante a revisão de todo o trabalho, expresso os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Lígia Salgueiro, por me dar a oportunidade de experimentar fazer o isolamento dos óleos essenciais, pela simpatia, ensinamentos e conselhos.

À Professora Doutora Paula Veríssimo, do Laboratório de Biotecnologia Molecular, pela simpatia e ajuda nos processos de análise proteásica.

Ao Dr. José Domingos Santos Dias, do Laboratório de Microscopia Eletrónica do Departamento de Botânica, obrigado pela sua disponibilidade, pelos ensinamentos de técnicas laboratoriais e por todos os conselhos.

À Doutora Sandra Correia por me ter ajudado nos testes das proteínas e pela paciência que teve no esclarecimento de pequenas dúvidas.

À D. Eulália Rosa do Laboratório de Cultura de Tecidos e à D. Isabel, por toda a ajuda, simpatia e pelas conversas em momentos mais difíceis.

À D. Fátima, do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia, agradeço a forma atenciosa e amável com que me recebeu e ajudou.

À D. Conceição, da biblioteca do Departamento de Botânica, pela amabilidade e por me auxiliar com a pesquisa bibliográfica.

Ao Sr. José Brazão, por me ajudar com os cortes no micrótomo de corrediça e na Técnica de Mirande.



## AGRADECIMENTOS

À Diana e à Sofia, do Laboratório de Biotecnologia Molecular, pela simpatia e ajuda nos ensaios proteolíticos.

A todas as pessoas do Laboratório de Cultura de Tecidos, à Sara Rodrigues, João Martins, Patrícia Fernandes, Rui Pereira, Elsa Baltazar, Ana Alves, pela boa disposição, bom ambiente, companheirismo, amizade e ajuda, sempre que pedi e precisei.

À Ana Carvalho, a tua companhia no Laboratório de Microscopia tornou os meus dias mais divertidos e menos sós. Sempre me ajudaste e deste “pensamentos positivos”.

À Mónica Zuzarte, agradeço a ajuda com as colorações, a disponibilidade e atenção que me prestaste na extração dos óleos essenciais e, também pelos conselhos na escrita da dissertação.

À minha família, à minha mãe Maria Clara, e ao meu pai Alberto, por todo o amor, apoio e incentivo incondicionais, por se preocuparem comigo e por sempre terem acreditado em mim.

À minha irmã Patrícia, pela curiosidade, pelo interesse no meu trabalho, por achares fascinantes todas as imagens de microscopia e colorações que te mostrei, por me ajudares com a formatação e leres o meu trabalho. Sempre te lembraste de mim, deste palavras de incentivo e apoio. Ao meu cunhado Luís, pela simpatia e por fazeres parte da nossa vida.

Ao meu namorado, António Martins, pela paciência em momentos mais difíceis, pelas ideias interessantes que partilhas comigo, por saber que estarás a meu lado sempre que precisar, por me apoiares em todas as decisões que tomo. Pelo amor e carinho.

A todos vós, mais uma vez um obrigado muito especial, espero que a vida vos sorria sempre e, que sempre, estejam presentes na minha vida.



# ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO TRABALHO.....	3
1.2. <i>Arbutus unedo</i> L.....	4
1.2.1. Taxonomia.....	4
1.2.2. Distribuição Geográfica.....	4
1.2.3. Caracterização Botânica.....	6
1.2.4. Importância Ecológica, Económica e Etnobotânica.....	7
1.2.5. Fitoquímica.....	9
1.2.6. Atividades Biológicas.....	10
1.2.6.1. Atividade Antioxidante das Folhas.....	10
1.2.6.2. Atividade Antimicrobiana das Folhas.....	12
1.3. PROPAGAÇÃO DO MEDRONHEIRO.....	14
1.3.1. Germinação de Sementes.....	14
1.3.2. Cultura <i>in vitro</i> .....	15
1.4. ESTRUTURAS SECRETORAS.....	16
1.4.1. Classificação e Caracterização.....	16
1.4.2. Composição e Funções das Secreções.....	21
1.4.3. Estruturas Secretoras no Género <i>Arbutus</i> .....	23
1.5. OBJETIVOS.....	24
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
2.1. MATERIAL VEGETAL.....	27
2.2. PROPAGAÇÃO DO MEDRONHEIRO.....	27
2.2.1. Germinação de Sementes.....	27
2.2.2. Cultura <i>in vitro</i> .....	28
2.3. ESTUDOS MORFOLÓGICOS E ESTRUTURAIIS.....	29
2.3.1. Microscopia Ótica de Campo Claro (MOC).....	30
2.3.1.1. Material Fixado e Incluído em Resina.....	30
2.3.1.2. Material Corado com Verde Iodo-Carmim.....	31
2.3.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM).....	31

2.4. Determinação do Padrão de Distribuição das Estruturas Secretoras.....	32
2.5. HISTOQUÍMICA.....	32
2.5.1. Detecção de Lípidos Totais.....	33
2.5.2. Detecção Diferencial de Lípidos Ácidos e Neutros.....	33
2.5.3. Detecção de Proteínas.....	34
2.5.4. Detecção de Polissacarídeos.....	34
2.5.5. Detecção de Mucilagens.....	35
2.5.6. Detecção de Pectinas.....	35
2.5.7. Detecção de Fenóis.....	36
2.5.8. Detecção de Flavonóides.....	36
2.5.9. Detecção de Terpenóides (Óleos Essenciais e Oleoresinas).....	36
2.6. ISOLAMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	37
2.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEÁSICA.....	37
2.7.1. Extração de Proteínas e Eletroforese.....	40
2.7.2. Coloração de Géis com Nitrato de Prata.....	41
2.7.3. Zimografia.....	41
2.7.4. Substratos Enzimáticos.....	42
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
3.1. PROPAGAÇÃO DO MEDRONHEIRO.....	45
3.1.1. Germinação de Sementes.....	45
3.1.2. Cultura <i>in vitro</i> .....	46
3.2. ESTRUTURAS SECRETORAS.....	47
3.2.1. Morfologia e Estrutura.....	48
3.2.2. Padrão de Distribuição dos Tricomas.....	51
3.2.3. Caracterização Histoquímica da.....	54
3.3. ISOLAMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	60
3.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEÁSICA.....	60
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
4.1. PROPAGAÇÃO DO MEDRONHEIRO.....	66
4.1.1. Germinação de Sementes.....	66
4.1.2. Cultura <i>in vitro</i> .....	67
4.2. ESTRUTURAS SECRETORAS.....	68
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....</b>	<b>74</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>

## RESUMO

*Arbutus unedo* (medronheiro), da família Ericaceae, apresenta porte arbustivo ou arbóreo, e encontra-se bem adaptado a solos pobres e a condições ambientais extremas. É nativo da bacia do Mediterrâneo e da Europa Ocidental, podendo também ser encontrado na Irlanda. Em Portugal, está espalhado por todo o país, embora seja mais abundante na Região Central e nas Serras do Caldeirão e Monchique (Algarve).

Trata-se de uma espécie importante do ponto de vista ecológico, ajudando a manter a diversidade da fauna e evitando a erosão dos solos. Pode ainda ser utilizada em programas de fitorremediação, fitoestabilização e contribui para a regulação do ciclo do azoto. Economicamente, os frutos podem ser consumidos frescos ou transformados em marmeladas, compotas e conservas. No entanto, a principal fonte de rendimento para os agricultores resulta da produção de uma bebida com elevado teor alcoólico, vulgarmente designada por “Medronheira”. Esta planta pode ainda ser utilizada no fabrico de mel e na indústria floral. Na medicina tradicional, as folhas têm sido utilizadas para fazer infusões, aplicadas no tratamento de diversas patologias e, também, no tratamento de algumas doenças.

*A. unedo* tem sido considerada uma espécie NUC, contudo devido a problemas que afetam as principais espécies florestais em Portugal (pinheiros e eucaliptos), o interesse por esta espécie surgiu e, como consequência, muitas áreas em diferentes regiões do país estão agora a ser cultivadas com medronheiro.

Neste trabalho, foram aplicados dois tipos de propagação, que consistiram na germinação de sementes e na micropropagação através de cultura *in vitro*. Verificou-se que, as baixas taxas de germinação convencionais das sementes podem ser ultrapassadas com períodos mínimos de estratificação de 14 dias, a 4°C, obtendo-se, assim, taxas de germinação mais elevadas, acima dos 50%, dependendo de vários fatores. A multiplicação *in vitro*, através da proliferação de meristemas, provou ser um método eficaz, tendo permitido obter plantas para análise das estruturas secretoras.

Embora a existência de estruturas secretoras tenha sido referida por alguns autores em duas espécies de *Arbutus*, no medronheiro não existia, até à realização deste trabalho, nenhuma investigação aprofundada destas estruturas. Os estudos de microscopia óptica e eletrónica de varrimento e a análise histoquímica, permitiram concluir que a planta apresenta no caule e nas folhas, especialmente quando jovens, emergências glandulares, que são do mesmo tipo nas plantas crescidas *in vivo* e *in vitro*. A análise histoquímica revelou que a secreção produzida por estas emergências é uma

oleorresina com propriedades hidrofílicas, sendo constituída maioritariamente por lípidos, flavonóides e terpenóides. Quanto aos terpenóides, ainda residem dúvidas acerca da sua constituição, principalmente no que diz respeito à sua volatilidade.

Tendo em conta as características do secretado e o facto de se terem encontrado insetos presos nas emergências do medronheiro, realizaram-se diversos ensaios para avaliar a atividade proteásica da secreção. Verificou-se que esta era residual e que, por isso, as emergências glandulares de *A. unedo* deverão estar relacionadas com a proteção contra pequenos insetos, os quais se tem visto, muitas vezes, ficarem aderidos aos caules e folhas jovens. O estatuto de protocarnívora desta planta não é, porém, excluído, devendo ser realizados testes adicionais para o comprovar.

**Palavras-chave:** emergências glandulares; germinação de sementes; micropropagação; microscopia eletrónica de varrimento; oleorresina; zimograma.

## ABSTRACT

*Arbutus unedo* (Strawberry tree) is a shrub or a small tree belonging to the Ericaceae. The species is well adapted to poor soils and extreme environmental conditions. It is native of the Mediterranean basin and Western Europe and can also be found in Ireland. In Portugal, it is spread all over the country, although most abundant in the Central Region and in the Caldeirão and Monchique mountains (Algarve).

Strawberry tree is an important species both from ecological and economic perspectives, helping to maintain the diversity of fauna and preventing soil erosion. It can also be used for phytoremediation and phytostabilization and contributes to the regulation of the nitrogen cycle. Economically, the edible fruits can be consumed fresh or processed as marmalades, jams and preserves. However, the main income for farmers results from the production of a very alcoholic spirit commonly known as “Medronheira”. Honey and fresh cuttings for the floral industry are other uses of the plant. In traditional medicine, the leaves have been used to make infusions, applicable in the treatment of various pathologies and in the treatment of certain diseases, too.

*A. unedo* has been considered a NUC species but due to problems affecting the main forestry species in Portugal (pines and eucalypts) interest in this species has arisen and, as a consequence, many areas in different regions of the country are now being cultivated with strawberry tree. In the present work, propagation of *A. unedo* was achieved through seed germination and *in vitro* culture techniques by the proliferation of axillary meristems. The results showed that the low rates of seed germination can be increased following stratification for 14 days, at 4°C. On these conditions germination rates, over 50% were obtained. The *in vitro* multiplication through shoot proliferation proved to be an effective method for obtaining plants. However, the main purposes of these assays were not strawberry tree propagation but plant production for analysis of the secretory structures.

Previous works have pointed out the presence of secretory structures in two species of *Arbutus*. However, as far as we know, there were no previous studies concerning the characterization of these structures in *A. unedo*. Light and scanning electron microscopic analyses complemented with histochemical tests, showed the presence of glandular emergencies in both leaves and young stems of plants produced *in vitro* and *in vivo*. Histochemical analysis revealed that the secretion produced by these emergencies was an oleoresin with hydrophilic properties being mainly composed by lipids,

terpenoids and flavonoids. The composition of the terpenoids remains unclear, in particular in what concerns the volatile fraction.

Assays to verify proteasic activity of the secretion showed that both leaves and stems possessed proteasic activity, although at low levels. Considering these results, it seems plausible to theorize that the secretory structures of *A. unedo* are likely related to the plant protection against small insects which have been often seen glued to young stems and leaves. The protocarnivorous status of this plant cannot be ruled out, only additional tests can prove it.

**Keywords:** glandular emergencies; micropropagation; oleoresin; scanning electron microscopy; seed germination; zymogram.



# 1. Introdução





## 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho insere-se num programa de investigação mais amplo sobre o medronheiro, que tem sido desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Ecologia Funcional do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, em colaboração com a Escola Superior Agrária de Coimbra, a Escola Superior Agrária de Castelo Branco e o INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária) com financiamento da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e do Proder. Em traços gerais, este programa visa contribuir para um melhor conhecimento desta espécie e das suas potencialidades, aumentando, desta forma, o interesse dos agricultores na sua produção e cultivo e na obtenção de produtos diversificados e de maior qualidade.

Os trabalhos de investigação, que têm sido desenvolvidos desde há cerca de sete anos, têm conduzido a resultados importantes no que toca à seleção, caracterização e propagação de plantas de medronheiro consideradas interessantes para produção. Estes resultados têm sido objeto de publicação (Gomes & Canhoto, 2009; Gomes *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2010 e Gomes *et al.*, 2013) e utilizados na preparação de dissertações de mestrado (Martins, 2012) e doutoramento (Gomes, 2011), bem como de comunicações apresentadas em Reuniões Científicas, como sejam as Jornadas do Medronho, realizadas em 2012, que procuraram juntar diferentes membros da cadeia de valor do Medronheiro, tais como produtores, associações, municípios e o sector de investigação e desenvolvimento, com o intuito de trocar conhecimentos e tecnologias e criar ligações para futuros projetos e investigações. O objetivo principal é produzir mais e com melhor qualidade e diversificar os produtos.

Apesar do trabalho de investigação que tem sido feito, com vista ao melhoramento do medronheiro e à produção de medronho e seus derivados, as estruturas secretoras presentes nas folhas e caule desta planta não foram ainda alvo de estudo. Devido às suas características morfológicas e estruturais e à composição química do seu secretado, estas estruturas são importantes, não só a nível de ciência fundamental, como também em muitas áreas científicas e nas várias indústrias onde estes compostos podem ser aplicados. O presente trabalho incide no estudo das estruturas secretoras do medronheiro e na caracterização do seu secretado.

## 1.2 *Arbutus unedo* L.

### 1.2.1 Taxonomia

O género *Arbutus* pertence à classe Magnoliopsida, ordem Ericales e família Ericaceae, que engloba cerca de 2% da diversidade das eudicotiledóneas (Hammami *et al.*, 2005). Devido à morfologia da flor e do fruto e às suas características anatómicas e fitoquímicas, este género faz parte da sub-família Arbutoideae, em conjunto com os géneros *Arctostaphylos*, *Arctous*, *Comarostaphylis*, *Ornithostaphylos* e *Xylococcus*. Filogeneticamente, esta sub-família está relacionada com as sub-famílias Vaccinioideae e Ericoideae, que incluem, respetivamente, os géneros *Vaccinium* e *Rhododendron*. Devido à sua importância económica, várias espécies destes dois géneros têm sido alvo de programas de melhoramento (Gomes, 2011).

O género *Arbutus* possui cerca de 20 espécies, existindo na região do Mediterrâneo apenas 4 espécies: *Arbutus unedo* e *A. andrachne*, na região este do Mediterrâneo, *A. pavarii*, na costa da Líbia, e *A. canariensis*, nas Ilhas Canárias (Torres *et al.*, 2002). Para além destas, temos ainda *A. menziesii*, espontânea na costa Oeste da América do Norte (Piotto *et al.*, 2001), ocorrendo as restantes espécies no Hemisfério Ocidental, como sejam *A. xalapensis*, *A. texana*, *A. peninsulares*, *A. tessellata*, *A. arizonica*, *A. occidentalis* e *A. madrensis*. Esta última espécie tem uma distribuição Neotropical juntamente com *A. xalapensis*, sendo a mais difundida e variável (Gomes, 2011).

A espécie *A. unedo*, conhecida vulgarmente por medronheiro, pode hibridizar com outras muito semelhantes com as quais cohabita, existindo dois híbridos, *Arbutus x andrachnoides* (*A. unedo* x *A. andrachne*), na região este do Mediterrâneo e *Arbutus x androsterilis* (*A. unedo* x *A. canariensis*), nas Ilhas Canárias (Mereti *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002).

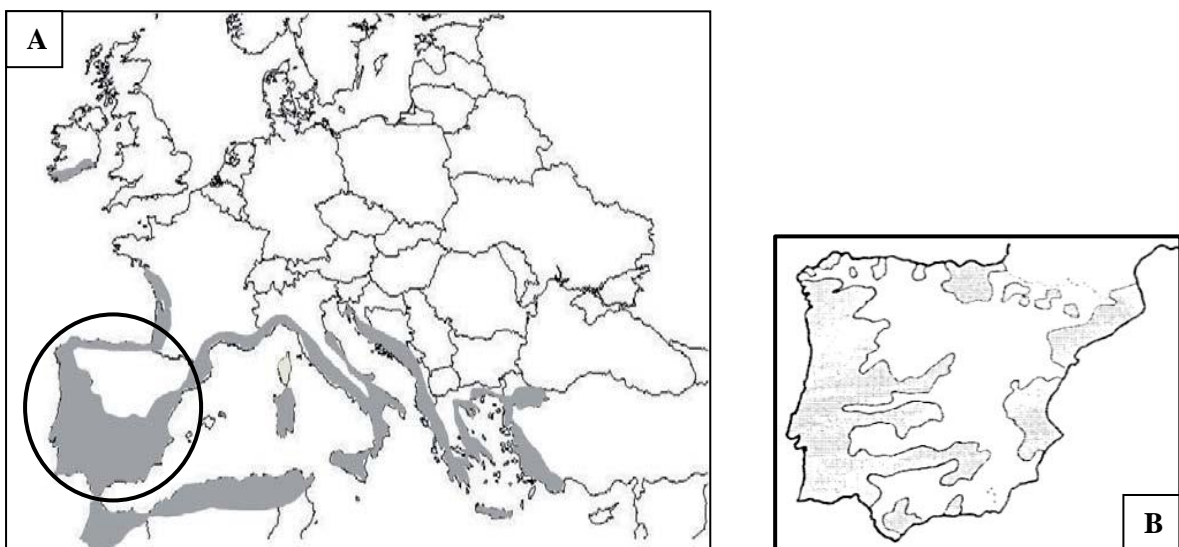
### 1.2.2 Distribuição Geográfica

*Arbutus unedo* é uma espécie nativa da Região Mediterrânica e Europa Ocidental, podendo ainda encontrar-se na Irlanda, no Oeste da França e no Norte de África (Fig. 1), onde cresce espontaneamente em vários países, nomeadamente em zonas rochosas e em solos bem drenados (Torres *et al.*, 2002; Gomes & Canhoto, 2009). Esta espécie cresce tanto em solos ácidos como calcários (pH 5,0-7,2), preferindo

substratos siliciosos ou descarbonificados e ocorrendo, por vezes, até aos 1200m de altitude (Mereti *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002; Godinho-Ferreira *et al.*, 2005; Celikel *et al.*, 2008; Ertekin & Kirdar, 2010).

Em Portugal, encontra-se maioritariamente a Sul do Rio Tejo, na região das Serras do Caldeirão e Monchique (Algarve), podendo, contudo, encontrar-se difundido por todo o país, incluindo Trás-os-Montes (Pedro, 1994), onde cresce associado a comunidades arbustivas ou em florestas de *Quercus* e *Pinus* (Prada & Arizpe, 2008). Deste modo, é uma espécie com ampla distribuição, desde áreas de clima Atlântico, no Norte, até áreas secas e áridas no Sul, ocupando cerca de 15.500 ha (Godinho-Ferreira *et al.*, 2005).

O medronheiro foi uma das poucas espécies que conseguiu sobreviver aos períodos de frio do Quaternário, razão pela qual se adaptou ao clima mediterrânico, tendo, por isso, colonizado vários habitats (Silva, 2007). Esta adaptação é particularmente visível ao nível das folhas, muito embora a atividade fotossintética da planta e a eficiência do uso da água sejam muito reduzidas durante o período de seca (Tenhunen *et al.*, 1982; Gratani & Ghia, 2002). Apesar deste arbusto ter preferência pelo clima mediterrânico onde predomina uma vegetação esclerófila, é possível encontrá-lo noutros locais com diferentes características. Assim, devido à atual distribuição desta espécie, existem autores que a consideram sub-mediterrânea e que, juntamente com outras espécies, como *Coriaria Myrtifolia*, *Phillyrea latifolia* e *Viburnum tinus*, formam um elemento chamado Paleo-Mediterrânico da Península Ibérica, típico de eras passadas, quando existia um clima subtropical (Torres *et al.*, 2002).



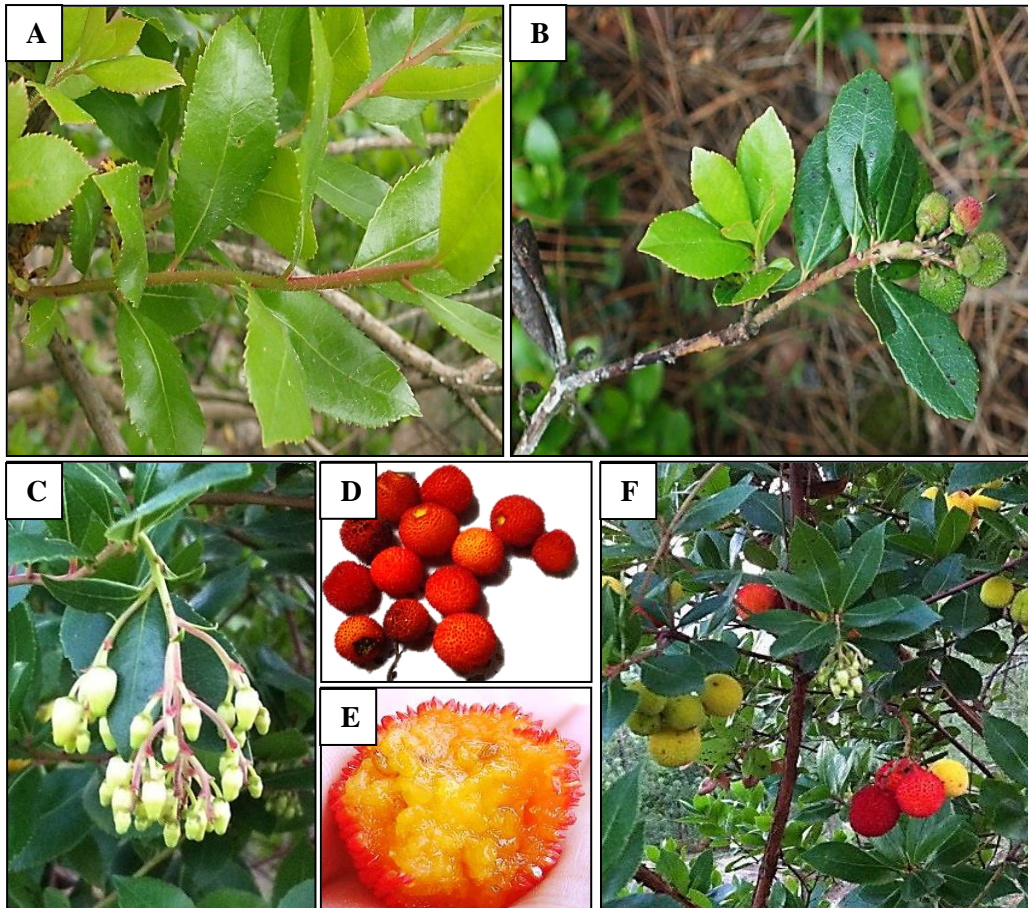
**Figura 1.** (A) Distribuição de *Arbutus unedo* na Bacia Mediterrânica e Costa Atlântica. (adaptado de Oliveira *et al.*, 2011) (B) Pormenor da distribuição na Península Ibérica. (adaptado de Torres *et al.*, 2002)

### 1.2.3 Caracterização Botânica

O medronheiro (Fig. 2A e B) possui porte arbustivo ou arbóreo, com uma altura entre 1,5 e 3 m, apesar de, ocasionalmente atingir 12 m. A sua copa, sempre verde, torna-o uma excelente ornamental. É capaz de suportar temperaturas baixas (até -12°C, Mereti *et al.*, 2002) e é tolerante à seca (Gomes & Canhoto, 2009). As folhas (Fig. 3A e B) são persistentes, simples, alternas, pecioladas, oblunga-lanceoladas, geralmente serradas, de cor verde claro quando jovens e verde escuro intenso quando adultas. Ambas as epidermes consistem de uma camada de células com paredes muito espessas, cobertas por uma cutícula densa. O mesófilo é constituído por duas camadas de células em paliçada, na página adaxial, muito regulares, e por parênquima esponjoso, caracterizado por grandes lacunas, na página abaxial. A planta é muito rica em fenóis que se acumulam nas folhas em grandes quantidades (Rotondi *et al.*, 2003). Geralmente, as folhas são glabras quando adultas, embora algumas espécies, como *A. glandulosa* e *A. tessellata* possuam pêlos glandulares nos pecíolos (Sorensen, 1987), assim como em *A. unedo*. As flores (Fig. 3C) são hermafroditas e têm forma de campânula, dispendo-se em panículas pendentes. A corola é urceolada, com cinco pétalas esbranquiçadas ou ligeiramente rosadas. O fruto (Fig. 3D) é o medronho, uma baga esférica com 2-3 cm de diâmetro, vermelho escuro quando maduro, com polpa amarelada (Fig. 3E) e várias pequenas sementes de tegumento castanho. Demora cerca de um ano a amadurecer, sendo possível encontrar, na mesma árvore, simultaneamente flores e frutos (Fig. 3F).



**Figura 2.** *Arbutus unedo*. (A) No estado selvagem. (B) No Parque de Serralves.



**Figura 3.** *Arbutus unedo*. (A) Ramos com folhas jovens (B) e frutos. (Julho) (C) Conjunto de frutos em desenvolvimento (Janeiro). (D, E) Frutos maduros e respetiva polpa (Novembro). (F) Frutos em diferentes estados de maturação em simultâneo na mesma árvore.

#### 1.2.4 Importância Ecológica, Económica e Etnobotânica

O medronheiro tem um importante papel ecológico, pois ajuda a manter a diversidade da fauna, evita a erosão dos solos, regenera rapidamente após um incêndio e tem a capacidade de crescer em solos pobres (Gomes & Canhoto, 2009).

Segundo alguns autores, pode também ser utilizado em fitorremediação, nomeadamente contra a contaminação por arsénio (Oliveira *et al.*, 2011), e em programas de fitoestabilização de escombrelas, devido ao facto de tolerar quantidades elevadas de metais no solo, apresentando concentrações baixas na parte aérea (Godinho *et al.*, 2010). Recentemente, Abreu *et al.* (2014) concluíram que *A. unedo* pode ser utilizado em programas de fitoestabilização na área das Minas da Panasqueira, por se revelar uma espécie pioneira na colonização de áreas degradadas e por ser uma não acumuladora de elementos residuais tóxicos, uma vez que a concentração destes na parte aérea das plantas não representa uma ameaça para os sistemas biológicos. Os

---

compostos fenólicos, como as galhocatequinas, produzidos pelo medronheiro podem também ser importantes na regulação do ciclo do azoto, um elemento essencial para a nutrição das plantas (Fiorentino *et al.*, 2007). Segundo Castaldi *et al.* (2009), estes metabolitos secundários parecem inibir o processo de nitrificação, bloqueando, assim, as emissões de azoto para a atmosfera.

Os frutos e o néctar das flores têm uma importância considerável nas comunidades agrícolas (Gomes & Canhoto, 2009; Mendes *et al.*, 2011), sendo usados para a produção de licores, aguardentes (Fig. 4A), marmeladas, mel (Fig. 4B), geleias, doces e compotas (Fig. 4C). Segundo infundadas crenças populares, a ingestão dos frutos em grandes quantidades pode causar problemas digestivos e mal-estar geral, supostamente devido ao seu conteúdo em álcool. O restritivo específico *unedo*, que deriva do verbo em latim “edo”, que significa comer, e do numeral *unus*, que significa um só, indica precisamente comer apenas um (González, 2006; Brosse, 2010).

Na medicina tradicional, existe muita informação acerca da utilização das diferentes partes da planta. O medronho, para além dos produtos derivados já referidos, é utilizado como agente antisséptico, diurético e laxativo. A partir das folhas são feitas infusões (Fig. 4D), devido aos efeitos adstringentes, diuréticos, antissépticos urinários, antidiarreicos e depurativos. Recentemente, têm sido usadas também na terapia da hipertensão, diabetes e no tratamento de doenças inflamatórias. Outras partes da planta, como as raízes e a casca, podem também ser usadas no tratamento de desordens gastrointestinais, assim como em problemas urológicos e dermatológicos, utilizando a decocção (Oliveira *et al.*, 2011). Devido à grande quantidade de taninos presentes na casca, esta é também utilizada no curtume de peles (Gomes *et al.*, 2010).

Mais recentemente, o medronheiro tem sido utilizado na floricultura e, como fonte de biomassa, para a produção de energia (Metaxas *et al.*, 2004).

Contudo, apesar da evidente importância desta planta e das suas mais variadas aplicações, continua a ser considerada uma “Neglected or Underutilized Crop” pela Global Facilitation Unit for Underutilized Species, que sublinha a relevância e o potencial desta espécie em vários sectores, como a cosmética e a indústria farmacêutica (<http://www.biodiversityinternational.org/>).





**Figura 4.** Produtos derivados do Medronho. (A) Aguardente. (B) Mel. (C) Compota. (D) Infusão.

(Fontes: <http://confrariadomedronhomonchique.blogspot.pt/2012/12/tiago-laginha-gold-regional-nature.html>;  
[http://www.aljezurswportugal.com/index.php?route=product/product&product\\_id=98](http://www.aljezurswportugal.com/index.php?route=product/product&product_id=98);  
<http://umapedradesal.blogspot.pt/2012/11/medronhos-e-um-passeio.html>; <http://alquimiamistyka.blogspot.pt/2012/03/fitoterapia-modo-de-preparar-os-chas.html>)

### 1.2.5 Fitoquímica

As folhas do Medronheiro possuem diferentes compostos químicos, tais como terpenóides,  $\alpha$ -tocoferol, óleos essenciais e compostos fenólicos. Os principais terpenóides encontrados foram o acetato  $\alpha$ -aminarina, ácido betulínico e lupeol (Gaspar *et al.*, 1997) enquanto o conteúdo em tocoferol mostrou ser muito dependente da altura de colheita das amostras (Kivcak *et al.*, 2001).

Na composição do óleo essencial de *A. unedo* foram caracterizados trinta e sete constituintes, sendo os componentes principais o trans-2-decenal,  $\alpha$ -terpineol, ácido hexadecanóico e o trans-2-undecenal (Kivcak *et al.*, 2001).

A fração fenólica inclui uma grande variedade de compostos, tais como, taninos, flavonóides (galato catequina, miricetina, rutina, afzelina, juglanina, avicularina), glicósidos fenólicos (quercitrina, isoquercitrina, hiperósido) e glucósidos iridóides (Legsseyer *et al.*, 2004; Carcache-Blanco *et al.*, 2006; Males *et al.*, 2006; Sanjust *et al.*, 2008). Os polifenóis foram também já quantificados, tendo sido identificados doze compostos (arbutina, galhato de etilo, arbutina p-hidroxibenzóica, galhoilarbutina, galhocatequina, catequina, canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, quercetina 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, miricetina 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, canferol 3-O- $\beta$ -D-arabinofuranósido, quercetina 3-O- $\beta$ -D-arabinofuranósido e miricetina 3-O- $\beta$ -D-arabinofuranósido) (Fiorentino *et al.*, 2007).

É importante referir também que num estudo em que foi comparado o conteúdo total de fenóis entre as folhas de *A. unedo* e o de outras plantas muito conhecidas e apreciadas pelas suas propriedades, os resultados foram muito semelhantes em todas

elas (Malheiro *et al.*, 2012). Estas plantas, intituladas “frutos vermelhos”, são cada vez mais procuradas para consumo, pela população em geral, por serem saudáveis. Incluem, por exemplo, a amora (*Rubus sp.*), a framboesa (*Rubus idaeus* e *R. occidentalis*), o mirtilo (*Vaccinium angustifolium*) e o morango (*Fragaria x ananassa*). Também Serçe *et al.* (2010), após compararem o conteúdo em fenóis e a capacidade antioxidante de *A. andrachne* com os destes “frutos vermelhos”, concluíram que *A. andrachne* apresentava um dos valores mais altos nestes dois aspetos, sendo o fruto deste, por isso, mais comparável com a amora, arando e mirtilo, que são conhecidos por terem os maiores valores de antioxidantes e conteúdo em fenóis.

Os frutos de *A. unedo* foram também estudados e concluiu-se que na sua composição química existem sacarídeos (sacarose e frutose), proteínas, ácidos gordos (cerca de quinze, estando em maior número os polinsaturados), elementos minerais (potássio, cálcio e fósforo), compostos fenólicos, ácidos orgânicos (fumárico, láctico, málico, subérico, ácido quínico e ácidos cítricos) e fenólicos (ácido gálgico, gentísico, protocatecuico, p-hidroxibenzóico, vanílico e m-anísico), vitaminas (E e C) e carotenóides ( $\beta$ -caroteno). O elevado teor de açúcares (42%), juntamente com o teor em ácidos (8,62%), poderá explicar o sabor agridoce destes frutos. Por outro lado, o sabor adstringente do fruto imaturo poderá ser explicado pelo elevado teor de taninos, visto que os fenóis totais diminuem até à fase madura (Alarcão-e-Silva *et al.*, 2001). A fração fenólica inclui várias classes químicas, como taninos e flavonóides derivados de ácido elágico e de ácido gálgico. A composição da fração volátil foi também analisada, tendo sido encontradas seis classes químicas (álcoois, aldeídos, esterres, norisoprenóides, sesquiterpenos e monoterpenos), perfazendo um total de 41 compostos voláteis, em que os álcoois estão em maior quantidade (Oliveira *et al.*, 2011).

## **1.2.6 Atividades Biológicas**

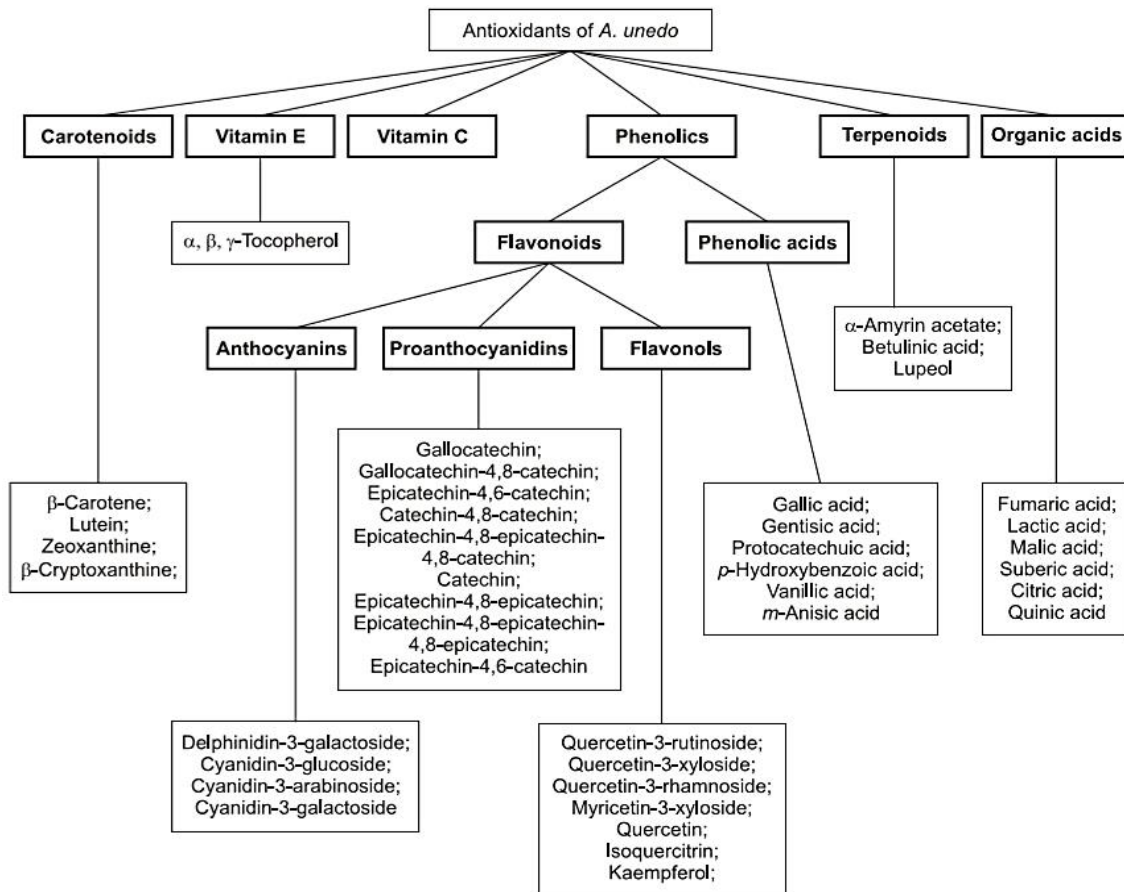
### **1.2.6.1 Atividade Antioxidante das Folhas**

Nos últimos anos, o interesse por produtos naturais tem aumentado, levando a uma vasta pesquisa por compostos bioativos, como os tão conhecidos antioxidantes. A sua importância e potencial aplicação na medicina e nas indústrias farmacêutica, química e alimentar são cada vez maiores.

Muitos dos problemas de saúde nas sociedades industrializadas, tais como doenças cardiovasculares, cancro, diabetes, doenças neurológicas e arteriosclerose,

parecem estar relacionadas com as espécies reativas de oxigénio (ROS), que desempenham um papel importante no aparecimento e prevalência destas doenças. Uma possível forma de prevenir e, eventualmente, diminuir a ocorrência destas doenças é a inclusão de alimentos na dieta da população, que devem conter substâncias naturais com atividade antioxidante. Desta forma, estas substâncias poderão bloquear os radicais livres e, assim, prevenir o stress oxidativo celular (Malheiro *et al.*, 2012). *A. unedo* é uma espécie capaz de nos fornecer estas substâncias (Fig. 5).

Oliveira *et al.* (2009), levaram a cabo estudos sobre a capacidade antioxidante de *A. unedo* através de quatro métodos distintos: o poder redutor sobre o complexo Fe (III)/ferricianeto, o efeito bloqueador de radicais de DPPH (2,2-defenil-1-picrilhidazilo), o efeito sequestrante de radicais superóxido e a quantificação dos fenóis totais. Estes autores mostraram que o teor em fenóis totais era superior nos extratos etanólicos, seguido pelo aquoso, metanólico, e, por fim, dietiléter. O extrato etanólico foi o que apresentou maior poder redutor (EC50 232,7 µg/mL) e efeito bloqueador de radicais de DPPH (EC50 63,2 µg/mL), seguido pelo extrato aquoso (respetivamente, EC50 287,7 µg/mL e 73,7 µg/mL). Quanto ao efeito bloqueador de radicais superóxido, foi nos extratos metanólicos que se obtiveram melhores resultados (EC50 6,9 µg/mL). Mendes *et al.* (2011) e Malheiro *et al.* (2012) obtiveram resultados semelhantes, verificando que tanto o conteúdo fenólico como o poder redutor é claramente superior nas folhas, quando comparados com os obtidos nos frutos. Estes autores avaliaram também o efeito protetor de extratos das folhas e frutos de *A. unedo* através da inibição da hemólise dos eritrócitos e peroxidação de lípidos mediante radicais peroxil. Mais uma vez, o extrato das folhas mostrou ter um efeito protetor superior ao dos frutos. A extensão da peroxidação lipídica foi avaliada através da medição da formação de MDA (malondialdeído), um produto carbonil derivado dos danos da oxidação lipídica. No tratamento com extratos de folhas e frutos na concentração mais elevada, durante 3h, os níveis de MDA reduziram para 61% e 56%, respetivamente, nas células tratadas com AAPH (2,2' – azobis (2-amidinopropano) diidrocloreto), sendo o extracto das folhas, portanto, mais ativo nesta diminuição. Na inibição da peroxidação de lípidos, os valores de EC<sub>50</sub>, definidos como a quantidade de extrato que inibe 50% da peroxidação de lípidos induzida por AAPH, foram respetivamente 0,075±0,014 e 0,732±0,452 mg de extrato/mL para as folhas e frutos, revelando também que nas folhas o poder de inibição é maior.



**Figura 5.** Compostos antioxidantes presentes em *A. unedo* (adaptado de Oliveira *et al.*, 2011).

### 1.2.6.2 Atividade Antimicrobiana das Folhas

O extrato das folhas de *A. unedo* foi já testado contra a atividade de bactérias e fungos, nomeadamente contra bactérias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*), bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e os fungos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Malheiro *et al.*, 2012).

Os valores da concentração mínima inibitória (MIC) para estes microrganismos foram determinados para avaliar o potencial antimicrobiano do extrato das folhas. As bactérias Gram positivas foram mais suscetíveis ao potencial antimicrobiano do extrato, com valores de MIC de 1 mg/mL. A inibição do crescimento foi maior em *B. cereus* e *B. subtilis*, seguido de *S. epidermidis*. Para *P. aeruginosa* e *S. aureus* registaram-se valores de MIC de 2,5 mg/mL, sendo *E. coli* a bactéria mais resistente (MIC de 5 mg/mL). No geral, as bactérias Gram negativas revelaram maior resistência às propriedades do extrato do que as bactérias Gram positivas. Os fungos mostraram-se resistentes a todas as concentrações testadas. Após diversos testes utilizando vários

extratos da planta, estes autores referem que as propriedades antimicrobianas podem estar correlacionadas com os flavonóides.

Testes adicionais com extratos etanólicos das folhas de *A. unedo* contra bactérias Gram positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*), Gram negativas (*E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella typhimurium*) e contra fungos (*C. albicans*), mostraram que estes extratos têm a capacidade de inibir o crescimento de todas as bactérias referidas (Oliveira *et al.*, 2011). Orak *et al.* (2011) mostraram também que as folhas de *A. unedo* exibem atividade antibacteriana contra *S. aureus*, mas não revelam efeito inibitório contra *E. coli* e *Salmonella enteritidis*. Para além disso, mostraram que as folhas tinham efeito antifúngico contra dois fungos aflatoxigénicos, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 e NRRL 465.

*Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado que geralmente causa doenças sexualmente transmissíveis. Apesar de ser tratado com medicamentos (5-nitroimidazole), este microorganismo revela-se cada vez mais resistente, sendo necessárias novas alternativas. Num estudo em que se testaram, *in vitro*, extratos etanólicos, aquosos, de acetato de hexano e de etilacetato das folhas de *A. unedo* contra este protozoário, o extrato de etilacetato foi o mais efetivo, com uma taxa de inibição de crescimento (Growth Inhibition rate-GI) de 100%, na concentração de 500µg/ml (Ertabaklar *et al.*, 2009).

Kivcak *et al.* 2009 testaram, *in vitro*, diferentes extratos das folhas de *A. unedo* (etanólico, aquoso e n-hexano) contra a leishmaniose, provocada por protozoários do género *Leishmania*, parasitas unicelulares transmitidos, maioritariamente, através de uma picada de mosquito. Causam graves infeções cutâneas e podem afetar tanto humanos como animais, dependendo muito da localização geográfica. De entre os extratos testados, o etanólico (concentração de 100, 250, 500 µg/ml), mostrou ser o mais efetivo, o que levou estes autores a inferir que este extrato poderá ser, futuramente, um agente promissor contra esta doença.

## 1.3 PROPAGAÇÃO DO MEDRONHEIRO

### 1.3.1 Germinação de Sementes

Uma semente, em estado de dormência, pode não germinar mesmo quando as condições ambientais são favoráveis. A inibição da germinação pode dever-se à dureza e impermeabilidade do tegumento, à “dormência do embrião”, ou a ambos os fatores. A regulação da germinação das sementes é controlada através de interações hormonais, sendo estas responsáveis pela dormência do embrião. Normalmente, isto acontece devido a desordens no balanço entre substâncias que causam inibição e substâncias que causam o crescimento do embrião (Smiris *et al.*, 2006).

Na natureza, alguns fatores como as secas, mudanças de temperatura, a passagem pelo trato digestivo de animais e a atividade de bactérias e fungos, podem resultar na permeabilidade do tegumento, pelo que a absorção de água e oxigênio é facilitada. Artificialmente, isto pode ser conseguido através da escarificação do tegumento, pelo tratamento com ácido sulfúrico concentrado ou com água quente, pela estratificação, pelo fotoperíodo ou pela aplicação de reguladores de crescimento (Tilki, 2004; Demirsoy *et al.*, 2010; Ertekin & Kirdar, 2010).

As sementes de *A. unedo* têm uma taxa de germinação muito baixa, que ronda os 4,2%. Este facto deve-se à presença de algumas substâncias inibitórias difundidas pelo fruto que provocam o estado de dormência (Ertekin & Kirdar, 2010). Deste modo, o medronheiro é difícil de propagar através de semente, sendo a dormência do embrião o principal fator responsável pela baixa taxa de germinação. É necessário, portanto, recorrer a métodos que permitam quebrar este estado.

No género *Arbutus*, o ácido abscísico (ABA) tem um papel importante na inibição da germinação das sementes, enquanto as giberelinas (GAs), que promovem a germinação, parecem ser as substâncias de crescimento endógenas mais importantes (Smiris *et al.*, 2006). Alguns autores sugerem que a taxa de germinação aumenta com a concentração de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e que, em todos os genótipos testados, a crescente duração da estratificação a baixas temperaturas faz aumentar a taxa de germinação (Demirsoy *et al.*, 2010). Crê-se que o efeito promotor de GA<sub>3</sub> se deva à mobilização das reservas armazenadas e ao rápido desaparecimento do ABA e polipeptídeos inibidores, que existem em abundância em sementes no estado de dormência. Outros reguladores de crescimento foram também aplicados para quebrar

este estado, tais como citocininas (benziladenina) e poliestimulinas, e em todos os tratamentos efetuados as taxas de germinação aumentaram (Ertekin & Kirdar, 2010).

Recorrendo ao método de estratificação, Demirsoy *et al.*, (2010) obtiveram resultados interessantes. Em *A. andrachne*, 12 e 16 semanas de estratificação resultaram em 86% e 87% de germinação, respetivamente. Em *A. menziesii*, após 40 dias de estratificação foi possível obter uma taxa de germinação de 87%, sendo que as sementes que não sofreram este tratamento tiveram uma taxa de germinação de apenas 2%. Em *A. unedo* verificou-se a inexistência de uma diferença significativa na percentagem de germinação entre as 9 (86%) e 16 (84%) semanas de estratificação.

### **1.3.2 Cultura *in vitro***

As técnicas de micropropagação *in vitro* são usadas quando se pretende melhorar uma espécie e como uma alternativa aos métodos convencionais, quando estes falham. São particularmente importantes quando o objetivo é a manutenção de um determinado genótipo de interesse nas plantas propagadas (Canhoto, 2010; Gomes, 2011).

Estas técnicas baseiam-se na totipotência das células vegetais, que possibilita estabelecer e manter, em laboratório, as várias partes constituintes de uma planta, como sejam células, tecidos ou órgãos. Uma das grandes vantagens destas técnicas é a obtenção de um elevado número de plantas a partir de um único indivíduo. Para além disso, é necessária apenas uma pequena quantidade de material e espaço e a produção pode manter-se uniforme ao longo do ano (inexistência de sazonalidade). Outras vantagens são o armazenamento de material por longos períodos de tempo (conservação de espécies) e o facto de todo o processo ser realizado em condições assépticas e controladas, garantindo assim a qualidade fitossanitária das plantas obtidas (Chawla, 2010; Gomes, 2011). Há, contudo, que ter em conta algumas desvantagens, como sejam a ocorrência de variação somaclonal e a vitrificação (Chawla, 2010).

Em *A. unedo*, tal como acontece noutras espécies, a propagação através de semente não é sinónimo de estabilidade genética, pelo que algumas características de interesse podem ser perdidas. Através de métodos convencionais, como o enraizamento de estacas, podem ser feitos ensaios de propagação vegetativa, sendo estes métodos mais morosos e menos eficientes que os métodos de micropropagação, que se revelam uma alternativa mais viável (Canhoto, 2010; Gomes, 2011). Algumas técnicas de micropropagação, como a embriogénese somática, organogénese e proliferação de meristemas axilares, foram já aplicadas na propagação *in vitro* de plantas lenhosas,

---

sendo esta última técnica a mais usada na propagação de Ericáceas (Gomes & Canhoto, 2009). O medronheiro foi já propagado através deste método, quer a partir de material jovem, quer a partir de material adulto, tendo-se, neste caso, obtido melhores resultados, devido ao conhecimento do genótipo. Outros membros desta família, tais como *Arbutus xalapensis*, *Kalmia latifolia*, *Oxydendrum arboreum*, *Rhododendron*, e algumas espécies do género *Vaccinium*, foram também já micropropagadas (Gomes & Canhoto, 2009).

## 1.4 ESTRUTURAS SECRETORAS

### 1.4.1 Classificação e Caracterização

Todas as partes de uma planta podem conter estruturas secretoras, quer na superfície dos órgãos vegetais (estruturas secretoras externas), quer no interior de tecidos vegetais (estruturas secretoras internas). Estas estruturas, constituídas por células especializadas na síntese e/ou acumulação e eliminação de variadas secreções, podem encontrar-se em raízes, caules, folhas, brácteas, sépalas, pétalas, estames, gineceu, sementes e frutos, variando as suas funções consoante a sua localização na planta (Bruneton, 1991; Hallahan & Gray, 2000). Este facto, aliado à grande diversidade das estruturas secretoras em termos morfológicos, estruturais, ontogénicos, de composição química do secretado e modo de secreção, entre outros, torna a sua classificação muito difícil e, por vezes, controversa (Hallahan & Gray, 2000). Na verdade, diferentes autores utilizam, por vezes, a mesma terminologia para estruturas distintas ou diferentes terminologias para o mesmo tipo de estrutura. Ainda assim, a grande diversidade das estruturas secretoras torna-as um importante carater taxonómico devido, especialmente, à constância das suas características nos taxa em que ocorrem. Neste trabalho, seguir-se-á, maioritariamente, a terminologia descrita por Ascensão (2007).

De um modo geral, as estruturas secretoras internas (Fig. 6A,B) incluem os idioblastos, laticíferos, cavidades ou bolsas secretoras e canais ou ductos secretores.

Os idioblastos (Fig. 6B) são, maioritariamente, células hipertrofiadas, maiores do que as células adjacentes, que ocorrem isoladas e contêm taninos, mucilagem, óleos essenciais, resinas ou uma mistura de todos estes secretados (Evert, 2006; Ascensão, 2007). Os idioblastos de mucilagem possuem geralmente típicas paredes celulares



---

celulósica-pécticas, enquanto os idioblastos de óleos têm na sua constituição uma camada de suberina, que compartimenta a secreção protegendo, assim, as células adjacentes de compostos tóxicos (Ascensão, 2007).

Os laticíferos estão envolvidos na produção de látex e consistem ou de uma fileira de células que se fundem entre si ou de uma célula individual, muito alongada. Assim, podem ser articulados ou não articulados e, ao acompanharem frequentemente o tecido vascular, ocorrem associados aos tubos floémicos ou aos raios xilémicos (Evert, 2006; Fahn, 1979; Ascensão, 2007).

As cavidades ou bolsas secretoras são mais ou menos esféricas e resultam do afastamento de células de parênquima, ao longo da lamela média, ou da desintegração destas células. Na sua constituição têm geralmente uma camada epitelial secretora, que rodeia uma cavidade central ou lúmen onde o secretado é lançado. Nalguns casos, porém, são preenchidas por células de parede fina, que também produzem e armazenam o secretado. Este, tem composição química variável, consistindo geralmente de material resinífero, mucilaginoso ou óleos essenciais. (Fahn, 1990; Hallahan & Gray, 2000; Svoboda *et al.*, 2000).

Os canais ou ductos secretores (Fig. 6A) são constituídos por cavidades alongadas, que podem ramificar-se e formar uma rede complexa desde o caule até às folhas, flores e frutos. Tal como as bolsas secretoras, o secretado dos canais secretores possui também composição química variável, possuindo algumas famílias de plantas simultaneamente bolsas e canais (Evert, 2006; Fahn, 1990; Hallahan & Gray, 2000; Ascensão, 2007)

As estruturas secretoras externas (Fig. 6C-N) são bastante mais variadas que as internas e incluem, entre outros, hidátodos, osmóforos, nectários e os genericamente designados pêlos ou tricomas e emergências, muito embora alguns autores considerem os hidátodos, nectários e emergências como estruturas tricomas (Fahn, 1979; Hallahan & Gray, 2000).

Hidátodos são estruturas envolvidas na secreção de água, ou soluções aquosas de solutos orgânicos e inorgânicos, através de um processo designado por gutação (Evert, 2006; Castro & Machado, 2006).

Os osmóforos são áreas do tecido floral com células secretoras estruturalmente diferentes das células adjacentes e que produzem e libertam compostos voláteis associados ou não à atração de polinizadores (Endress, 1994; Wiemer *et al.*, 2009).

---

No que diz respeito aos nectários (Fig. 6C), tratam-se de glândulas produtoras de uma secreção açucarada, chamada néctar. Podem ser unicelulares ou multicelulares e florais, quando presentes nos órgãos reprodutivos e envolvidos diretamente na atração de polinizadores, ou extraflorais, quando presentes nas peças florais estéreis e/ou nos órgãos vegetativos e não estão associados diretamente à polinização (Fahn 1979, Hallahan & Gray, 2000; Paccini *et al.*, 2003; Nicolson *et al.*, 2007).

Tricomas são, por definição, projeções epidérmicas presentes nos diversos órgãos das plantas, constituindo o seu indumento. A grande diversidade destas estruturas faz com que a sua classificação não seja fácil, pelo que a maior distinção é entre tricomas glandulares ou secretores e tricomas não glandulares ou de revestimento (Hallahan & Gray, 2000).

Os tricomas de revestimento (Fig. 6D) podem ser unicelulares ou pluricelulares, unisseriados ou multisseriados, simples ou ramificados, com as ramificações de vários tamanhos, iguais ou não entre si e dispostas num único plano (horizontal e vertical) ou em várias camadas, como um tufo. Atendendo à sua morfologia e constituição, são muitas vezes designados filamentosos, dendríticos, estrelados, entre outros (Hallahan & Gray, 2000; Ascensão, 2007).

Por sua vez, os tricomas glandulares (Fig. 6C), distinguem-se dos tricomas de revestimento por apresentarem células que sintetizam e/ou libertam produtos de secreção, de aspeto denso ou hialino. Tal como os tricomas não glandulares, podem ser unicelulares ou, mais frequentemente, pluricelulares, unisseriados ou multisseriados e com formas, dimensões e tipo e modo de secreção muito variadas. Segundo Ascensão (2007), a classificação destes tricomas deve ser baseada na interação de vários fatores, sendo a característica principal o tipo de produtos secretados ou absorvidos, os quais podem ser identificados através de testes histoquímicos.

Embora não exista uma classificação totalmente satisfatória, os tricomas glandulares pluricelulares são normalmente distinguidos em peltados e capitados. Os primeiros (Fig. 6E) são formados por uma célula basal, um pedículo curto e uma cabeça com células secretoras organizadas de modo diverso. Os tricomas capitados (Fig. 6F) são constituídos por uma célula basal, um pedículo uni ou pluricelular, longo ou curto, mas sempre maior que metade da altura da cabeça, sendo esta formada por uma ou duas células (Werker *et al.*, 1985; Abu-Asab & Cantino, 1987; Hallahan & Gray, 2000; Ascensão, 2007).

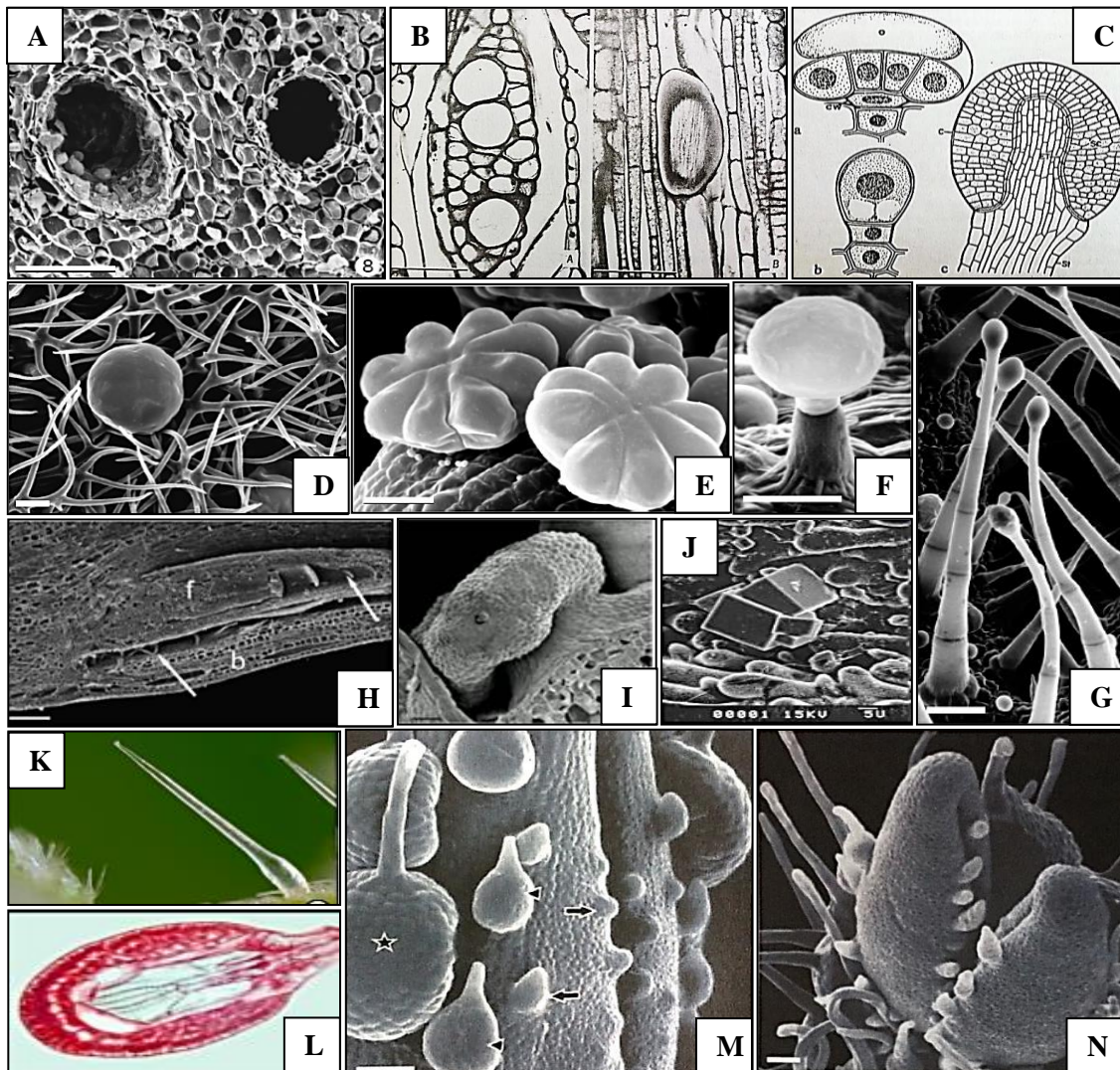
As emergências (Fig. 6H) são muito semelhantes aos tricomas glandulares, ambos com uma ampla distribuição nas angiospérmicas. No entanto, enquanto os tricomas têm origem em células da protoderme, na ontogenia das emergências estão envolvidas, para além de células epidérmicas, células de tecidos subjacentes, parênquima ou mesmo tecidos condutores. Deste modo, sem estudos ontogénicos torna-se difícil distinguir entre estes dois tipos de estruturas, sendo, por isso, muitas vezes as emergências designadas como tricomas (Uphof, 1962; Hallahan & Gray, 2000; Ascensão, 2007).

Os coléteres (Fig. 6H) são apêndices ou emergências pluricelulares, sésseis ou pediculados, formados por tecido epidérmico e subepidérmico, que secretam uma mistura de mucilagem e terpenos de consistência pegajosa (Fahn, 1979). São comuns nas escamas das gemas de muitas plantas lenhosas (por exemplo, *Aesculus*, *Betula*, *Carya*, *Malus*) e em folhas jovens. Esta secreção parece proteger os órgãos vegetativos e reprodutivos em diferenciação contra a dessecação, atuando a porção lipofílica como dissuasor contra microorganismos (Demarco, 2005).

As glândulas de sal (Fig. 6J), presentes em folhas de espécies halófitas, secretam o excesso de sal sob a forma de soluções salinas que podem variar na sua composição e, também substâncias orgânicas (Waisel, 1972; Hagermeyer & Waisel, 1988). Possuem uma espécie de cabeça unicelular ou multicelular, composta de células que produzem a secreção e que estão situadas na extremidade de um pedúnculo de células não glandulares. Alguns exemplos são *Monarda fistulosa* (Lamiaceae), *Atriplex* e *Phillyrea latifolia* (Hallahan & Gray, 2000).

Em espécies das famílias Euphorbiaceae, Hydrophyllaceae, Loasaceae e Urticaceae estão presentes tricomas urticantes (Fig. 6K), que produzem uma secreção que provoca reações alérgicas e dor. O tricoma consiste, neste caso, de uma única célula, bolbosa na base e gradualmente afilada em direção ao ápice, de modo que a região entre a base e o ápice assume o aspeto de um fino tubo capilar (Castro & Machado, 2006).

Nas folhas das plantas carnívoras, particularmente em *Dionaea* (Fig. 6L), *Drosophyllum*, *Pinguicula* e *Nepenthes*, para além de nectários e tricomas secretores de mucilagem, encontram-se um tipo particular de tricomas, que são glândulas digestivas, produtoras de enzimas digestivas. Em *Drosera*, estas enzimas são produzidas por emergências vascularizadas (Castro & Machado, 2006).



**Figura 6.** Exemplos de estruturas secretoras. (A, B) Estruturas secretoras internas. (A) Seção transversal de canais secretores do caule de *Tapirira guianensis*. Barra = 100 $\mu$ m (adaptado de Ascensão, 2007). (B) Células do floema contendo óleos, na árvore da tulipa (*Liriodendron*). Do lado direito, um idioblasto contendo mucilagem, no floema de *Hydrangea paniculata*. Barras = 0,1mm (adaptado de Esau, 1977). (C-N) Estruturas secretoras externas. (C) Esquemas de tricomas secretores de material lipofílico (adaptado de (Hallahan & Gray, 2000). (D) Tricoma peltado, rodeado de tricomas não secretores, em *P. madagascariensis*. (E) Tricomas peltados na superfície externa da corola de *Plectrathus madagascariensis*. (F) Tricoma capitado de pedículo longo, em fase secretora, na folha de *P. ornatos*. (G) Tricomas elipsoidais de *P. laxiflorus*. Barras = 25 $\mu$ m (adaptado de Ascensão, 2007). (H) Coléteres/emergências nas brácteas de *Oncidium flexuosum*. Barra = 200 $\mu$ m (adaptado de Mayer *et al*, 2011). (I) Nectário floral de *Phyllanthus acidus*. Barra = 50 $\mu$ m. (J) Glândulas de sal e cristais na lâmina foliar de *Distichlis spicata*. (K) Tricoma glandular de *Urtica dióica*. (L) Estrutura de um tricoma glandular de *Drosera* sp. (adaptado de Cardoso, 2011) (M) Porção de um primórdio foliar mostrando diferentes estados ontogénicos de tricomas produtores de oleoresinas. (N) Tricomas glandulares, num primórdio foliar, em diferentes estados precoces de desenvolvimento. Barras = 100 $\mu$ m (adaptado de Meira *et al*, 2014).

### 1.4.2 Composição e Funções das Secreções

As plantas produzem uma enorme variedade de secreções. Em alguns secretados está presente uma grande variabilidade de produtos biossintetizados, tais como proteínas, lípidos (Fig. 6C), polissacarídeos, sais (Fig. 6J), óleos essenciais, resinas (Fig. 6M), fenóis, mucilagens e pectinas, sendo estes secretados característicos de algumas famílias, tais como Asteraceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Plumbaginaceae, Rubiaceae, Solanaceae e Verbenaceae (Hallahan & Gray, 2000; Ascensão, 2007). Muitos destes compostos são biologicamente ativos, tendo um papel importante no sucesso evolutivo das espécies onde ocorrem.

De entre estes compostos, os óleos essenciais têm um especial interesse do ponto de vista económico, pois podem ser aplicados nas mais diversas indústrias, como farmacêutica, alimentar, cosmética, agricultura, na apicultura e na criação animal (Proença da Cunha, 2007). Os óleos essenciais são metabolitos secundários de baixo peso molecular, voláteis e com propriedades odoríferas característicos das plantas aromáticas (Kisser, 1958; Sangwan *et al.*, 2001). São compostos maioritariamente por terpenóides (Sangwan *et al.*, 2001), sendo os monoterpenos e os sesquiterpenos os mais frequentes (Proença da Cunha *et al.*, 2005). Na maioria das vezes, localizam-se em tricomas glandulares (secretores), tendo a correlação entre a presença de tricomas glandulares e a acumulação de óleos essenciais sido logo referida nas primeiras investigações sobre a anatomia das plantas (Uphof, 1962). Estes compostos têm um papel importante nas interações das plantas com o meio que as envolve (Paiva, 2000; Harborne, 2001; Gang, 2005), nomeadamente na regulação do seu balanço hídrico (Proença da Cunha *et al.*, 2005). De todas as ações biológicas, as atividades antibacteriana e antifúngica são as que mais frequentemente têm sido atribuídas aos óleos essenciais (Milhau *et al.*, 1997; Dadalioglu e Evrendilek, 2004). Mais recentemente, Edris, (2007) refere que eles têm potencial farmacêutico e terapêutico, na prevenção e supressão de cancro, em doenças cardiovasculares e na aromoterapia. No entanto, deve garantir-se sempre a segurança de quem os utiliza e a eficácia deve ser demonstrada através de estudos analíticos (Tisserand & Balacs, 1995). Tanto a produção de óleos essenciais como de resinas pelos tricomas glandulares é característica de diversas famílias, como as *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Verbenaceae*, *Rubiaceae*, *Geraniaceae*, *Solanaceae* e *Plumbaginaceae* (Metcalf & Chalk, 1983). As resinas são constituídas por uma mistura de terpenos voláteis e não-voláteis (Goodwin & Mercer,

1983; Hallahan & Gray, 2000). Segundo Voigt & Gorb (2010), em *Roridula*, estas resinas são misturas de diversos compostos tais como, terpenóides, ácidos gordos e flavonóides, usualmente produzidos por glândulas especializadas situadas na superfície dos tecidos. Referiram também que, estas são usualmente encontradas em folhas de plantas que crescem em regiões semi-áridas.

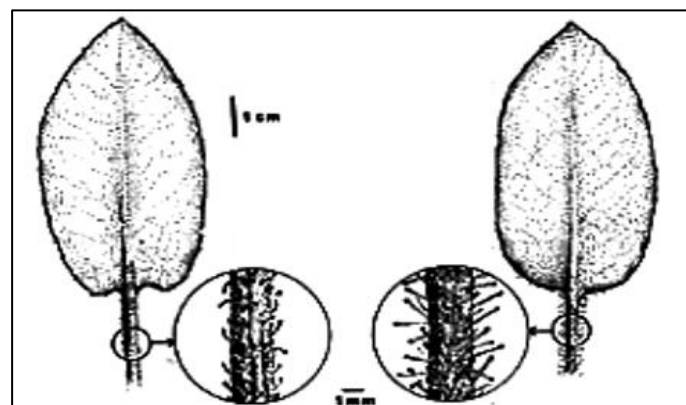
O material sintetizado pelas células secretoras pode permanecer dentro do protoplasto destas células ou ser libertado para o espaço subcuticular, que se forma por distensão da cutícula (Ascensão & Pais, 1987; Ascensão *et al.*, 1995; Ascensão *et al.*, 1997; Ascensão & Pais, 1998; Ascensão *et al.*, 1999). Mais tarde, a cutícula rompe-se e a secreção é eliminada. Aparentemente, em algumas espécies este processo pode ocorrer apenas uma vez ou, então, a cutícula pode regenerar, repetindo-se a acumulação subcuticular (Evert, 2006). A eliminação da secreção do espaço sub-cuticular ocorre por poros cuticulares ou por rutura da cutícula. A rutura da cutícula pode ser um processo espontâneo, devido à pressão do secretado, ou pode ser provocada por fatores abióticos (aumento da temperatura) ou bióticos (herbívoros ou insectos) (Fahn, 1988; Ascensão *et al.*, 1999). Concluída a fase de secreção, as células glandulares sofrem geralmente degenerescência, levando ao colapso da cabeça glandular do tricoma e à sua perda de funcionalidade (Croteau, 1988; Ascensão, 2007).

Os tricomas glandulares encontram-se predominantemente em órgãos jovens em pleno crescimento (Fig. 6N) podendo persistir durante toda a vida da planta, apenas uma parte ou cair precocemente. Em algumas espécies, a sua frequência (número por unidade de superfície) parece ser constante, o que implica a sua produção contínua. Na maioria das espécies, porém, a frequência decresce com a idade do órgão, sendo o número final de tricomas estabelecido numa fase precoce do seu desenvolvimento, o que leva a crer que estes têm uma função protetora nas fases iniciais de desenvolvimento (Ascensão & Pais, 1987; Ascensão *et al.*, 1998; Ascensão *et al.*, 2001). Os tricomas apresentam diversas funções (Hallahan & Gray, 2000), tais como proteção contra fatores externos, como por exemplo a herbivoria, agentes patogénicos (Levin, 1973), luminosidade excessiva, temperaturas extremas e perda excessiva de água (transpiração). Para além disso, estão também relacionados com a alelopatia, absorção de água, secreção de sal, e podem também funcionar como tricomas atrativos em plantas insectívoras e para a polinização (Fahn, 1979; Juniper *et al.*, 1989; Owen & Thompson, 1991).

Nas plantas insetívoras, as glândulas digestivas secretam enzimas que digerem o corpo dos insetos capturados. De entre as enzimas já identificadas, as esterases, fosfatases ácidas e proteases estão em maior quantidade comparativamente às peroxidases, amilases, lípases e invertases. Estudos autorradiográficos revelaram que as células secretoras das glândulas digestivas reabsorvem e reintegram os produtos do material digerido (insetos) no metabolismo da planta, fornecendo assim as quantidades de minerais, nomeadamente fosfato e azoto, elementos vestigiais e carbono orgânico necessárias à planta (Castro & Machado, 2006; Ellison, 2006; Adlassing *et al.*, 2009; Sirova *et al.*, 2010).

### 1.4.3 Estruturas Secretoras no Género *Arbutus*

Os estudos respeitantes às estruturas secretoras no género *Arbutus* são muito escassos. Nos pecíolos das folhas de *A. glandulosa* e *A. tessellata*, Sorensen (1987) verificou a presença de pêlos glandulares (Fig. 7), salientando que estes apresentam variações nas duas espécies, nomeadamente em termos de comprimento, sendo maiores em *A. tessellata*. Contudo, o estudo visou apenas a taxonomia, não estabelecendo o autor qualquer ligação com a produção de substâncias de secreção. Também Becerra & Ezcurra, (1986), num estudo sobre a relação dos pêlos glandulares nas folhas, pecíolo e ramos de *A. glandulosa* com a herbivoria e os limites morfológicos difusos entre *A. glandulosa* e *A. xalapensis*, verificaram que este tipo de pêlos é a característica mais comum utilizada para distinguir as duas espécies. Para além disso, concluíram que as espécies glabras são mais sensíveis à herbivoria, nomeadamente perante a larva *Eucheira socialis*. Em *A. unedo*, tanto quanto sabemos, não existem estudos sobre as estruturas secretoras. No entanto, como já antes referido, Kivcak *et al.*, (2001) isolaram e analisaram a composição do óleo essencial desta espécie, com exemplares provenientes da Turquia, o que infere a presença de estruturas secretoras, embora neste estudo elas não tenham sido referidas.



**Figura 7.** Pêlos glandulares em *Arbutus glandulosa* (A) e *Arbutus tessellata* (B) (adaptado de Sorensen, 1987).

## 1.5 OBJETIVOS

Por tudo o que já foi referido, o medronheiro, até agora considerado uma espécie NUC, tem-se revelado cada vez mais com grandes potencialidades (Gomes & Canhoto, 2009). Assim, nos últimos anos tem sido feita intensa investigação nesta espécie, com vista ao seu melhoramento e à produção de medronho de qualidade. O conhecimento das suas estruturas secretoras, porém, é escasso, ou mesmo nulo, apesar do potencial interesse económico de muitos dos compostos químicos presentes no secretado. Deste modo, o principal objetivo deste trabalho incidiu na caracterização das estruturas secretoras de medronheiro. Para atingir esse objetivo, este trabalho focou os seguintes aspectos:

- caracterização morfológica e estrutural das estruturas secretoras de *Arbutus unedo*;
- comparação das estruturas secretoras presentes nas plantas crescidas *in vitro* e *in vivo*;
- determinação do padrão de distribuição das estruturas secretoras consoante os diversos estádios de desenvolvimento numa mesma planta;
- caracterização histoquímica dos principais grupos de compostos químicos presentes no secretado;
- isolamento e análise química dos eventuais óleos essenciais presentes nas estruturas secretoras;
- extracção e quantificação das proteínas existentes no secretado;
- avaliação da atividade proteásica da secreção.



## 2. Materiais e Métodos





## 2.1 MATERIAL VEGETAL

Neste trabalho foram utilizados ramos de medronheiros crescidos no campo, em Oliveira do Hospital e em Coimbra, bem como ramos de medronheiros obtidos através da germinação de sementes. Foram também utilizados clones de medronheiro, C21904FS, estabelecidos previamente *in vitro*, em meio sólido, e plantas previamente estabelecidas em meio líquido\*, correspondentes ao clone P, para cultura *in vitro*. Para todos os ensaios, foi sempre utilizado material fresco, nomeadamente primórdios foliares, folhas e caules das plantas crescidas *in vitro* e *in vivo*.

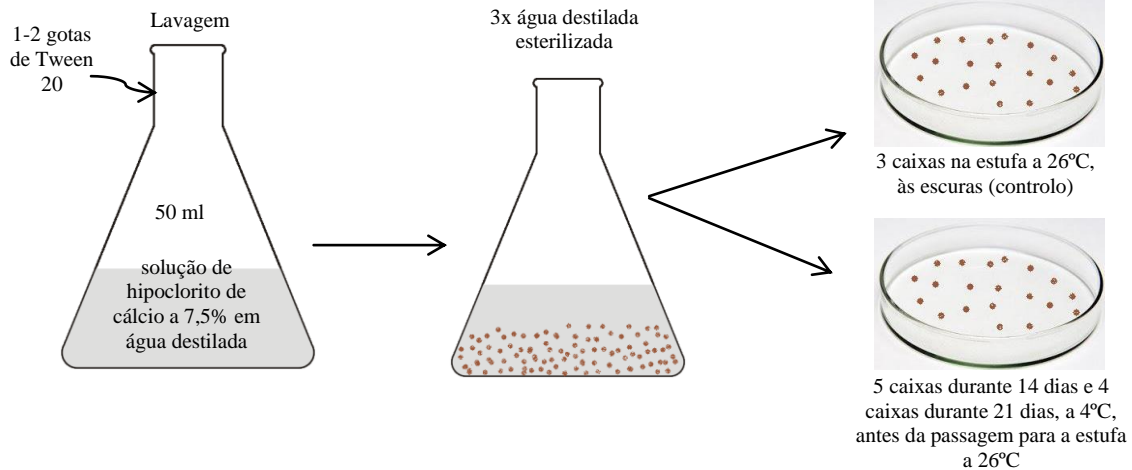
## 2.2 PROPAGAÇÃO DO MEDRONHEIRO

### 2.2.1 Germinação de Sementes

Foram utilizadas sementes adquiridas ao CENASEF (Centro Nacional de Sementes Florestais), que foram esterilizadas e colocadas a germinar em diferentes condições (Fig. 8).

As sementes foram mergulhadas, durante alguns minutos, em água destilada contendo 1-2 gotas de Tween 20, de modo a reduzir a tensão superficial. De seguida, fez-se uma lavagem rápida (cerca de 30 s) em etanol 70%, uma lavagem de 10 min numa solução de hipoclorito de cálcio 7,5% (w/v; Merck) e três lavagens em água bidestilada esterilizada, numa câmara de fluxo laminar. As sementes foram depois distribuídas por caixas de Petri de vidro esterilizadas (10 cm de diâmetro), com o fundo revestido com um disco de papel de filtro e algodão, previamente humedecidos com água bidestilada esterilizada. Utilizaram-se 12 caixas de Petri e em cada uma colocaram-se 20 sementes, perfazendo um total de 240 sementes. O controlo consistiu de 3 caixas, que foram colocadas numa estufa a 26°C, na obscuridade, enquanto as restantes foram mantidas a 4°C durante 14 (5 caixas) e 21 dias (4 caixas), e só depois transferidas para a estufa a 26°C.

\* As plantas para cultura *in vitro* foram cedidas pelo Mestre João Martins.



**Figura 8.** Representação esquemática da esterilização e germinação de sementes de *Arbutus unedo*.

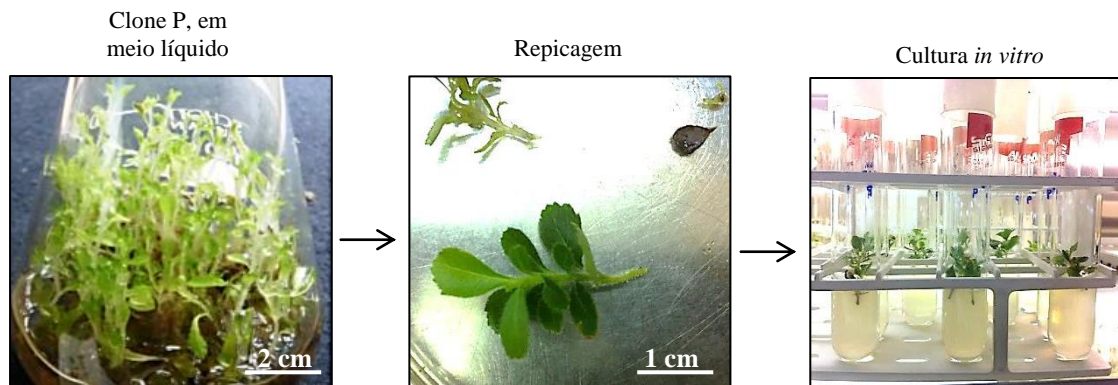
A formação de plântulas foi registrada ao longo de 40 dias, que inclui o tempo em que permaneceram a 4°C e o tempo na estufa. De entre as plântulas mais desenvolvidas, foram selecionadas 44, que foram transferidas para recipientes com um substrato composto por terra esterilizada. As plântulas foram depois regadas e os recipientes, cobertos por plástico durante as primeiras 2-3 semanas, foram colocados numa câmara de cultura (Fitoclima 1000 EHHF), a 20°C, 70% de humidade e fotoperíodo de 12 h. Após atingirem um crescimento considerável, cerca de 10 cm, foram transferidas para recipientes individuais maiores e colocadas numa estufa exterior.

### 2.2.2 Cultura *in vitro*

Foi utilizado o meio de cultura Fossard modificado, constituído pelos macronutrientes (50ml/L) e vitaminas (20ml/L) de Fossard (De Fossard *et al.*, 1974), micronutrientes de MS (2mg/L; Murashige & Skoog, 1962), sacarose 0,044 M e um regulador de crescimento (BAP, 2mg/L). Para a preparação deste meio, as quantidades de cada componente foram pipetadas a partir de soluções stock e, após a dissolução da sacarose com o auxílio de um agitador magnético, foi adicionada água bidestilada até perfazer o volume total da solução. O pH do meio foi ajustado a 5,65 com soluções stock de 0,01 e 1,0 M de HCl ou NaOH, tendo depois sido adicionado o agente gelificante ágar-ágar (6g/L; Cultimed). Para a dissolução do ágar, a solução foi

primeiramente aquecida e depois distribuída por tubos de ensaio, que foram autoclavados a 120°C, a uma pressão de 120kPa, durante 20 min.

A cultura *in vitro* (Fig. 9) foi feita a partir de explantes de plantas previamente estabelecidos em meio líquido, correspondentes ao clone P. Na câmara de fluxo laminar, os explantes foram colocados em tubos de ensaio com os meios já polimerizados, num total de 20 tubos. Os tubos foram mantidos numa câmara de crescimento, com lâmpadas brancas fluorescentes de luz fria, a uma temperatura constante de 25°C e com um fotoperíodo de 16h. Sempre que necessário, o meio foi renovado, de forma a obter-se um crescimento mais favorável. As plantas obtidas foram repicadas várias vezes, tendo a sua multiplicação sido feita através dos segmentos nodais, para se obter um maior número de plantas e se eliminarem as partes mais danificadas.



**Figura 9.** Cultura *in vitro* de *Arbutus unedo* a partir de material previamente estabelecido em meio líquido.

### 2.3 ESTUDOS MORFOLÓGICOS E ESTRUTURAIS

A caracterização morfológica e estrutural das estruturas secretoras foi feita através de observações de amostras de material fresco num Microscópio Estereoscópico Binocular e de amostras de material fixado num Microscópio Ótico de Campo Claro, Nikon Eclipse E400, ambos equipados com uma máquina fotográfica digital Nikon Digital Sight DS-U1, usando o software Act-2U, e num Microscópio Eletrónico de Varrimento JEOL JSM-5400, equipado também com um sistema digital de captação de imagens.

### 2.3.1 Microscopia Ótica de Campo Claro (MOC)

#### 2.3.1.1 Material Fixado e Incluído em Resina

Secções de primórdios foliares, folhas e caules, das plantas crescida *in vivo* e *in vitro*, foram fixadas durante 2-4 h, à temperatura ambiente, numa solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 6,8 (Glauert & Lewis, 1998). Após três lavagens no mesmo tampão (3x15 min), o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, à temperatura ambiente, durante 1-2 h. As amostras foram depois lavadas três vezes, a primeira em tampão cacodilato durante 15 min, a segunda em tampão e água bidestilada (1:1), durante 15 min, e a terceira em água bidestilada, durante 10-15 min. Seguiu-se uma pós-fixação numa solução aquosa de acetato de uranilo 1%, no escuro, durante 1 h, à temperatura ambiente, tendo-se depois procedido a duas lavagens em água bidestilada (2x15 min) antes da desidratação numa série crescente de etanol (70%, 80%, 90%, 95%, durante 15 min cada, e 2 x 100%, durante 20 min cada). Para a impregnação e inclusão das amostras utilizou-se uma resina de baixa densidade, vulgarmente designada "Spurr" (Spurr, 1969). As amostras foram primeiramente impregnadas com três misturas de etanol e resina nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2 (2 h em cada mistura) e, por fim, com a resina pura durante uma noite. Após se terem colocado as amostras em moldes de borracha com a resina pura, a polimerização decorreu na estufa, a 70°C, durante pelo menos 24 h.

Dos blocos de material obtiveram-se cortes semifinos (0,5-1,5 µm) num ultramicrotomo LKB ultrotome III, usando facas de vidro. Os cortes foram recolhidos para uma gota de acetona 20%, em lâminas de vidro, as quais foram primeiramente secas a 60°C e posteriormente coradas. A coloração foi feita com uma solução de azul de toluidina 1% (solução aquosa de azul toluidina 1%, azur II 1% e borato de sódio 1%; Hall, 1978), durante cerca de 45 min, às escuras e temperatura ambiente. Após a coloração, procedeu-se a duas lavagens com água bidestilada, de forma a retirar o excesso de corante, e os cortes foram, por fim, montados entre lâmina e lamela usando uma gota de glicerina. As observações foram feitas no MOC já referido.

Para se obter uma melhor coloração recorreu-se, por vezes, à dissolução da resina nos cortes, através da aplicação de uma solução saturada de metóxido de sódio em metanol, durante cerca de 10-15 min, antes da coloração. A lavagem com xilol após a coloração foi também, por vezes, útil para remover eventuais sujidades e o corante retido no material de inclusão.

### 2.3.1.2 Material Corado com Verde Iodo-Carmim

A coloração com verde iodo-carmim (Mirande, 1920) é um método de coloração dupla, que permite corar em simultâneo e de forma diferencial dois ou mais constituintes celulares de natureza química diversa.

Utilizaram-se porções de caules e pecíolos de plantas crescidas *in vivo*, que foram primeiramente fixados em etanol a 70%, durante 24 h, antes de se obterem cortes finos num micrótomo de corrediça. De seguida, fez-se uma lavagem rápida dos cortes em água bidestilada e, depois, em água de Javel, durante 5-10 min, para se destruir o conteúdo celular, deixando as paredes opacas. Os cortes foram depois lavados em água acética 1%, durante 5 min, para retirar o excesso de água de Javel e, em seguida, em água bidestilada, durante 5 min. Colocaram-se depois, durante 1-5 s, no corante verde iodo acético, procedendo-se depois a uma diferenciação com etanol a 90%, durante 5-10 min, havendo o cuidado de verificar se o etanol não retinha demasiado corante. Voltou a fazer-se uma lavagem em água bidestilada, durante 2-5 min, para suster a diferenciação e depois colocaram-se os cortes em carmim aluminado de Grenacher, durante 5-10 min. Após nova lavagem em água bidestilada durante 5 min, para retirar o excesso de corante, os cortes foram desidratados em etanol absoluto (2x5 min) e transferidos para uma mistura de etanol e xilol (1:1; 2x5 min) e, em seguida, em xilol puro, pois este é um bom solvente do meio de montagem (Bálsamo do Canadá). Por fim, os cortes foram montados entre lâminas e lamela, colocando-se um pequeno peso sobre as lamelas até estas secarem. As observações foram realizadas no MOC já referido.

### 2.3.2 Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

Foram utilizadas secções de primórdios foliares, folhas e caules de plantas crescidas *in vivo* e *in vitro*, que foram ou não previamente fixadas segundo o procedimento descrito na secção 2.3.1.1. No primeiro caso, após o processo de desidratação, as amostras foram secas pelo método do ponto crítico num aparelho CPD 020 (Balzers), ocorrendo a substituição progressiva do etanol por CO<sub>2</sub>, a 40°C. Em ambos os casos, as amostras foram depositadas em porta objetos metálicos e revestidas com uma película de 20 nm de ouro-paládio, num metalizador JEOL JFC-1100 (12 kV, 10 mA, 10 min). As observações foram feitas no Microscópio Eletrónico de Varrimento a 15 kV.

## 2.4 Determinação do Padrão de Distribuição das Estruturas Secretoras

O padrão de distribuição das estruturas secretoras foi avaliado à lupa, através da contagem do número de estruturas secretoras presentes em folhas frescas das plantas crescidas *in vivo*. As folhas inteiras e com tamanhos semelhantes (Tab. 1), foram colhidas em três regiões diferentes da planta: região superior, intermédia e inferior, sendo a região superior a mais jovem e a região inferior a mais adulta. Foram utilizadas dez plantas e, em cada uma, foi colhida uma folha correspondente a cada uma destas três regiões. Em cada folha, as contagens das estruturas secretoras incidiram na margem, páginas superior e inferior e pecíolo, por forma a se poder determinar as zonas onde existe maior densidade de estruturas secretoras e inferir acerca da existência ou não de diferenças morfológicas.

**Tabela 1.** Tamanho das folhas utilizadas na contagem das estruturas secretoras de *Arbutus unedo*.

Medidas (média, cm)	Folha (Região Superior da Planta)	Folha (Região Intermédia da Planta)	Folha (Região Inferior da Planta)
Comprimento	2,60	6,25	4,40
Largura	0,96	2,44	2,02

Para verificar a existência de diferenças significativas no padrão de distribuição das estruturas secretoras nas três regiões selecionadas da planta, bem como em cada uma das zonas foliares consideradas, procedeu-se à análise estatística através de uma ANOVA (Statistica 8.0), sendo as diferenças significativas entre os valores avaliados através de um Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 2.5 HISTOQUÍMICA

Para a deteção das principais classes de compostos químicos presentes no secretado, realizaram-se testes histoquímicos em secções transversais muito finas de folhas e caules frescos, obtidas através de cortes, feitos à mão, com lâminas de barbear. Após cada teste, as secções foram montadas em glicerina, numa lâmina de vidro, e observadas no MOC já referido. Para a deteção de flavonóides, as observações foram feitas também num microscópio Nikon equipado com um sistema de epifluorescência,



usando um filtro de excitação ultravioleta (transmissão de 330 – 380 nm) e um filtro de barreira de 420 nm.

### **2.5.1 Detecção de Lípidos Totais**

Para a deteção de lípidos totais recorreu-se a lisocromos, que são substâncias que coram os lípidos por um mecanismo físico de difusão e solubilidade diferencial, isto é, em que o coeficiente de partilha de solubilidade é favorável aos lípidos e, portanto, à dissolução dos lisocromos nos lípidos.

Utilizaram-se os lisocromos negro Sudão B e vermelho Sudão B (Pearse, 1968). As secções de material foram primeiramente mergulhadas numa solução saturada do corante em etanol a 70%, durante 5-15 min, à temperatura ambiente. Após rápida diferenciação em etanol a 70%, os cortes foram lavados em água bidestilada. A presença de lípidos foi evidenciada através das cores, respetivamente, azul-escura ou negro, e vermelha, que eles apresentam.

Nas experiências controlo, os cortes foram tratados com metanol:clorofórmio:água:HCl (66:33:4:1) durante 1 h, à temperatura ambiente, antes da coloração pelo lisocromo (Pearse, 1968).

### **2.5.2 Detecção Diferencial de Lípidos Ácidos e Neutros**

Os lípidos ácidos e neutros podem ser diferenciados por um corante em solução sulfúrica muito diluída, que é o sulfato de azul de Nilo (Cain, 1947). O azul de Nilo comercial é uma mistura de vermelho de Nilo, que é um lisocromo e, portanto, cora de rosa todos os lípidos em fase líquida, e o azul de Nilo propriamente dito, que é um corante básico e, portanto, cora de azul todos os compostos acídicos (lípidos ou não). No caso dos lípidos ácidos, a reação é muito forte e, por isso, mascara a coloração rosa fornecida pelo vermelho de Nilo, surgindo este tipo de lípidos com cor azul escura.

Para a identificação diferencial de lípidos utilizou-se uma solução de sulfato de azul de Nilo 1%, durante 30 min, a 37°C, sendo os cortes depois imersos numa solução aquosa de ácido acético 1% e, em seguida, lavados em água bidestilada.

Nas experiências controlo, os cortes foram tratados do mesmo modo que para a deteção geral de lípidos (secção 2.5.1).

### 2.5.3 Detecção de Proteínas

Para a deteção de proteínas utilizaram-se os corantes azul mercúrico de bromofenol (Mazia *et al.*, 1953) e azul brilhante de Coomassie (Fisher, 1968). O primeiro é um corante ácido, que forma ligações covalentes com substâncias ionizadas positivamente, como é o caso das proteínas. O segundo tende a criar ligações eletrostáticas, sendo um corante muito sensível que existe sob duas formas, uma vermelha e outra azul. Por ligação do corante à proteína, a forma vermelha é convertida na forma azul (Figueiredo *et al.*, 2007).

Na coloração com azul mercúrico de bromofenol, os cortes foram imersos na solução corante a 1% em etanol 95%, com cloreto de mercúrio 10%, durante 10-15 min. Em seguida, fez-se a diferenciação em solução aquosa de ácido acético 0,5% (3x15 min) e, depois uma lavagem rápida em água bidestilada, uma lavagem em tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,0), durante 3 min e, por fim, uma nova lavagem em água bidestilada.

Na coloração com azul brilhante de Coomassie, os cortes foram imersos na solução corante a 0,25% em ácido acético 7%, a 30°C, durante 30 min. Após lavagem numa solução aquosa de ácido acético 7%, durante 30-60 s, os cortes foram lavados rapidamente em água bidestilada.

Para ambas as colorações, as experiências controlo consistiram de amostras que foram imersas numa solução de anidrido acético 10% em piridina, durante 2-4 h, antes da aplicação do corante (Mazia *et al.*, 1953 e Fisher, 1968).

### 2.5.4 Detecção de Polissacarídeos

A deteção de polissacarídeos foi feita em cortes de amostras de material fresco crescido *in vivo* e também em cortes semifinos de material incluído em resina, montados em lâminas de vidro. Em ambos os casos, a deteção de polissacarídeos foi feita através da reação PAS (ácido periódico - reagente de Schiff; McManus, 1948), que consiste na oxidação, pelo ácido periódico, dos grupos 2,3-glicol dos resíduos de glucose, que constituem as macromoléculas glucídicas. Após esta oxidação, os grupos aldeídos expostos são visualizados através da ligação ao reagente de Schiff, que origina um produto de condensação de cor avermelhada.

Para bloquear os grupos aldeído livres e a coloração ser, por isso, mais específica, os cortes foram primeiramente tratados com uma solução saturada de dimedona durante 16-24 h, à temperatura ambiente (Feder & O'Brien, 1968). Após uma

lavagem rápida em água, procedeu-se à oxidação dos cortes com uma solução aquosa de ácido periódico 1%, durante 20 min, à temperatura ambiente e, depois, a uma lavagem rápida numa solução de etanol a 70%, seguida de uma lavagem em água bidestilada, durante cerca de 2 min. Os cortes foram, por fim, colocados no reagente de Schiff, no escuro, durante 3 h, seguindo-se uma lavagem em água corrente durante cerca de 10 min (Feder & O'Brien, 1968).

Nas experiências controlo não se fez o tratamento com o ácido periódico (Feder & O'Brien, 1968).

### **2.5.5 Detecção de Mucilagens**

Ao combinar-se com os grupos aminados das proteínas, o ácido tânico forma um produto de condensação que é visualizado por reação com o cloreto de ferro, apresentando cor negra (Pizzolato & Lillie, 1973).

As secções de material foram imersas numa solução aquosa de ácido tânico 5%, durante 10 min, e depois lavadas em água bidestilada, durante 5 min. Em seguida, os cortes foram imersos numa solução aquosa de tricloreto de ferro 3%, durante 10 min, e novamente lavados em água bidestilada, durante 5 min.

Nas experiências controlo, os cortes foram tratados apenas com ácido tânico (Pizzolato & Lillie, 1973).

### **2.5.6 Detecção de Pectinas**

O vermelho de ruténio é um composto catiónico hexavalente que, na ausência do tetróxido do ósmio, reage com substâncias ácidas, de natureza muito diversa, sendo algumas delas parte integrante das pectinas, corando-as de rosa intenso (Figueiredo *et al.*, 2007).

As secções de material foram mergulhadas numa solução aquosa de vermelho de ruténio 0,2%, durante 30 min, e, em seguida, lavadas em água bidestilada (Johanson, 1940).

### **2.5.7 Detecção de Fenóis**

Em luz visível, a deteção de fenóis baseia-se na formação de um complexo de ferro de cor negra, resultante da reacção dos fenóis (orto-dihidroxifenóis) com tricloreto de ferro (Mace, 1963).

As secções de material foram imersas numa solução de tricloreto de ferro ( $\text{FeCl}_3$ ) 2,5% em etanol 95%, durante 10 min, à temperatura ambiente. De seguida fez-se uma lavagem em água bidestilada durante 5 min.

### **2.5.8 Detecção de Flavonóides**

A utilização de fluorocromos para a deteção de compostos fenólicos, é uma técnica muito sensível e específica, pelo que se utilizou o fluorocromo cloreto de alumínio, emitindo os flavonóides, neste caso, fluorescência amarelo-esverdeado (Charrière-Ladreix, 1976).

Os cortes foram imersos numa solução de cloreto de alumínio 10% em água, durante cerca de 30 min, seguindo-se uma lavagem rápida em água bidestilada e, por fim, a montagem dos cortes entre lâmina e lamela com uma gota de água.

Nas experiências controlo, os cortes foram observados sem o tratamento com o fluorocromo (Charrière-Ladreix, 1976).

### **2.5.9 Detecção de Terpenóides (Óleos Essenciais e Oleoresinas)**

A deteção de terpenóides realizou-se através do reagente de Nadi (David & Carde, 1964), que origina, por oxidação, azul de indofenol fortemente lipossolúvel, corando diferencialmente inclusões lipídicas e terpénicas. Com este corante, as essências deverão corar de azul, enquanto os ácidos resínicos deverão corar de vermelho escuro. As misturas de óleos essenciais e resinas deverão evidenciar uma coloração que vai de violeta a púrpura, de acordo com a predominância de cada um destes componentes.

Os cortes foram primeiramente colocados neste corante, às escuras, durante 60-90 min, à temperatura ambiente, procedendo-se depois a uma lavagem em tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,2), durante 2 min.

Nas experiências controlo, os cortes foram tratados do mesmo modo que para a deteção geral de lípidos (secção 2.5.1).

## 2.6 ISOLAMENTO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

O material utilizado foram plantas obtidas por germinação de sementes, nomeadamente as folhas e caules jovens, evidenciando a presença de estruturas secretoras (secção 2.5).

As plantas foram cuidadosamente removidas dos vasos e as partes mais lenhificadas eliminadas. As folhas e os caules foram cortados em pequenos pedaços, de modo a facilitar o processo de extração, obtendo-se cerca de 150 g de material vegetal, que foi depois colocado num balão de 2000 mL. O processo de isolamento dos óleos foi realizado por hidrodestilação num aparelho do tipo *Clevenger* modificado (Fig. 10), descrito na Farmacopeia Portuguesa VIII (2005). Ao material vegetal adicionou-se 1,5 L de água e a destilação ocorreu durante 2,5 h.



Figura 10. Aparelho do tipo *Clevenger* modificado.

## 2.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEÁSICA

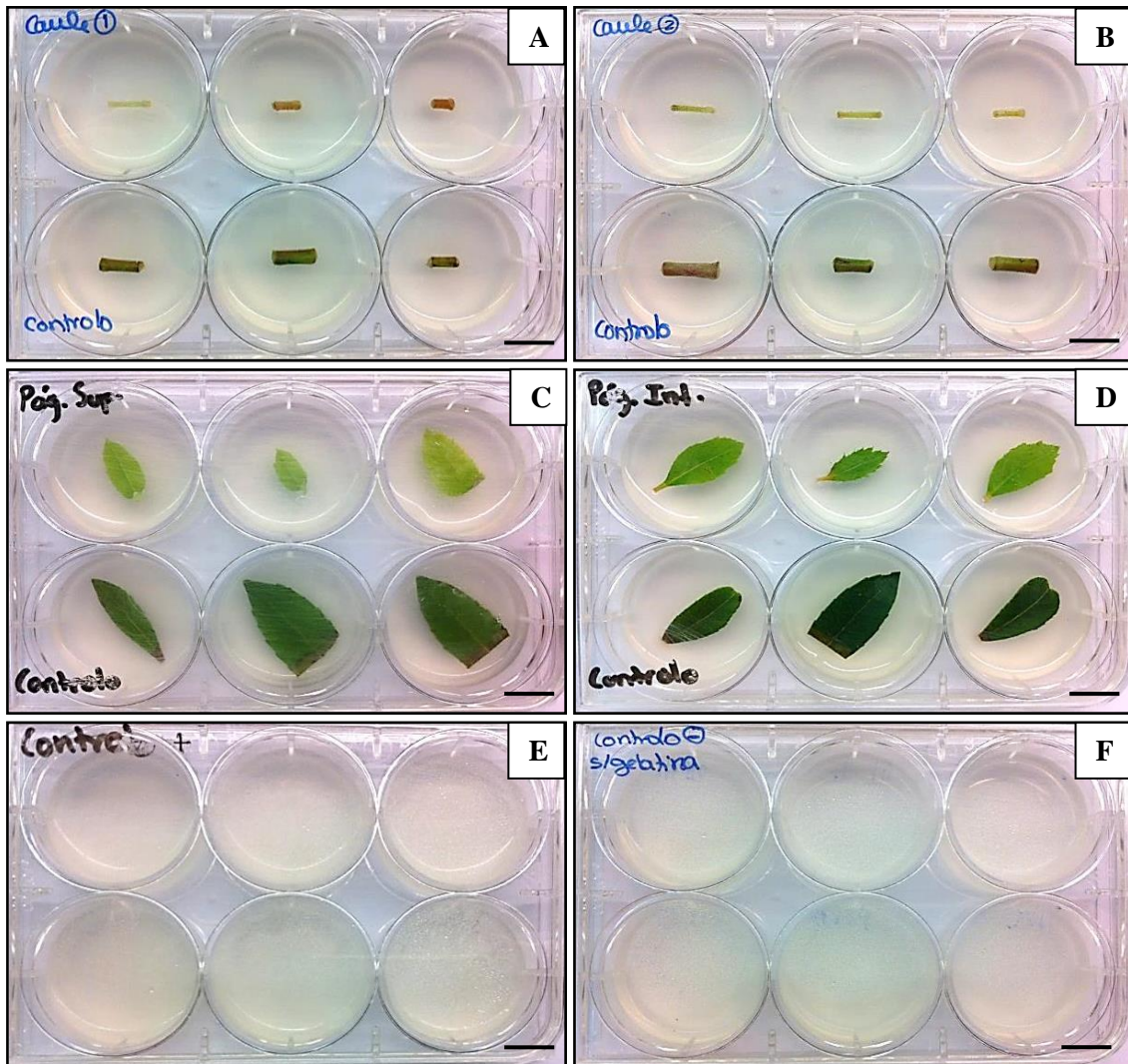
Utilizaram-se fragmentos de folhas e caules frescos das plantas crescidas *in vivo* e prepararam-se dois meios diferentes para avaliar a atividade proteásica. Um meio consistiu de água bidestilada com 1% de agar e 0,5% de gelatina. O outro meio, que serviu como controlo negativo, era igual ao anterior mas sem a gelatina.

Neste ensaio, a temperatura é um fator importante, visto a atividade proteásica ser determinada pela digestão das proteínas que entram na constituição da gelatina, quando esta contacta com as estruturas secretoras de *A. unedo*. Deste modo, para se obterem resultados fidedignos, é fundamental que estas proteínas se encontrem intactas

e não desnaturadas por eventuais temperaturas excessivas a que, previamente, tenham sido submetidas.

Assim, primeiramente, dissolveu-se o ágar numa placa de aquecimento. Depois da dissolução do ágar, o balão de Erlenmeyer foi mantido em banho-maria até a temperatura estabilizar nos 60°C. Assim que se atingiu esta temperatura, o balão foi de novo colocado na placa de aquecimento, a uma temperatura de aproximadamente 50°C, adicionando-se a gelatina até esta ficar dissolvida.

De seguida, o meio com gelatina foi distribuído por cinco caixas *multiwell* de seis poços cada (Fig. 11), sendo quatro caixas para o material vegetal com estruturas secretoras, duas para o caule, por ter uma menor superfície de contacto, uma para a página superior da folha e outra para a página inferior. Em cada caixa, cada amostra tinha três réplicas e os respetivos controlos, que consistiram de material vegetal sem estruturas secretoras. A quinta caixa serviu para controlo positivo, isto é, presença de gelatina (proteína), mas sem material vegetal, enquanto o meio sem gelatina foi distribuído numa sexta caixa *mutiwell*, também de seis poços, constituindo o controlo negativo (ausência de proteína e material vegetal). Após a polimerização dos meios e a colocação das amostras de material vegetal (Fig. 11), todas as caixas foram seladas com parafilme e colocadas na estufa, a 25°C, durante 24 h. Foi também colocada parafina nas zonas onde o material foi seccionado, de modo a evitar a libertação de proteases dessas zonas para os meios, uma vez que o que se pretendia era avaliar a ação das proteases que poderiam existir nas estruturas secretoras do material vegetal. Após as 24 h, as caixas foram abertas e retirou-se o material vegetal. Com a ajuda de uma espátula retiraram-se os meios para caixas *microbox* de cultura (11cm de diâmetro), tendo cada caixa ficado com três meios, num total de doze caixas. Adicionou-se, depois, o corante azul de bromofenol a 0,01% e, em seguida, colocaram-se as caixas num agitador, durante 1 h, tendo-se depois retirado o corante e substituído por água bidestilada (2x). As caixas com a segunda água bidestilada foram colocadas novamente no agitador e deixadas aí até ao dia seguinte. Por fim, retirou-se a água bidestilada e fotografaram-se os resultados.



**Figura 11.** Avaliação da atividade proteásica em amostras de caule e folhas de *Arbutus unedo*. (A, B) Duas caixas *multiwell* com secções de caules com estruturas secretoras (em cima) e respetivos controlos (em baixo). (C) Uma caixa *multiwell* com folhas jovens, com estruturas secretoras tendo as páginas superiores voltadas para o meio (em cima) e, respetivos controlos (em baixo). (D) Uma caixa *multiwell* com folhas jovens, com estruturas secretoras e tendo as páginas inferiores voltadas para o meio (em cima) e, respetivos controlos (em baixo). (E, F) Uma caixa *multiwell* correspondente ao controlo positivo (com gelatina) e outra ao controlo negativo (sem gelatina). Barras = 1 cm.

### 2.7.1 Extração de Proteínas e Eletroforese

Para quantificar as proteínas presentes nas estruturas secretoras de material fresco, nomeadamente nos caules das plantas crescidas *in vivo*, utilizou-se a técnica SDS-PAGE (dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida; Laemmli, 1970). Prepararam-se cinco amostras (1, 2, 3, 4 e 5) utilizando estruturas secretoras associadas à epiderme de medronheiros crescidos *in vivo* e *in vitro*. A amostra 1 correspondeu ao controlo (epiderme de medronheiro sem estruturas secretoras), a amostra 2 consistiu de estruturas secretoras associadas à epiderme de medronheiros crescidos *in vitro*, a amostra 3 consistiu de estruturas secretoras associadas a uma grande quantidade de epiderme de medronheiros crescidos *in vivo*, a amostra 4 consistiu de estruturas secretoras associadas a muito pouca epiderme de medronheiros crescidos *in vivo* e a amostra 5 era composta apenas por estruturas secretoras, que foram retiradas da epiderme de medronheiros crescidos *in vivo*.

As amostras foram maceradas em tubos Eppendorf (2 mL), em tampão PBS (tampão fosfato salino). Após homogeneização no vórtex e centrifugação à temperatura ambiente, durante 10 min, a uma rotação de 13200 rpm, retirou-se 25 µL do sobrenadante de cada amostra e colocou-se em dois novos Eppendorfs, aos quais se juntou 25 µL de solução desnaturante: Tris-base (100mM), Bicina (100mM), SDS (4%), Ureia (8M), água Mili-Q, β-mercaptoetanol (2%) e azul de bromofenol (0,08%). Após homogeneização, os tubos foram colocados num bloco de aquecimento, a 95°C, durante 10 min, tendo-se depois preparado o gel constituído por duas partes, o *running* gel e o *stacking* gel. O primeiro gel, a 12,5%, era constituído por 3,6 mL de água bidestilada, 3,45 mL de tampão Tris (hidroximetil 1,5M, pH 8,8), 3,3 mL de acrilamida a 40%, 105 µL de SDS a 20%, 105 µL de AMPS (acrylamido-2-metil-1-propano sulfonato) a 10% e 10,5 µL de TEMED (tetrametiletenodiamina). Depois, adicionou-se isopropanol a 50%, para eliminar as bolhas que surgiram ao colocar a solução no suporte de vidro. Após a solução ter polimerizado, formando a primeira parte do gel, escorreu-se o isopropanol e enxaguou-se com um pouco de água bidestilada. O segundo gel, a 4%, era constituído por 2,85 mL de água bidestilada, 1125 µL de tampão Tris (0,625M, pH 6,5), 450 µL de acrilamida a 40%, 45 µL de SDS a 20%, 45 µL de AMPS a 10% e 4,5 µL de TEMED. Colocaram-se os pentes nos suportes de vidro, para definir os poços e esperou-se até o segundo gel polimerizar. Em seguida, retiraram-se os pentes e, na tina de corrida, colocaram-se os suportes de vidro onde se colocam as amostras e os suportes de vidro standard, de modo a haver simetria. Entre os dois conjuntos de suportes de



vidro, verteu-se o tampão Tris:Bicina (150 mL tampão + 600 mL de água Mili-Q) e utilizando uma pipeta de ponta fina, carregaram-se dois poços com 50  $\mu$ L de cada amostra. De seguida, retirou-se o pente, colocaram-se os eléctrodos e correu-se o gel, a 120 V, cerca de 1 h. Após a corrida, o gel foi transferido para um recipiente, tendo-se adicionado o corante azul brilhante de Coomassie, durante 5 min, num agitador. Findo este tempo, o corante foi removido e adicionou-se a solução descorante (25% metanol, 5% ácido acético e água bidestilada), deixando novamente o recipiente no agitador. A solução descorante foi sendo renovada até o perfil proteico se tornar visível.

### 2.7.2 Coloração de Géis com Nitrato de Prata

O gel obtido na etapa anterior foi corado com nitrato de prata (O'Connel & Stults, 1997), tendo sido fixado numa solução constituída por 25% metanol e 5% ácido acético, durante 30 min. Após duas lavagens de 10 min em etanol a 50% e outra em etanol a 20%, procedeu-se à sensibilização do gel por incubação, durante 1 h, em tiosulfato de sódio (0,2 g/L). De seguida, realizaram-se duas lavagens em água bidestilada (2x20 min) e transferiu-se o gel para uma solução de nitrato de prata (2 g/L), durante 20 min. A revelação foi feita numa solução com formaldeído a 37% (0,7 mL/L), carbonato de sódio (30 g/L) e tiosulfato de sódio (10 mg/L), durante aproximadamente 20 min, até a coloração ter a intensidade pretendida, altura em que se adicionou tampão Tris (50 g/L) e 2,5% ácido acético, durante 1 min. O gel foi mantido em água bidestilada para posteriores observações.

### 2.7.3 Zimografia

Ao contrário do que se fez na eletroforese, nesta técnica não é necessária a preparação de um gel de concentração (*stacking gel*). Em alternativa utilizou-se uma solução stock de 10% gelatina, a qual se adicionou ao gel numa diluição de 1:1000.

Os géis de separação, a 12,5%, com espessura de 1 mm, foram preparados utilizando uma solução com 9,6 mL de água Mili-Q, 9,2 mL de Tris (1,5M, pH8,8), 280  $\mu$ L de gelatina (concentração final 1 mg/mL), 8,8 mL acrilamida:bisacrilamida 40% (29:1), 280  $\mu$ L de SDS 20%, 280  $\mu$ L 10% AMPS e 35  $\mu$ L de TEMED. Colocada a polimerizar nos suportes de vidro. Em seguida, prepararam-se as sete amostras finais, em Eppendorfs, tendo-se colocado em cada um 20  $\mu$ L das amostras anteriores (1, 2, 3, 4, 5, A e B, em PBS) e 20  $\mu$ L de tampão de carregamento e, colocaram-se a incubar à temperatura ambiente, durante 10 min. O tampão de carregamento consistiu em 833  $\mu$ L

de Tris (1,5M, pH6.8), 4 mL de 10% SDS, 2 mL de glicerol, 0,1% de azul de bromofenol e água Mili-Q até 10 mL. Em seguida, colocaram-se os suportes de vidro na tina de corrida e cobriu-se com tampão de eletroforese (100mM Tris:Glicina, 0,1% SDS). Num dos géis colocou-se 10  $\mu$ L do padrão de pesos moleculares e das amostras e, no outro gel, 15  $\mu$ L de cada. As condições de corrida foram 120-150 V, a 4°C, durante cerca de 2 h. Enquanto decorria a corrida, preparou-se o tampão de renaturação, 0,25% Triton X-100 em tampão das amostras. Neste caso não se pôde utilizar o PBS devido à salinidade, por isso, em alternativa, preparou-se 500 mL de tampão fosfato (50mM, pH7,4). Terminada a corrida, removeram-se os dois géis dos suportes de vidro, cortaram-se as zonas dos poços e cada gel foi posto a incubar no tampão de renaturação, durante 30 min. Ao fim de cada 15 min, renovou-se o tampão, no fim dos 30 min foi retirado e substituído pelo tampão das amostras. Para se obter uma maior sensibilidade, colocaram-se os géis a incubar na estufa, a 37°C, durante a noite. No dia seguinte, removeu-se o tampão e fizeram-se duas lavagens com água bidestilada. O gel foi corado com azul brilhante de Coomassie (5 min) e, ulteriormente aplicou-se a solução descorante, a qual foi renovada até ser possível detetar as bandas correspondentes à enzima.

#### **2.7.4 Substratos Enzimáticos**

Numa placa *multiwell* de 96 poços foram testadas as amostras 1, 3 e 5, caracterizadas anteriormente na secção 2.7.1. Para cada amostra foram utilizados seis poços, cada um com um substrato diferente, acoplado a um fluorocromo, AMC (7-amino-4-metilcumarina). Os substratos (10mM) aplicados foram a alanina, a metionina, a leucina, a fenilalanina, a lisina e a arginina. Nos poços foram então colocados 150  $\mu$ L de cada amostra e 50  $\mu$ L de tampão das amostras (PBS) e, imediatamente antes da leitura da placa no fluorímetro, foram colocados 2  $\mu$ L de cada substrato. Utilizou-se o programa Softmax 5, definiu-se uma absorvância situada entre 380-460 nm e seleccionou-se o nível mais elevado de sensibilidade para a leitura que, para cada amostra, teve a duração de 10 min.

### 3. Resultados

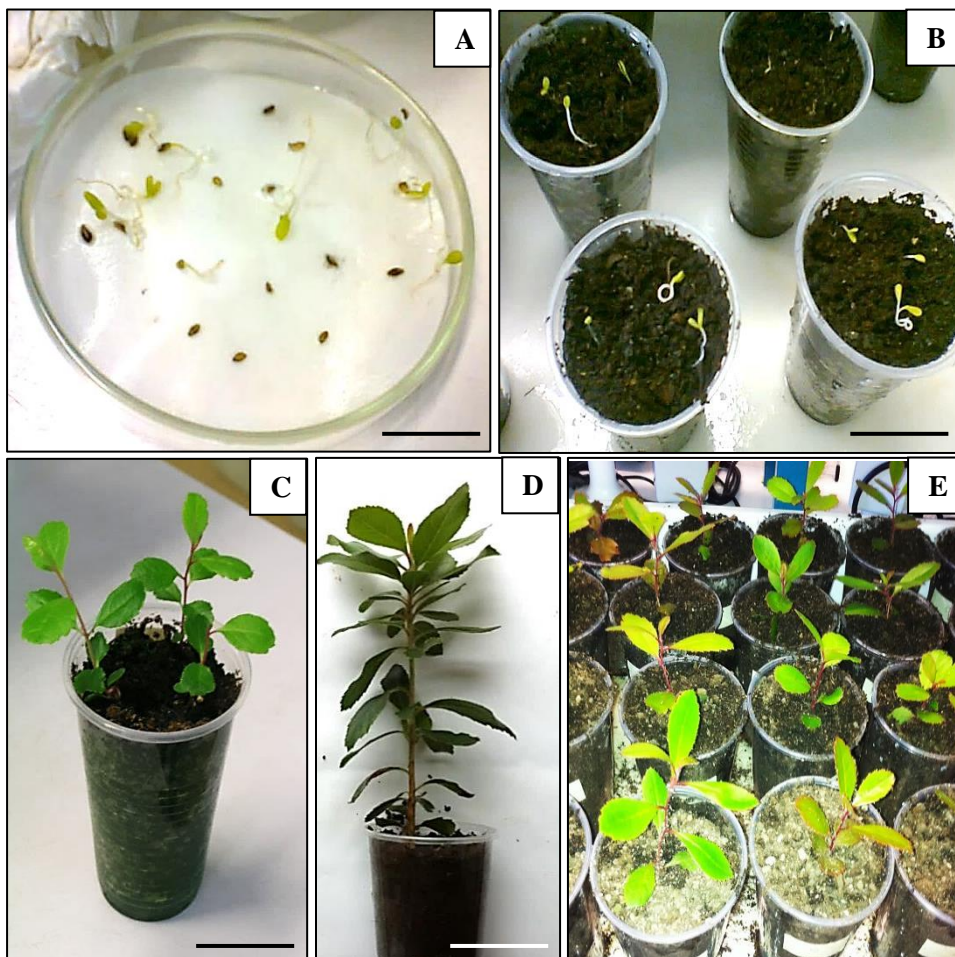




### 3.1 PROPAGAÇÃO DO MEDRONHEIRO

#### 3.1.1 Germinação de Sementes

A germinação de sementes foi claramente superior nos casos em que estas foram sujeitas a um período de estratificação, ou seja, a 4°C durante 14 ou 21 dias, antes da sua transferência para a estufa, a 26°C. Após 14 e 21 dias de tratamento as taxas de germinação foram muito semelhantes em ambos os períodos de estratificação, sendo 62% no primeiro caso e 68% no segundo. As sementes que não sofreram qualquer período de estratificação (experiências controlo) não germinaram. Devido à fase precoce de desenvolvimento em que ainda se encontravam, a maioria das plântulas obtidas a partir da germinação de sementes apresentava um sistema radicular pouco desenvolvido, com aspeto vítreo e sem raízes secundárias (Fig. 12A,B).



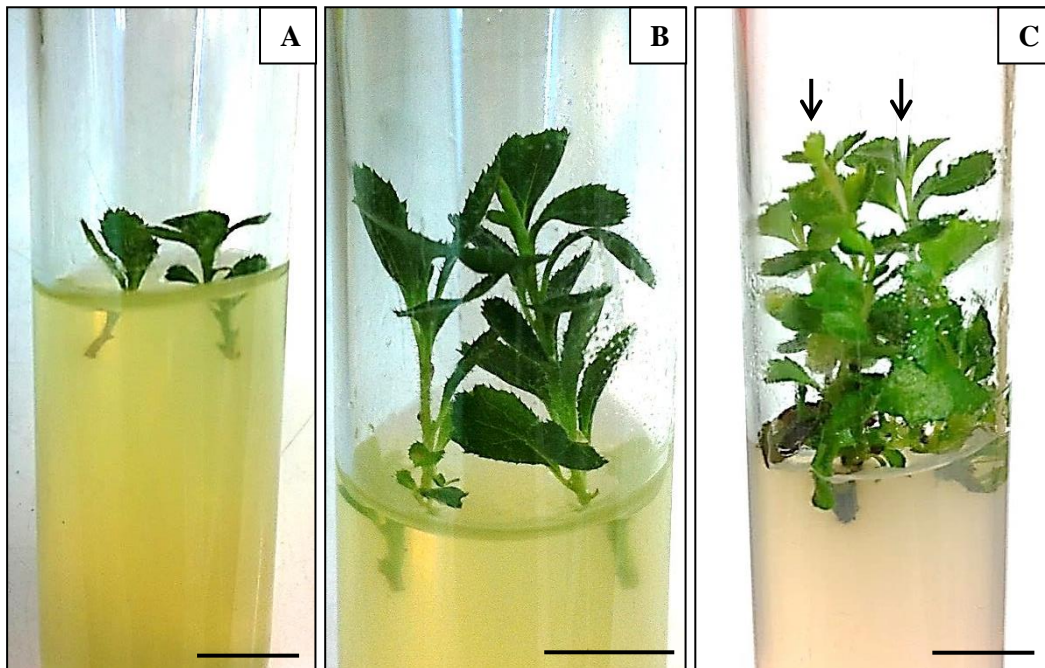
**Figura 12.** Plantas de medronheiro resultantes da germinação de sementes. **(A)** Germinação de sementes; barra = 2 cm. **(B)** Plântulas colocadas no substrato; barra = 3 cm. **(C)** Plantas após um mês em substrato; barra = 3 cm. **(D)** Planta com seis meses; barra = 4 cm. **(E)** Variabilidade fenotípica das plantas após seis meses de crescimento.

No final do primeiro mês em substrato (Fig. 12C) registou-se uma taxa de sobrevivência de 91% e, embora não tenham sido recolhidos dados quantitativos sobre o crescimento das plantas, todas elas apresentaram um desenvolvimento razoável durante o período de aclimatização (Fig. 12D). Contudo, entre elas verificaram-se algumas diferenças no crescimento, bem como alguma variabilidade fenotípica, visível sobretudo ao nível da folha (Fig. 12E). Esta diversidade é, muito provavelmente, devida à variabilidade genética das sementes.

### 3.1.2 Cultura *in vitro*

Os ensaios de micropropagação permitiram multiplicar genótipos selecionados a partir da cultura de nós e proliferação dos meristemas axilares (Fig. 13A). A proliferação dos explantes ocorreu em número variável, geralmente na zona do explante em contacto direto com o meio de cultura. Os rebentos caulinares desenvolveram-se e os caules alongaram de forma rápida (Fig. 13B), formando, geralmente, um aglomerado em torno do explante inicial, o qual se mantém sempre distinguível devido ao seu maior comprimento (Fig. 13C).

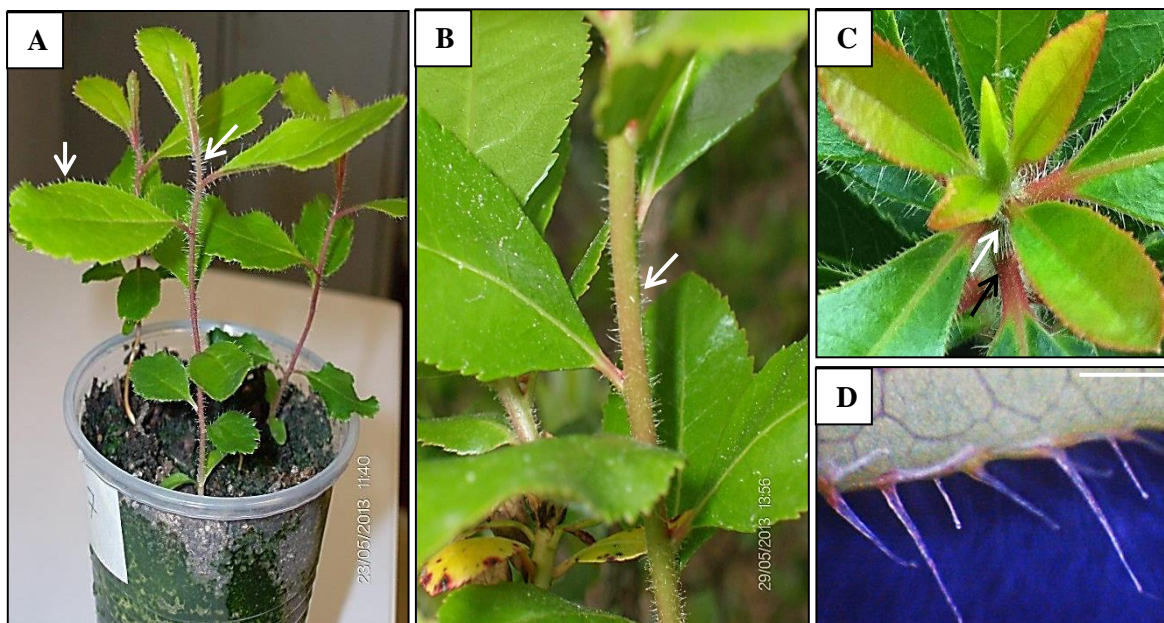
Nestes ensaios, o objetivo foi obter material *in vitro* para realizar a análise dos tricomas. Deste modo, não foram realizadas análises relativas às taxas de micropropagação e a outros parâmetros normalmente avaliados em ensaios deste tipo.



**Figura 13.** Formação de rebentos em plântulas de medronheiro. (A) Colocação dos explantes no meio de cultura. (B) Desenvolvimento de rebentos e alongamento dos caules. (C) Aglomerado de plântulas, onde são visíveis os explantes iniciais (setas). Barras = 1 cm.

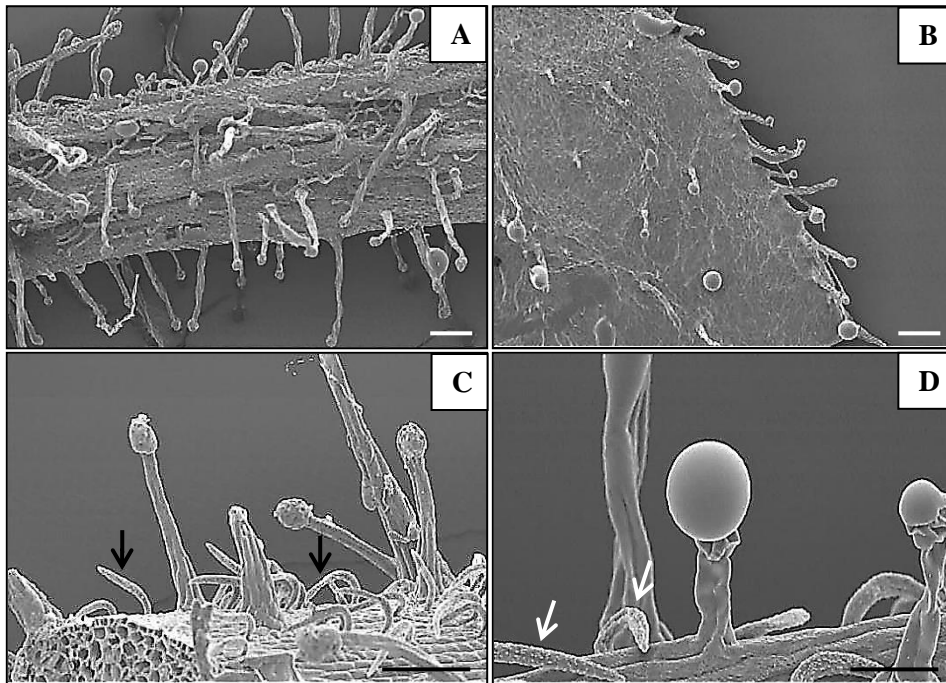
### 3.2 ESTRUTURAS SECRETORAS

O caule e as folhas do medronheiro, especialmente nos exemplares jovens (Fig. 14A) e nas regiões mais jovens das plantas adultas (Fig. 14B, C), possuem um indumento composto maioritariamente por tricomas\* glandulares ou secretores (Fig. 14D), apesar de os caules possuírem também alguns tricomas de revestimento ou cobertura, que são não glandulares. Estes últimos são pouco numerosos e com dimensões reduzidas, sendo detetados apenas nas observações no SEM (Fig. 15A, C e D). São tricomas simples, filiformes, com a superfície finamente granulosa e que, em regra, surgem curvados sobre o caule. Os tricomas secretores são relativamente abundantes, sobretudo no caule e nos pecíolos, e têm grandes dimensões, sendo facilmente observados mesmo à vista desarmada, em plantas crescidas *in vivo* (Fig. 14) e *in vitro* (Fig. 13B). Este estudo incidiu nos tricomas secretores, nomeadamente na sua morfologia e estrutura, no seu padrão de distribuição e na caracterização histoquímica do seu secretado.



**Figura 14.** Indumento (setas) no caule e folhas de *A. unedo*. (A) Planta jovem; barra = 2 cm. (B, C) Parte jovem de uma planta adulta. Barras = 2 cm e 1 cm, respetivamente. (D) Detalhe dos tricomas secretores na margem de uma folha jovem; barra = 0,1 cm.

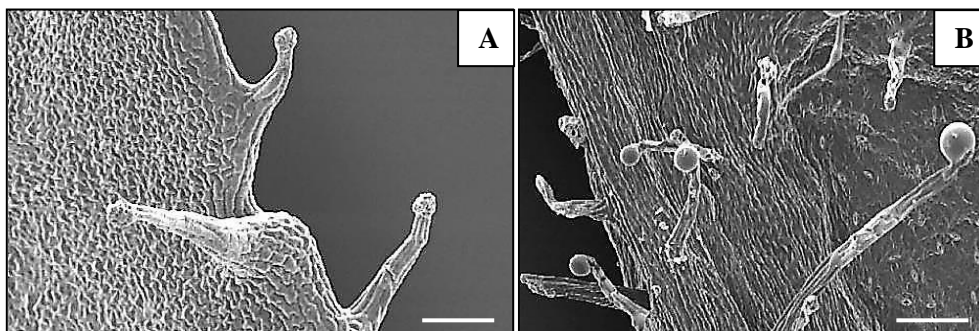
\* O termo tricoma é aqui utilizado em sentido amplo, significando pêlo ou apêndice epidérmico.



**Figura 15.** Micrografias SEM do indumento do caule e folhas de *A. unedo*. (A, C, D) Caule revestido por tricomas secretores e pêlos não secretores (setas); barras = 100  $\mu\text{m}$ . (B) Página inferior e margem de uma folha com tricomas secretores; barra = 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.1 Morfologia e Estrutura

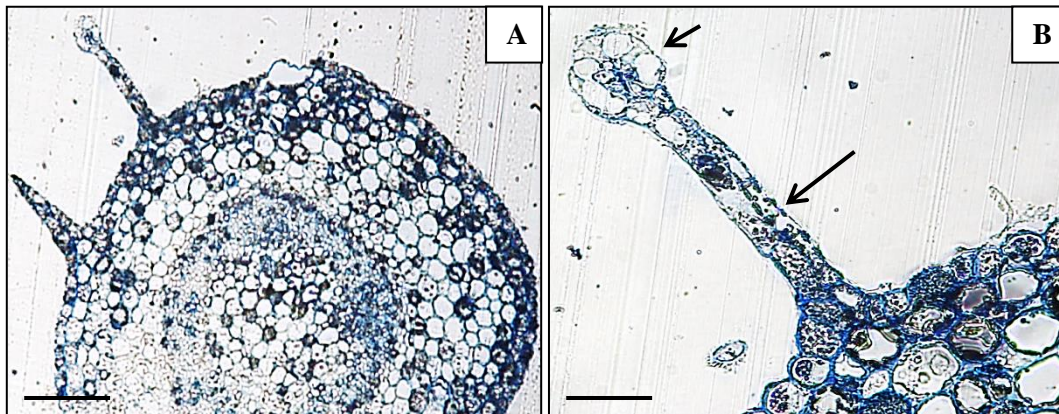
Os tricomas secretores encontram-se quer nas plantas crescidas *in vivo* quer *in vitro*, não apresentando diferenças significativas. Como já referido, encontram-se nos caules e nas folhas, especialmente quando estes são jovens (Figs. 14 e 15). Com a lenhificação do caule e a maturação das folhas, o número de tricomas diminui e estes acabam por desaparecer quase completamente. Este facto deve-se à degenerescência dos tricomas existentes e à sua queda subsequente. Nas folhas, os tricomas existem sobretudo nos pecíolos e na margem, a qual é serrada, terminando cada serrilha, invariavelmente, num tricoma secretor (Fig. 16A). No limbo, os tricomas são escassos e encontram-se, sobretudo, ao longo das nervuras (Fig. 16B).



**Figura 16.** Micrografias SEM do indumento em folhas de *A. unedo*. (A) Margem serrada, com cada serrilha a terminar num tricoma. (B) Tricomas ao longo de uma nervura. Barras = 100  $\mu\text{m}$ .

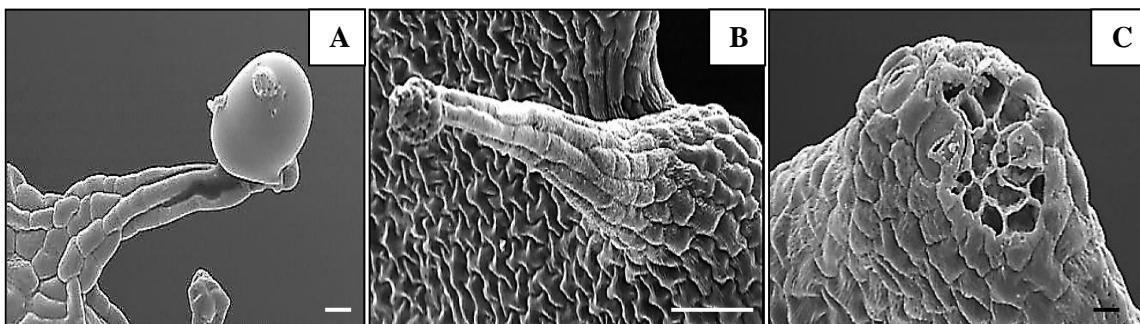


Apesar de variarem em tamanho e espessura, os dados obtidos indicam que os tricomas secretores do medronheiro são todos da mesma tipologia. Todos eles possuem um pedículo ereto, pluricelular, que suporta uma cabeça globosa, também pluricelular (Fig. 17).



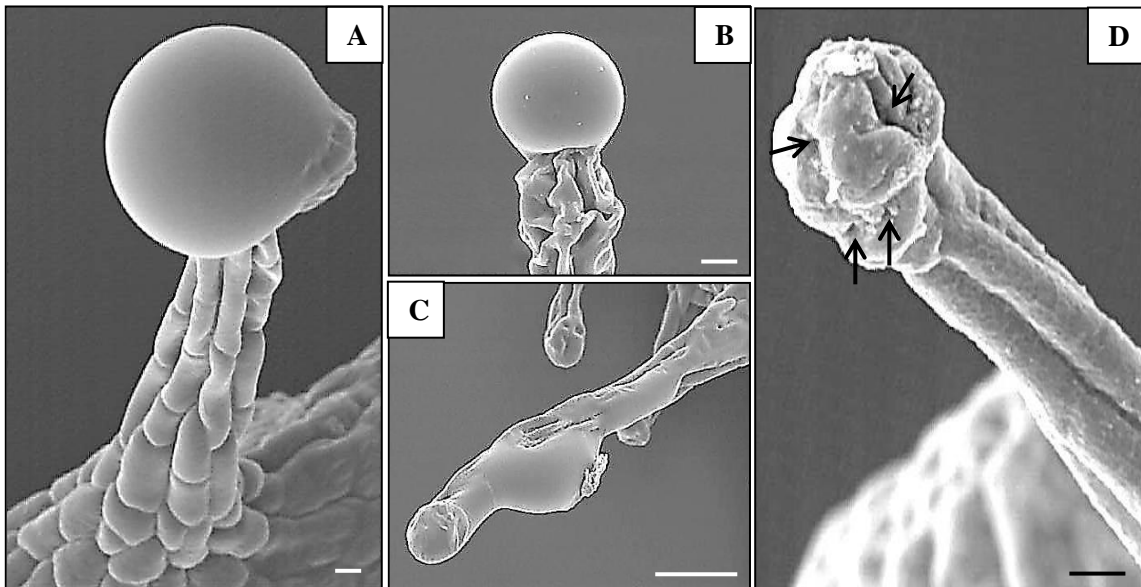
**Figura 17.** Secções transversais de caules em *A. unedo* após coloração com azul de toluidina. (A) Secção transversal evidenciando a presença de um tricoma secretor, acompanhado de uma estrutura que poderá ou não dar origem a um tricoma; barra = 200  $\mu\text{m}$ . (B) Tricoma secretor constituído por uma cabeça (seta pequena) e pedículo (seta grande) pluricelulares; barra = 50  $\mu\text{m}$ .

O pedículo é roliço e esbranquiçado, apresentando um comprimento variável entre 200 e 800  $\mu\text{m}$ . Regra geral, consiste de 4 a 6 fiadas de células dispostas paralelamente umas às outras ou, menos frequentemente, em espiral (Fig. 18A). No caso dos tricomas da margem das folhas, porém, o pedículo é sempre mais espesso na base (100-120  $\mu\text{m}$ ) do que no ápice (40-50  $\mu\text{m}$ ), refletindo o facto de algumas das fiadas de células irem sendo interrompidas antes de atingirem o ápice (Fig. 18B). Um corte transversal na base de um destes tricomas (Fig. 18C), revela que esta pode conter um número significativo de células (cerca de 16).



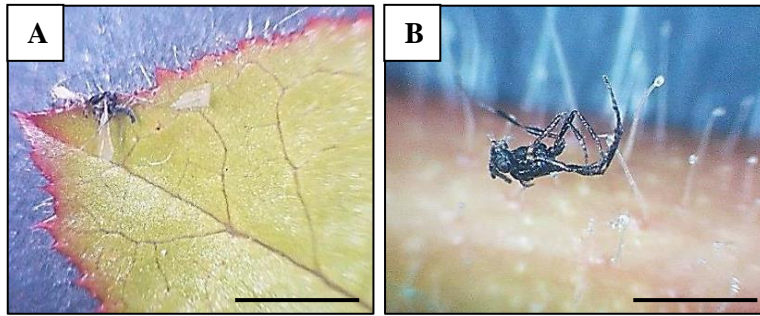
**Figura 18.** Micrografias SEM de tricomas em folhas de *A. unedo*. (A) Pedículo com as células dispostas em espiral; barra = 10  $\mu\text{m}$ . (B) Pedículo mais espesso na base do que no ápice; barra = 50  $\mu\text{m}$ . (C) Corte transversal na base de um tricoma, com um número significativo de células; barra = 10  $\mu\text{m}$ .

A cabeça é mais ou menos esférica, com um diâmetro de 30 a 50  $\mu\text{m}$ . Na sua constituição possui um número variável de células secretoras (dez a vinte), que aparentam ser relativamente vacuolizadas (Fig. 17). Em amostras de material fresco, estas células aparecem geralmente cobertas por secreção, o que confere à superfície da cabeça um aspeto perfeitamente liso e arredondado (Figs. 15D; 18A; 19A, B). Esta secreção observa-se também por vezes a revestir grande parte do pedículo (Fig. 19C), o que indicia a ocorrência de um processo de escorrência e, como tal, a ausência de uma cutícula na cabeça sob a qual se poderia acumular a secreção. No material tratado para observações microscópicas, a secreção é geralmente removida, o que revela a sua hidrofília. Neste caso, as células secretoras surgem com a superfície mais ou menos rugosa, observando-se, por vezes, pequenos poros (Figs. 18B e 19D), por onde possivelmente se dará a libertação da secreção.



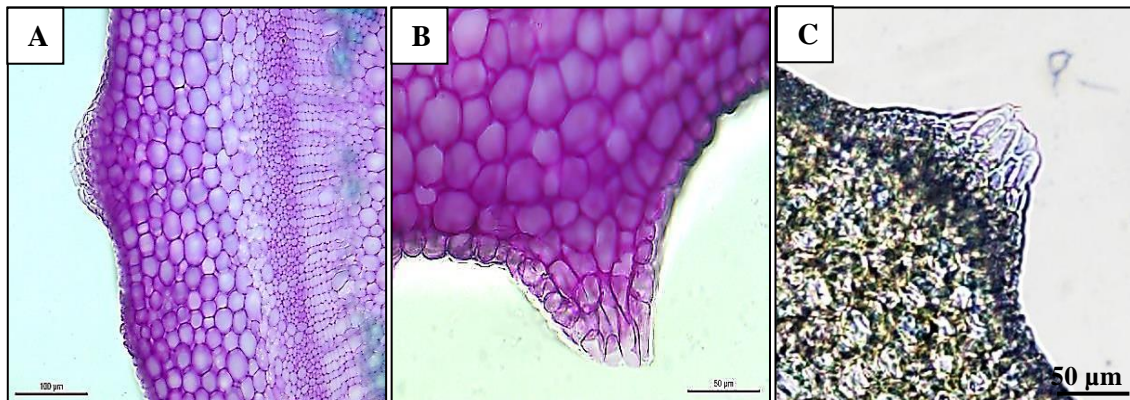
**Figura 19.** Micrografias SEM de tricomas em folhas de *A. unedo*. (A, B) Cabeças glandulares cobertas por abundante secreção (barras = 20  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ , respetivamente). (C) Secreção revestindo grande parte de um pedículo, devido ao processo de escorrência; barra = 50  $\mu\text{m}$ . (D) Cabeça secretora apresentando uma superfície rugosa, onde se notam pequenos orifícios por onde a secreção é libertada (setas).

Em amostras de material fresco, a secreção mostra-se geralmente translúcida e com aparência de grande viscosidade, o que é comprovado pelos insetos mortos que, muitas vezes, se observam aderidos aos tricomas das folhas (Fig. 20A) e caules (Fig. 20D).



**Figura 20.** Insetos mortos aderidos a tricomas de uma folha (A) e de um caule (B) em *A. unedo*. Barras = 0,2 cm e 0,4 cm, respetivamente.

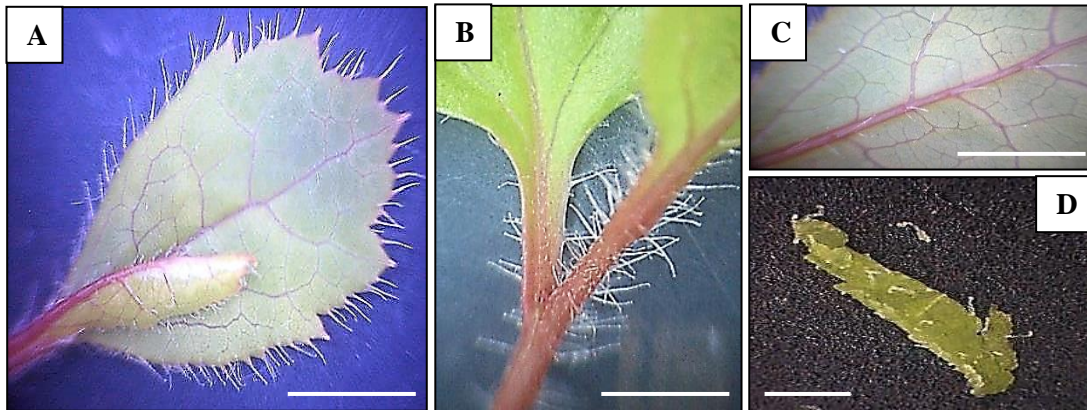
Embora não se tenha acompanhado o processo ontogénico destes tricomas secretores, nalgumas imagens eram visíveis protuberâncias na superfície de caules e folhas que resultam da proliferação localizada de células epidérmicas e subepidérmicas (Fig. 21) São estas protuberâncias que vão aumentando de tamanho e que, ao mesmo tempo, se alongam verticalmente (Fig. 21B, C), que parecem diferenciar-se gradualmente nos tricomas secretores.



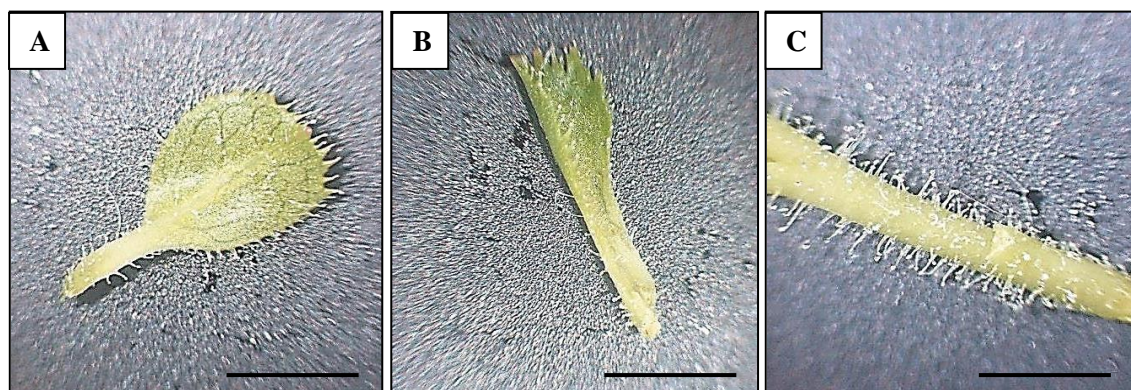
**Figura 21.** Protuberâncias celulares em secções transversais de caules de *A. unedo* corados com verde iodo-carmin, que indiciam o início da formação de tricomas.

### 3.2.2 Padrão de Distribuição dos Tricomas

Como já foi referido, é nas folhas e nos caules que se encontram os tricomas secretores. Nas folhas, sobretudo as mais jovens, existem em maior quantidade na margem (Figs. 22A; 23A) e no pecíolo (Figs. 22B; 23B), sendo mais escassos no limbo (Fig. 22A, D). Nos primórdios foliares são apenas visíveis na página inferior (Fig. 22E), devido à fase precoce de desenvolvimento em que se encontram.

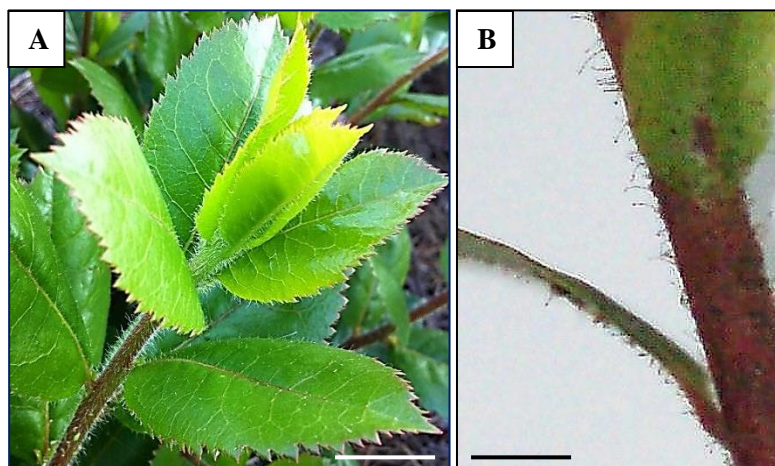


**Figura 22.** Tricomas em diferentes órgãos. (A) Margem, página superior e inferior; barra = 0,5 cm. (B) Pecíolos; barra = 0,5 cm. (C) Limbo da página inferior; barra = 0,5 cm. (D) Página inferior de um primórdio foliar; barra = 0,2 cm.



**Figura 23.** Tricomas secretores em plantas obtidas *in vitro*. (A) Folha. (B) Pecíolo. (C) Caule. Barras = 0,5 cm.

Nas plantas jovens os tricomas encontram-se praticamente em todas as partes aéreas da planta (Fig. 24A), enquanto que nas plantas adultas, os tricomas são geralmente visíveis nos caules, ainda que em menor quantidade, sendo quase impercetíveis nas folhas (Fig. 24B).



**Figura 24.** Tricomas secretores num medronheiro jovem (A) e adulto (B), no estado selvagem. Barras = 2 cm e 0,5 cm, respetivamente.

Para determinar o padrão de distribuição dos tricomas secretores em função do desenvolvimento da planta, procedeu-se à sua contagem nas diferentes partes constituintes da folha (pecíolo, margem, páginas superior e inferior) e em três zonas de desenvolvimento diferente da planta. No caule, devido à grande abundância de tricomas secretores, esta contagem tornou-se impraticável.

**Tabela 2.** Número de tricomas secretores nas partes constituintes da folha e nas regiões superior, intermédia e inferior de cada planta de *A. unedo*.

Número de Tricomas Secretores	Folha (Região Superior da Planta)	Folha (Região Intermédia da Planta)	Folha (Região Inferior da Planta)
<b>Margem</b>	125 ± 31,94 b	73,9 ± 19,83 a	61,4 ± 11,16 a
<b>Página Superior</b>	84,5 ± 51,40 b	21,4 ± 17,73 a	0,3 ± 0,48 a
<b>Página Inferior</b>	64 ± 34,68 a	45,4 ± 19,35 a	16,1 ± 9,02 b
<b>Pecíolo</b>	80 ± 45,03 b	37,7 ± 11,96 a	18,2 ± 4,37 a

---

Em cada coluna da tabela 2, os valores com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas, enquanto que os valores com letras iguais não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Tuckey ( $p < 0,05$ ).

Como mostra a tabela 2, o número de tricomas secretores é sempre muito maior nas folhas da região superior, que corresponde à parte mais jovem da planta, do que da região inferior, que corresponde à parte adulta da planta, que já se encontra praticamente lenhificada. Nas regiões mais desenvolvidas das plantas, os tricomas secretores quase desaparecem, principalmente na página superior das folhas, ou diminuem muito significativamente em número. Em cada folha, é na margem que se encontra sempre o maior número de tricomas secretores (Figs. 22A; 23A). No limbo, o número de tricomas é maior na página superior do que na inferior, quando nos referimos à região superior da planta, ocorrendo o contrário nas regiões intermédia e inferior. Em resumo, por ordem decrescente de abundância, os tricomas secretores surgem na margem, pecíolo, página inferior e página superior.

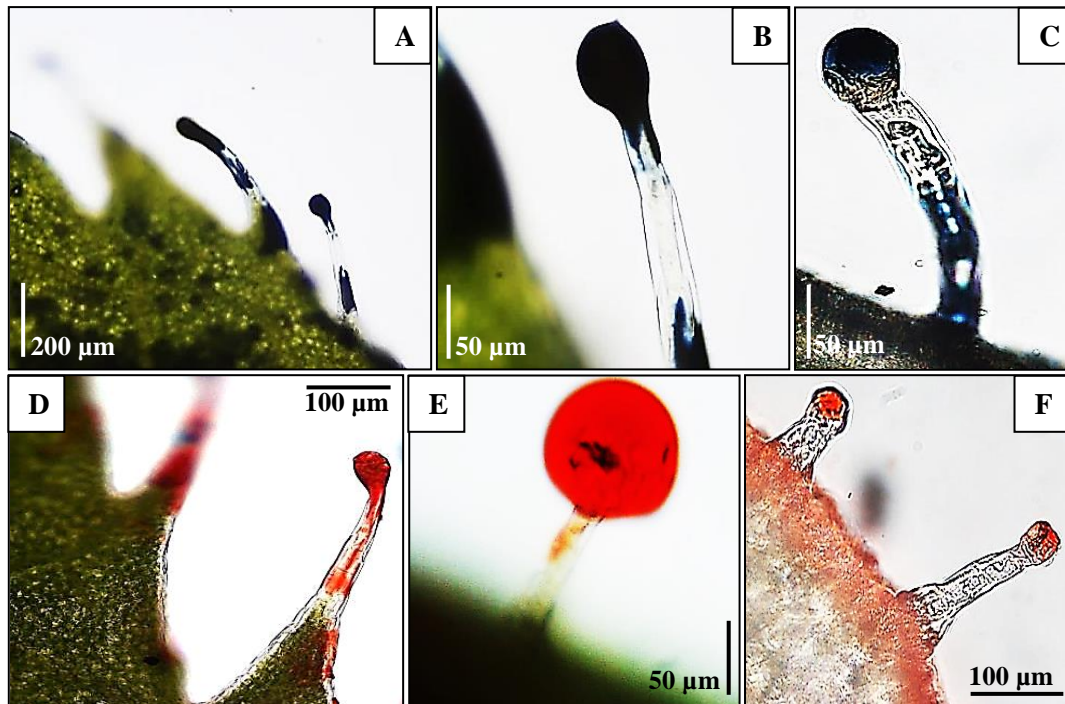
### **3.2.3 Caracterização Histoquímica**

A aplicação de diversos testes histoquímicos em secções de amostras de material, permitiu identificar as principais classes de compostos químicos presentes nos tricomas secretores e seu secretado (Tab. 3). No geral, as reações positivas resultaram em colorações mais intensas no secretado e nas células secretoras, enquanto no pedículo foi geralmente moderada ou fraca e, com frequência, não generalizada a todas as células. Os testes controlos realizados para os diversos testes histoquímicos deram resultados negativos.

**Tabela 3.** Caracterização histoquímica dos tricomas secretores de *A. unedo*. (+) reação positiva muito intensa, (+/-) reação positiva moderada a fraca, (-) ausência de reação.

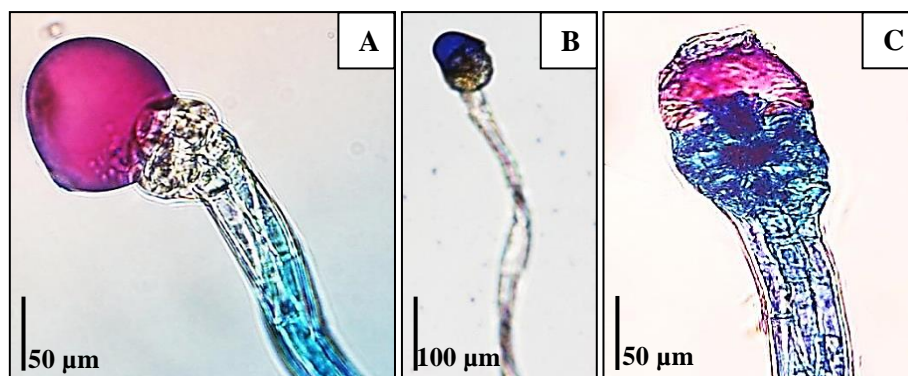
Teste Histoquímico	Compostos Químicos Evidenciados	Secreção	Cabeça Secretora	Pedículo
Vermelho Sudão B	Lípidos Totais	+	+/-	+/-
Negro Sudão B		+	+/-	+/-
Sulfato Azul de Nilo	Lípidos Ácidos e Neutros	+	+/-	+/-
Azul Mercúrico de Bromofenol	Proteínas	-	+	+/-
Azul Brilhante de Coomassie		-	+/-	-
Reação PAS	Polissacarídeos	-	+	+
Ácido Tânico e Cloreto de Ferro	Mucilagens	-	+/-	+/-
Vermelho de Ruténio	Pectinas	-	+/-	-
Em MO com Tricloreto de Ferro	Fenóis	-	+/-	+/-
Em UV com Cloreto de Alumínio	Flavonóides	+	+	-
Reagente de Nadi	Terpenóides	+	-	-

Os testes com o negro Sudão B e o vermelho Sudão B proporcionaram uma coloração, respetivamente, negra e vermelha para os lípidos totais (Fig. 25). Com ambos os lisocromos, a coloração foi especialmente intensa no secretado aderido à cabeça glandular (Fig. 25B, E), sendo moderada nos pedículos e em apenas algumas células secretoras (Fig. 25C, F) e em algumas células dos pedículos, (Fig. 25A, C, D, E).



**Figura 25.** Tricomas secretores de *A. unedo* após coloração com negro Sudão B (A-C) e vermelho Sudão B (D-F). (A, B, D e E) Tricomas em secções de folhas exibindo intensa coloração no secretado aderido à cabeça glandular. (C, F) Tricomas em secções de caules, evidenciando coloração nas células secretoras e em algumas células do pedículo.

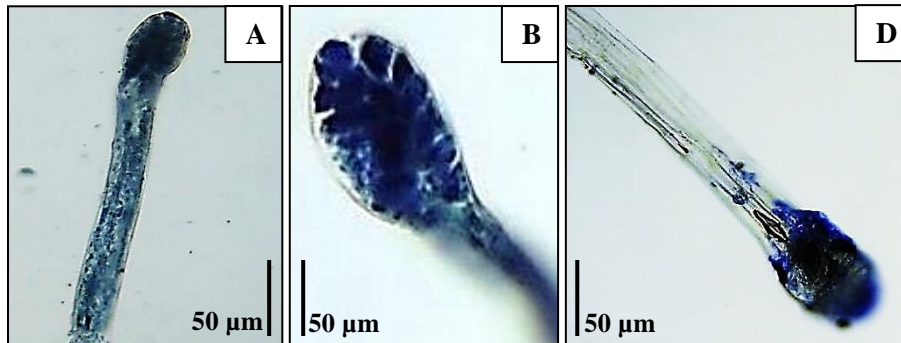
O sulfato azul de Nilo permitiu diferenciar os lípidos ácidos e neutros pela coloração, respetivamente, azul e rosa que estes apresentam (Fig. 26). Neste caso, a secreção surgiu intensamente corada de rosa na maioria dos tricomas (Fig. 26A) e de azul em alguns (Fig. 26B), enquanto as células das cabeças secretoras se mostraram quase sempre azuis, após a remoção do secretado (Fig. 26C). Nas células dos pedículos não ocorreu, na maioria dos casos, reação, tendo-se encontrado apenas poucas células com uma coloração muito reduzida (Fig. 26A, C).



**Figura 26.** Tricomas secretores em secções de caules de *A. unedo* após coloração com azul de Nilo. (A) Secreção intensamente corada de rosa e (B) de azul. (C) Células secretoras coradas de azul, após a remoção do secretado.

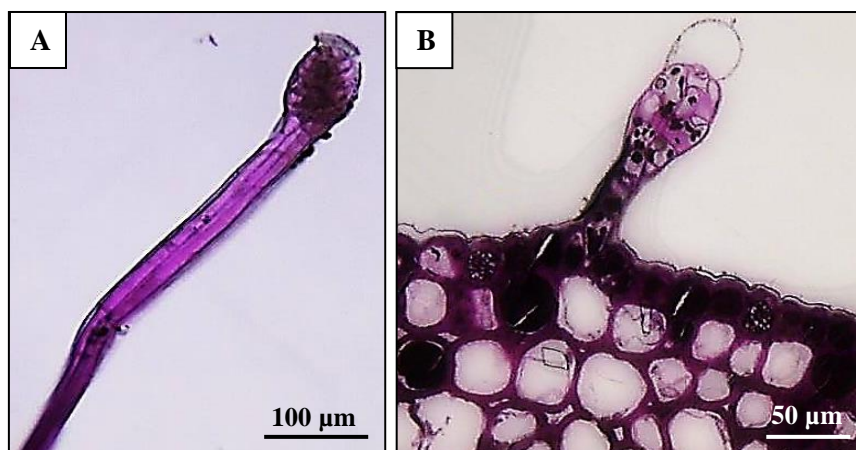


O azul mercúrico de bromofenol corou de azul, tanto as cabeças secretoras, como, menos intensamente, as células dos pedículos (Fig. 27A, B). A secreção, provavelmente por ter sido arrastada, geralmente não foi observada, pelo que na tabela 3 foi registada como ausência de reação (Fig. 27B). Já com o azul brilhante de Coomassie não ocorreu coloração na maioria dos tricomas, existindo apenas um ou outro com cor azul na cabeça secretora (Fig. 27C).



**Figura 27.** Tricomas secretores em secções de caules de *A. unedo* após coloração com azul mercúrico de bromofenol (A, B) e azul brilhante de Coomassie (C). (A) Cabeça secretora e células do pedículo coradas de azul. (B) Detalhe das células secretoras coradas de azul. (C) Coloração azul presente na cabeça secretora.

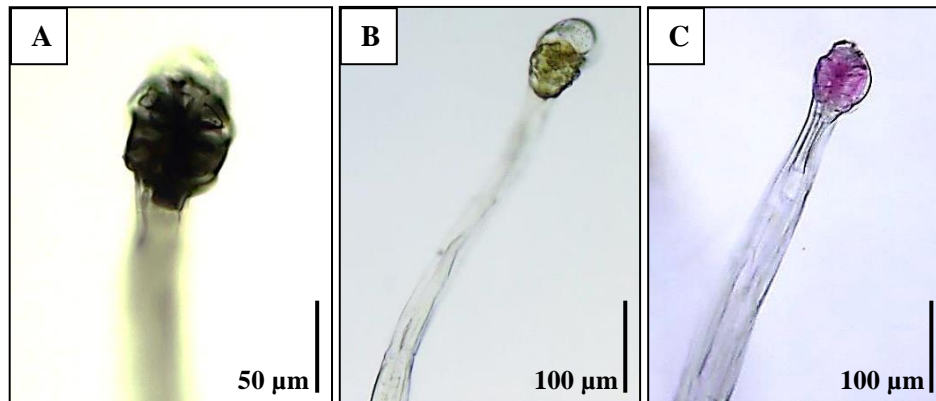
A reação PAS corou intensamente de rosa as células das cabeças e dos pedículos, tanto em secções de material fresco (Fig. 28A) como em secções de material fixado e incluído em resina (Fig. 28B). A secreção mostrou-se, no geral, sem coloração.



**Figura 28.** Tricomas secretores em secções de caules de *A. unedo* após a reação PAS, em material fresco (A) e material fixado e incluído em resina (B). As células das cabeças e dos pedículos surgem coradas de rosa. A secreção não se mostra corada.

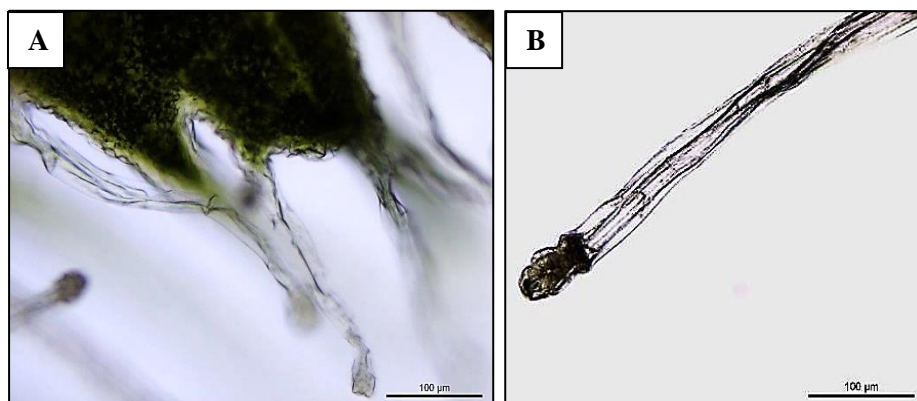
O teste para detecção de mucilagens (ácido tânico e tricloreto de ferro) não foi totalmente conclusivo, na medida em que só alguns tricomas mostraram a cor negra característica na cabeça secretora (Fig. 29A) e, muito raramente, em células do pedículo. A secreção nunca se mostrou corada (Fig. 29B).

O vermelho de rutênio corou de rosa as células secretoras das cabeças, não se verificando coloração significativa na secreção, sendo inexistente nas células dos pedículos (Fig. 29C).



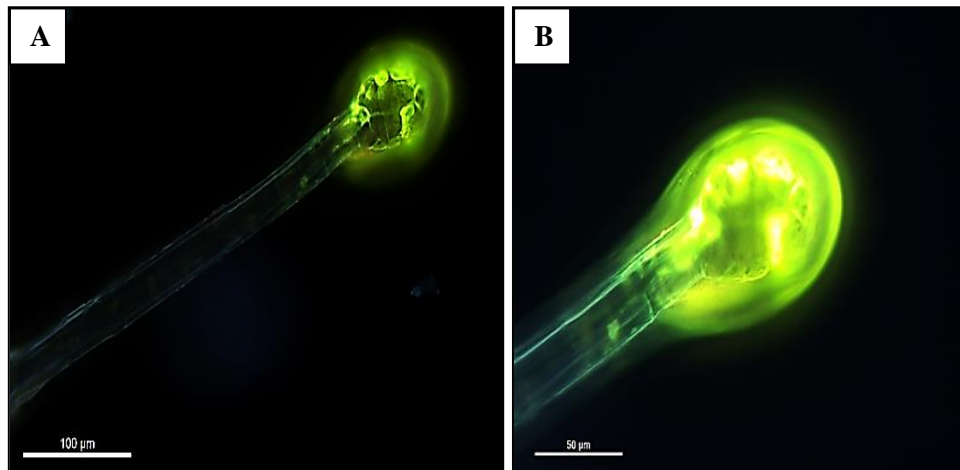
**Figura 29.** Tricomas secretores em secções de caules de *A. unedo*, após coloração para detecção de mucilagens (A, B) e de pectinas (C). (A) Coloração negra na cabeça secretora. (B) Ausência de coloração na secreção e no pedículo. (C) Coloração rosa nas células da cabeça secretora e ausência de coloração nas células do pedículo.

Na detecção de fenóis em MO com o tricloreto de ferro, a coloração verde escura a negra característica observou-se na cabeça glandular (Fig. 30B), sendo inexistente no secretado e quase impercetível no pedículo (Fig. 30A).



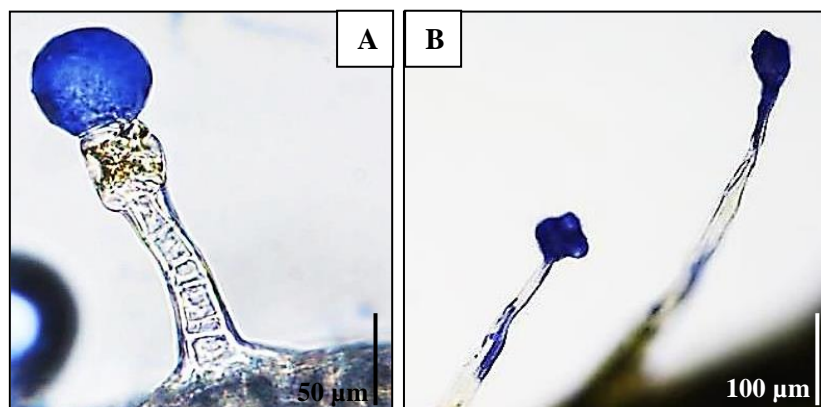
**Figura 30.** Tricomas secretores em secções de caules de *A. unedo*, após coloração com tricloreto de ferro. (A) Coloração quase impercetível nos pedículos. (B) Coloração verde-escura a negra na cabeça glandular, sendo inexistente na secretado.

A detecção de flavonóides no microscópio de fluorescência foi bastante satisfatória. Praticamente todos os tricomas secretoras apresentaram intensa fluorescência amarela-esverdeada, nomeadamente nas células da cabeça e no secretado (Fig. 32), indicando que estes serão os locais preferenciais de acumulação de flavonóides. Nas células dos pedículos, a fluorescência foi inexistente (Fig. 32A) ou, em muitos poucos casos, francamente menor.



**Figura 32.** Tricomas secretores em secções de caules de *A. unedo*, sob luz ultravioleta, após aplicação de cloreto de alumínio. (A, B) Intensa fluorescência amarela-esverdeada, nas células da cabeça e no secretado, onde se acumulam os flavonóides. Nas células dos pedículos, a fluorescência é inexistente.

Com o reagente de Nadi, a secreção aderida à cabeça glandular surgiu com uma cor azul intensa (Fig. 31), enquanto nas células secretoras da cabeça e do pedículo não foi observada coloração (Fig. 31A).



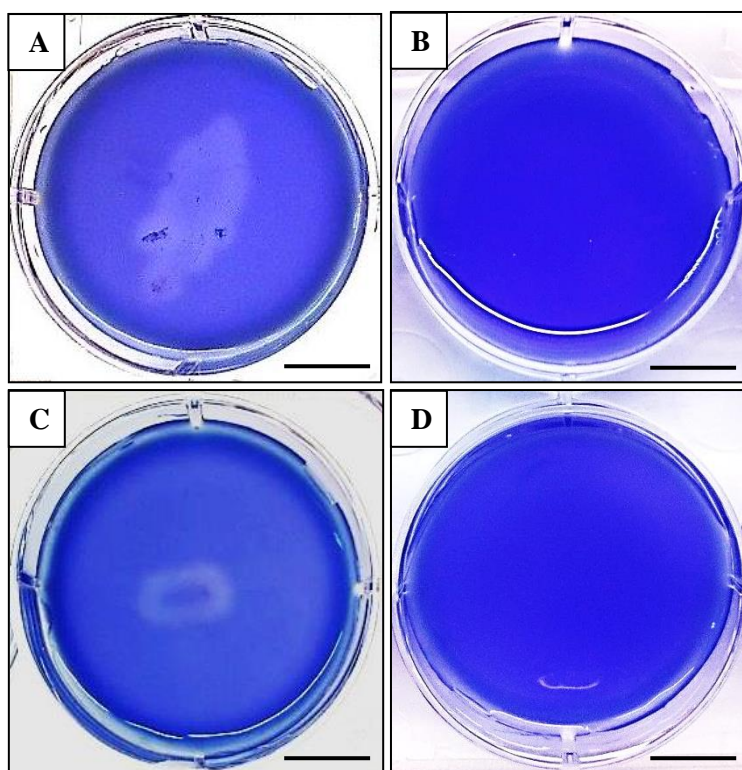
**Figura 31.** Tricomas secretores em secções de caules (A) e folhas (C) de *A. unedo*, após coloração com reagente de Nadi. Secreção apresentando coloração azul intensa. Nas células dos pedículos não ocorreu coloração.

### 3.3 ISOLAMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Após 2,5 h de destilação do material crescido *in vivo*, não se verificou a existência de óleo essencial.

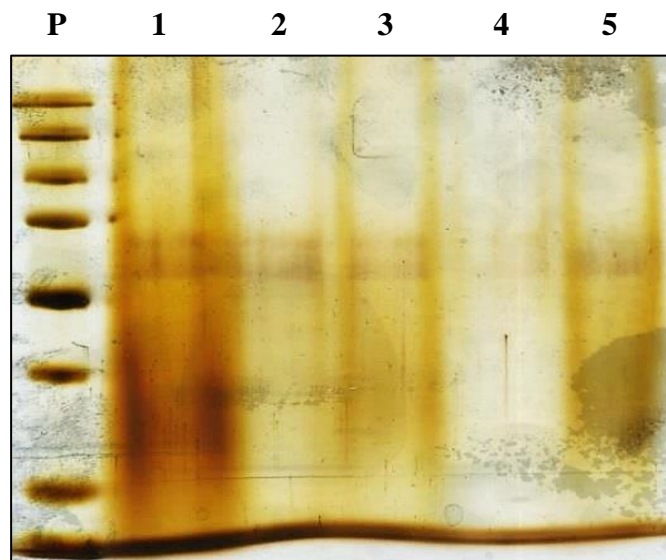
### 3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEÁSICA

A atividade proteolítica dos tricomas secretores foi confirmada em ensaios de digestão de proteína num gel, utilizando diferentes órgãos com tricomas. Os resultados mostram que, quer os tricomas das folhas (Fig. 33A), quer dos caules (Fig. 33C), produzem proteínas digestivas. Esta digestão é evidenciada pelo aparecimento de um halo branco na zona de contacto dos tricomas com a superfície do gel. No caso dos controlos negativos, em que os órgãos não possuíam tricomas secretores, não ocorreu digestão proteica (Fig. 33B, D). Quanto ao controlo negativo correspondente à ausência de gelatina, não se verificou a existência de coloração e, relativamente ao controlo positivo, que correspondeu à presença de gelatina em meios onde não se colocou material vegetal, existiu coloração, não tendo sido verificada nenhuma descoloração, ou seja, os meios permaneceram homogéneos.



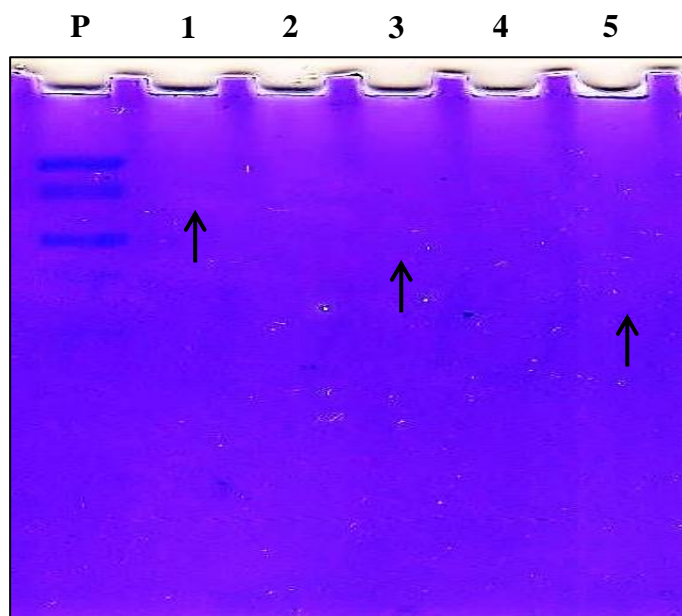
**Figura 33.** Avaliação da atividade proteásica em órgãos de *A. unedo* onde os tricomas secretores estão presentes. Existência de proteínas digestivas nos tricomas de uma folha (A), e de uma secção de caule (C), evidenciada pelo aparecimento de um halo branco. (B, D) Controlos negativos sem digestão proteica. Barras = 1 cm.

O protocolo adotado para a extração de proteínas a partir dos tricomas mostrou a sua presença mas em reduzida quantidade, como se pode observar pela fraca coloração das bandas obtida com nitrato de prata (Fig. 34). Apesar disso, nos diferentes materiais testados, verificou-se que a coloração das bandas foi mais intensa nos extratos provenientes das amostras 1, 3 e 5 (Fig. 34), que correspondem, respetivamente, à epiderme sem tricomas (controlo), à epiderme com tricomas retirada de medronheiros crescidos *in vivo* e a tricomas isolados, retirados da epiderme de medronheiros crescidos *in vivo*. Já nas restantes amostras 2 e 4, que correspondem, respetivamente, a tricomas associados à epiderme de medronheiros crescidos *in vitro* e a tricomas associados a uma reduzida quantidade de epiderme de medronheiros crescidos *in vivo*, não se observaram resultados significativos.



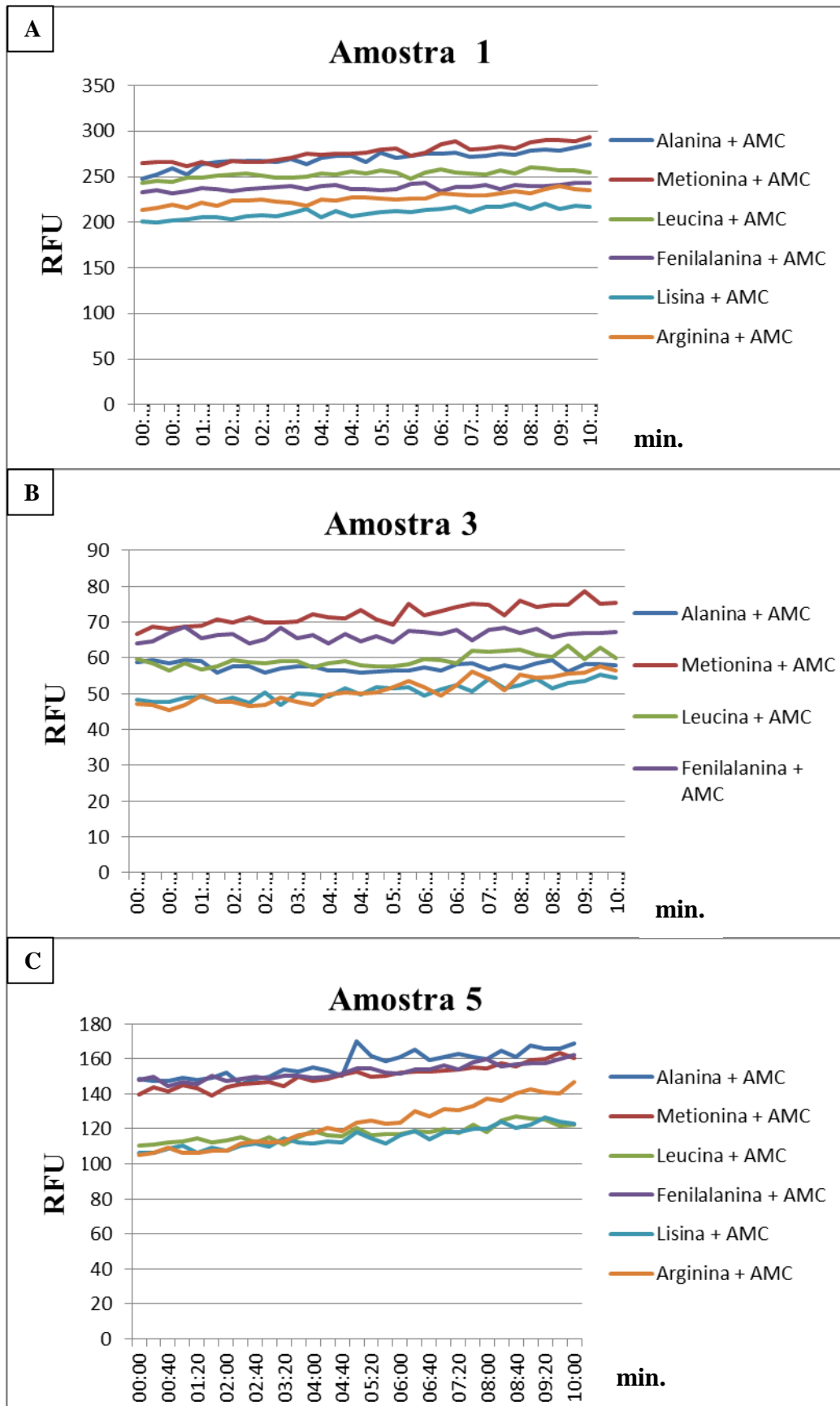
**Figura 34.** Extração de proteína total de tricomas secretores e tecidos associados. **P:** padrão. **Amostra 1:** controlo (epiderme sem tricomas). **Amostra 2:** tricomas associados à epiderme de medronheiros crescidos *in vitro*. **Amostra 3:** epiderme com tricomas retirada de medronheiros crescidos *in vivo*. **Amostra 4:** tricomas associados a uma reduzida quantidade de epiderme de medronheiros crescidos *in vivo*. **Amostra 5:** tricomas retirados da epiderme de medronheiros crescidos *in vivo*.

A análise da actividade proteásica através da zimografia, do mesmo material vegetal utilizado anteriormente, mostrou uma ligeira descoloração do gel (Fig. 35) que, supostamente, poderá corresponder a alguma actividade proteásica, em três das amostras (amostras 1, 3 e 5). Curiosamente, estas amostras são aquelas em que se obteve uma coloração mais acentuada das bandas quando se utilizou o nitrato de prata.



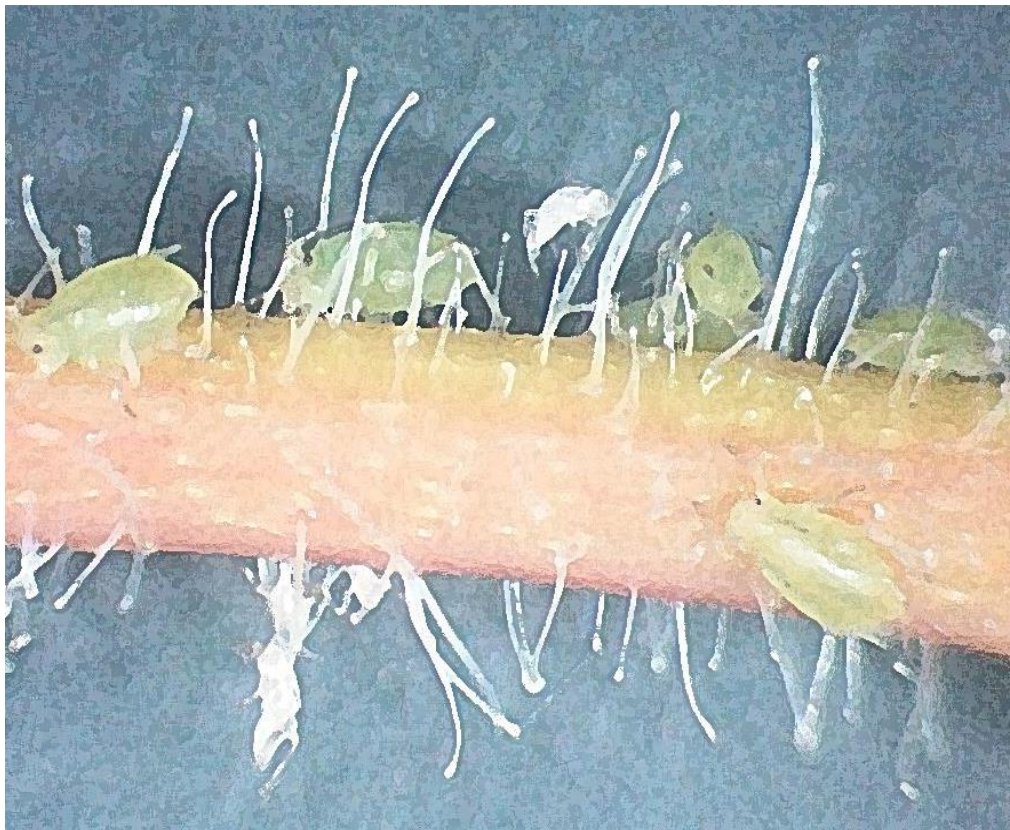
**Figura 35.** Detecção da actividade proteásica através de zimografia. Foram utilizados os mesmos materiais que na figura 34. As setas indicam a existência de descoloração. **P:** padrão.

Após as leituras no fluorímetro das amostras 1, 3 e 5, que correspondem, respetivamente, à epiderme sem tricomas (controlo), à epiderme com tricomas retirada de medronheiros crescido *in vivo* e a tricomas isolados, retirados da epiderme de medronheiros crescidos *in vivo*, verificou-se que os valores obtidos foram sempre inferiores a 300 RFU em qualquer das amostras. Aquela em que os valores de RFU foram mais elevados foi a amostra 1, tendo-se obtido o valor de 280,302 RFU. As amostras 2 e 4, que correspondem, respetivamente, a tricomas associados à epiderme de medronheiros crescidos *in vitro* e a tricomas associados a uma reduzida quantidade de epiderme de medronheiros crescidos *in vivo*, não foram analisadas por fluorimetria em virtude de não se ter detectado qualquer actividade proteásica nos zimogramas.



**Figura 36.** Valores de RFU nas amostras 1, 3 e 5, após leitura no fluorímetro. **(A)** Amostra 1, correspondente ao controlo (epiderme sem tricomas). **(B)** Amostra 3, tricomas associados à epiderme de medronheiros crescidos *in vitro*. **(C)** Amostra 5, tricomas isolados, retirados da epiderme de medronheiros crescidos *in vivo*.

## 4. Discussão







## 4.1 PROPAGAÇÃO DO MEDRONHEIRO

### 4.1.1 Germinação de Sementes

A propagação de plantas através de semente é, geralmente, um método simples, muito embora em algumas espécies não se obtenham os resultados pretendidos, tornando-o, por isso, pouco viável. Esta dificuldade deve-se sobretudo à dureza e impermeabilidade do tegumento, à “dormência do embrião” causada por interações hormonais, ou a ambos os factores, que provocam a inibição da germinação (Smiris *et al.*, 2006). Para além disso, quando o objetivo é obter plantas geneticamente uniformes, a propagação por via seminal não garante a uniformidade das plantas obtidas. Várias espécies de *Arbutus* apresentam dormência da semente, o que limita a germinação e torna, por isso, este método pouco eficaz (Tilki, 2004; Demirsoy *et al.*, 2010; Ertekin & Kirdar, 2010). Deste modo, há a necessidade de recorrer a técnicas que permitam ultrapassar esta limitação. Estas incluem a escarificação do tegumento, a estratificação, manipulação do fotoperíodo ou aplicação de reguladores de crescimento, nomeadamente as giberelinas (Tilki, 2004; Demirsoy *et al.*, 2010; Ertekin & Kirdar, 2010). A estratificação, a baixas temperaturas, tem mostrado ser um dos métodos mais eficazes na estimulação da germinação, isto é, na quebra de dormência das sementes de *A. unedo*, tendo já sido obtidas taxas de germinação elevadas (Ceccherini *et al.*, 1998; Smiris *et al.*, 2006; Ertekin & Kirdar, 2010).

Assim, Tilki (2004), obteve uma taxa de germinação de 89% em sementes tratadas com GA<sub>3</sub>, enquanto que as sementes sujeitas a 9 semanas de estratificação, a 4°C, revelaram uma taxa de germinação ligeiramente inferior, 86%. Resultados semelhantes foram obtidos por Smiris *et al.* (2006) e por Ertekin & Kirdar (2010), que estimularam a germinação pelo uso de citocininas e poliestimulinas. Demirsoy *et al.* (2010) concluíram que a taxa de germinação aumenta com a concentração de ácido giberélico e que, nos cinco genótipos testados, a crescente duração da estratificação a baixas temperaturas fez aumentar a taxa de germinação. No presente trabalho utilizou-se a estratificação durante períodos relativamente reduzidos, tendo-se verificado que a taxa de germinação aumentou com o número de dias de exposição ao frio. Também Martins (2012) chegou à mesma conclusão, isto é, com um período de estratificação de 14 dias obteve uma taxa de germinação de cerca de 90% e com períodos de estratificação de 21 e 28 dias obteve resultados próximos de 100%. As taxas de germinação mais reduzidas verificadas nos nossos ensaios podem estar relacionadas

---

com a aplicação de tratamentos diferentes ou resultarem do facto das sementes testadas terem um período de armazenamento de cerca de três anos.

#### **4.1.2 Cultura *in vitro***

Ao contrário do que acontece na propagação de plantas através de semente, na cultura *in vitro* o objetivo é a manutenção de um determinado genótipo de interesse nas plantas propagadas (Canhoto, 2010; Gomes, 2011). Através de métodos convencionais podem ser feitos ensaios de propagação vegetativa, sendo estes métodos mais morosos e menos eficientes que os métodos de micropropagação, que se revelam uma alternativa mais viável (Canhoto, 2010; Gomes, 2011). Algumas técnicas de micropropagação foram já aplicadas na propagação *in vitro* de plantas lenhosas, sendo a proliferação de meristemas axilares a técnica mais usada na propagação de Ericáceas, em particular do medronheiro (Gomes & Canhoto, 2009). No presente trabalho, o objetivo foi obter material *in vitro* para realizar o estudo dos tricomas, por isso não foram realizadas análises relativas às taxas de micropropagação e a outros parâmetros normalmente avaliados neste tipo de ensaios. No entanto, os ensaios de micropropagação permitiram multiplicar genótipos selecionados a partir da cultura de nós e proliferação dos meristemas axilares, com sucesso. Para além disso, o estudo levado a cabo por Martins (2012), que incluiu diferentes técnicas de propagação do medronheiro, como a embriogénese somática, organogénese e multiplicação em meio líquido, conduziu a resultados promissores para a produção em massa desta espécie através de cultura *in vitro*.

Esta técnica tem imensas vantagens práticas e comerciais devido à pequena quantidade de material, espaço e tempo requeridos e à elevada qualidade e produção obtidas (Chawla, 2010; Gomes, 2011). Devido ao seu grande potencial para a propagação em massa, este método de propagação deve ser alvo de estudos mais detalhados, especialmente no que diz respeito às causas da sua ocorrência.

## 4.2 ESTRUTURAS SECRETORAS

O conhecimento das estruturas secretoras do género *Arbutus* é muito reduzido. Tanto quanto se sabe, apenas dois trabalhos fazem alusão a estas estruturas, sem estabelecerem qualquer ligação com a produção de secreções. Num estudo que visa apenas a taxonomia, Sorensen (1987) referiu a presença de pêlos glandulares nos pecíolos das folhas de *A. glandulosa* e *A. tessellata*, salientando que estes diferem em comprimento nas duas espécies. Becerra & Ezcurra, (1986), num estudo sobre a relação dos pêlos glandulares de *A. glandulosa* com a herbivoria e os limites morfológicos difusos entre esta espécie e *A. xalapensis*, concluíram que as espécies glabras são mais sensíveis à herbivoria. Em *A. unedo* não se conhecem estudos sobre as estruturas secretoras, muito embora Kivcak *et al.* (2001) tenham analisado a composição do óleo essencial desta espécie, em exemplares provenientes da Turquia. O presente trabalho é, por isso, o primeiro estudo detalhado relativo à caracterização morfológica, estrutural e histoquímica das estruturas secretoras desta espécie.

O indumento dos caules e das folhas jovens dos medronheiros é maioritariamente glandular, apesar de os caules possuírem também um número reduzido de pêlos não glandulares, com dimensões reduzidas. Na literatura, estes pêlos são designados genericamente por tricomas de revestimento ou cobertura, enquanto os pêlos glandulares são designados frequentemente tricomas glandulares ou secretores (Hallahan & Gray, 2000). Por conveniência, no capítulo dos resultados usou-se também esta designação, em sentido amplo, para os pêlos glandulares do medronheiro, tendo em conta as suas características morfológicas e estruturais. No entanto, conforme referido na secção 1.4.1, os tricomas apresentam uma enorme diversidade sob vários aspetos, o que torna a sua classificação complicada e, por vezes, controversa (Theobald *et al.*, 1980; Hallahan & Gray, 2000). Segundo alguns autores (Uphof, 1962; Hallahan & Gray, 2000; Ascensão, 2007) a morfologia, por si só, não é suficiente para caracterizar estruturas secretoras. A anatomia, ontogenia, composição química do secretado e processo secretor são também, entre outros, carateres absolutamente necessários. Assim, embora por exemplo as designações tricomas e emergências sejam muitas vezes utilizadas como sinónimos, apenas os estudos ontogénicos detalhados permitem diferenciar estes dois tipos de estruturas (Hallahan & Gray, 2000; Ascensão, 2007). No medronheiro, o processo ontogénico das estruturas glandulares não foi seguido em detalhe, mas algumas imagens de secções finas de caules e folhas jovens mostram que na sua origem estão células epidérmicas e subepidérmicas. Este facto leva-nos a

---

considerar estas estruturas secretoras, em sentido estrito, como emergências glandulares não vascularizadas. Para além disso, apesar de variarem muito em termos de dimensões do pedículo, todas elas parecem ser da mesma tipologia tendo em conta a semelhança da constituição, organização estrutural e composição química do secretado. Também nas plantas crescidas *in vivo* e *in vitro* não foram encontradas diferenças significativas nestas emergências glandulares.

Após a secreção ser produzida, esta é eliminada para o espaço periplasmático e, posteriormente, para o espaço subcuticular formado pelo destacamento da cutícula do resto da parede celular. Esta eliminação ocorre via plasmodesmos ou através de microporos existentes na parede. Na maioria das espécies, a secreção é depois libertada por rutura da cutícula ao longo de uma linha pré-determinada geneticamente (Fahn, 1988; Ascensão *et al.*, 1999). Em alguns casos, porém, esta linha não existe e a secreção é eliminada por meio de poros existentes na cutícula (Ascensão, 2007). Em *A. unedo*, não se obtiveram imagens que mostrem o destacamento da cutícula e a formação de um amplo espaço subcuticular no qual a secreção é acumulada. Em vez disso, a secreção cobria frequentemente a cabeça glandular das emergências, na forma de uma gota proeminente com uma superfície perfeitamente lisa. Nas amostras de material em que a secreção foi removida, as células glandulares apresentavam uma superfície rugosa com pequenos orifícios (microporos) por onde possivelmente se dá a eliminação da secreção. O facto de frequentemente se observar a escorrência da secreção ao longo do pedículo parece apoiar este processo de eliminação da secreção, que é diferente daquele que se verifica na maioria das espécies (Fahn, 1988; Ascensão *et al.*, 1999).

Após a fase de secreção, as células glandulares, em geral, degeneram, pelo que o tricoma acaba por perder a sua funcionalidade (Croteau, 1988; Ascensão, 2007). Em *A. unedo* as emergências glandulares encontram-se predominantemente nos caules e folhas jovens, em pleno crescimento, diminuindo em número com a lenhificação da planta, até desaparecerem por completo. Este facto sugere uma função protetora destas emergências glandulares durante as fases iniciais de desenvolvimento da planta (Ascensão & Pais, 1987; Ascensão *et al.*, 1998; Ascensão *et al.*, 2001).

A caracterização histoquímica da secreção de *A. unedo* indica que esta é constituída maioritariamente por lípidos, flavonóides e terpenóides. Para além disso, a coloração azul obtida com o reagente de Nadi para a deteção de terpenóides sugere que podemos estar na presença de terpenóides de alto peso molecular ou de ácidos resínicos, pelo que o secretado poderá ter um carácter idêntico ao da cola ou da resina, ou seja, ser

---

uma oleoresina. Na verdade, alguns autores (Ascensão *et al.*, 2007) referem que, no caso particular das plantas, os terpenos neutros tendem a corar de rosa e os ácidos resínicos de violeta a azul. Com os testes para a detecção de proteínas, mucilagens e pectinas obtiveram-se resultados negativos, o que indica que estes compostos estarão ausentes, ou em pequena quantidade no secretado, ou então não foram detetados por a secreção ter sido removida. Esta última situação é plausível, uma vez que a gota de secreção não era muitas vezes observada, ao mesmo tempo que estes compostos eram detetados nas células secretoras da cabeça, utilizando os mesmos testes histoquímicos. Para além disso, o facto de a secreção ser viscosa, hialina e pegajosa ao toque, leva a admitir que estariam presentes mucilagens. Já no caso das proteínas, a ausência de coloração no secretado está de acordo com a reduzida quantidade de proteína detetada através da eletroforese. É interessante referir que, na análise bioquímica das folhas do medronheiro já realizada por vários autores (Gaspar *et al.*, 1997; Kivcak *et al.*, 2001; Legsseyer *et al.*, 2004; Carcache-Blanco *et al.*, 2006; Males *et al.*, 2006; Fiorentino *et al.*, 2007; Sanjust *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Serçe *et al.* 2010; Mendes *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011; Malheiro *et al.*, 2012), foram encontrados diversos compostos químicos, tais como terpenóides,  $\alpha$ -tocoferol, compostos fenólicos e óleos essenciais. Como antes se referiu, a secreção das emergências desta espécie contém abundantes terpenóides e flavonóides, mas, aparentemente, a fração de óleos essenciais é inexistente ou muito reduzida.

Os óleos essenciais têm um interesse especial do ponto de vista económico, por terem aplicabilidade em vários tipos de indústrias (Proença da Cunha, 2007). São compostos voláteis de baixo peso molecular, maioritariamente constituídos por terpenóides (Sangwan *et al.*, 2001). Na maioria das vezes localizam-se em tricomas glandulares, tal como acontece com as resinas (Voigt & Gorb, 2010) e, segundo alguns autores (Goodwin & Mercer, 1983), as resinas têm na sua constituição uma mistura de compostos voláteis e não voláteis. No entanto, apesar de existirem terpenóides na composição química do secretado de *A. unedo*, este não é considerado uma planta aromática nem pertence a nenhuma destas famílias. Para além disso, contrariamente aos resultados obtidos por Kivcak *et al.* (2001) com medronheiros provenientes da Turquia, os ensaios de extração de óleo essencial realizados no presente trabalho não foram bem sucedidos. Deste modo, é de admitir que os terpenóides, embora existam, sejam de peso molecular elevado, o que impede a volatilização. Por outro lado, pode acontecer que aqueles autores tenham utilizado uma quantidade de material vegetal bastante superior à

---

utilizada neste trabalho, ou que se esteja na presença de diferentes ecótipos e/ou quimiotipos, que implicam alterações na composição química do secretado (Salgueiro, 1994; Figueiredo *et al.*, 1997).

As estruturas secretoras desempenham várias funções, tendo recentemente interessado cada vez mais investigadores, que tentam compreender e explorar a capacidade destas secretarem compostos químicos tão diversos. Assim, para além da importância económica, resultante do facto de poderem ter diversas aplicações (como fármacos, pesticidas naturais, aromatizantes, fragâncias, etc), os tricomas secretores, em sentido amplo, são também muito importantes ecologicamente. Participam, por exemplo, na regulação de temperatura, aumento da reflexão de luz, diminuição da perda de água, secreção de iões e poluentes, redução da movimentação de insetos na planta, proteção contra fungos e bactérias, atração de polinizadores e efeitos alelopáticos (Levin, 1973; Fahn, 1979; Juniper *et al.*, 1989; Owen & Thompson, 1991; Wagner, 1991; Duke, 1994; Wagner *et al.*, 2004). No medronheiro, as emergências agora estudadas parecem estar especialmente envolvidas na proteção contra fatores externos bióticos e abióticos, nomeadamente ataques de insetos, perdas de água, temperatura excessiva, podendo também estar envolvidos na atração de agentes polinizadores devido ao aspeto brilhante da secreção (Hallahan & Gray, 2000).

Nas plantas insetívoras existem glândulas digestivas que secretam enzimas que digerem o corpo dos insetos capturados, de modo a completar o seu metabolismo com os nutrientes em falta. A secreção destas glândulas é altamente viscosa, o que faz com que os insetos fiquem aderidos aos tricomas e morram, havendo depois a possibilidade de assimilação de minerais (Ellison, 2006), elementos vestigiais (Adlassing *et al.*, 2009) e carbono orgânico (Sirova *et al.*, 2010), por forma a completar o metabolismo (Simoneit *et al.*, 2008; Adlassnig *et al.*, 2010). Com o objetivo de determinar se as emergências glandulares do medronheiro poderiam ter algum papel na digestão de insetos, foram realizados diversos ensaios para averiguar a existência de proteases na secreção. Como já foi referido, a quantidade de proteínas detetada, quer através da análise histoquímica, quer por determinação bioquímica da proteína total, foi reduzida. No entanto, níveis reduzidos de proteína foram também encontrados nas estruturas secretoras de plantas insectívoras e, de acordo com Adlassnig *et al.* (2010), no género *Drosera* não foram encontradas proteínas ou outros compostos azotados antes da estimulação pelas presas, sendo as enzimas digestivas libertadas apenas depois desta ocorrer (Rost & Schauer, 1977).

---

Os ensaios de digestão de proteína em géis mostraram que, quer as emergências das folhas, quer dos caules, exibem atividade proteolítica. A deteção desta actividade revelou-se promissora, tendo sido realizado um zimograma onde, porém, se constatou que esta atividade era residual, devido à reduzida descoloração das amostras no gel. Procedeu-se, então, à leitura no fluorímetro das amostras mais significativas, pois caso existisse atividade proteolítica, ocorreria clivagem e libertação do fluorocromo, havendo fluorescência traduzida em RFU (Unidade Relativa de Fluorescência), que só é considerada significativa a partir do valor 1000 RFU. Verificou-se que os valores RFU foram todos inferiores a 300, pelo que se concluiu que esta existência não era significativa.

Estes dados indicam que a atividade enzimática a que se assistiu não estará relacionada com as proteases possivelmente existentes nas emergências glandulares, mas com enzimas normalmente presentes na planta. Embora os insetos fiquem presos nos caules e folhas de medronheiro e acabem por morrer, os resultados sugerem que as emergências não têm qualquer envolvimento em processos análogos aos que ocorrem nas plantas insetívoras. Deste modo, é mais plausível admitir que, dada a sua localização preferencial em caules e folhas jovens, as emergências constituam um mecanismo de proteção da planta contra a herbivoria, nomeadamente pequenos insetos sugadores, que se alimentam da seiva recolhida nas partes mais jovens da planta. Contudo, segundo Simoneit *et al.* (2008), o facto de não existirem enzimas digestivas não significa que a planta não possa ser protocarnívora, tal como acontece em várias espécies de *Roridula*. Nestas plantas, os insetos aderidos à secreção não são digeridos diretamente, tendo sido introduzido o termo “carnivoria indireta” para explicar esta interação. O processo ocorre através de uma associação mutualista entre um hemíptero, fungo ou bactéria e as plantas protocarnívoras. As fezes e os restos não digeridos das presas contribuem, assim, para o fornecimento de minerais à planta, particularmente fósforo e azoto (Ellison, 2006). O género *Roridula* foi considerado como tendo a armadilha adesiva mais eficaz para insetos, sendo composta maioritariamente por triterpenóides ou resinas terpénicas, constituídas por terpenóides, ácidos gordos e flavonóides, que poderão ser responsáveis pelo carácter viscoso da secreção (Adlassnig *et al.*, 2010; Voigt & Gorb, 2010). Esta composição e viscosidade ocorre também em *A. unedo*. Curiosamente, além do género *Roridula*, também outras Ericáceas, como o género *Rhododrendon* e a espécie *Erica tetralix*, foram descritas como possuindo armadilhas para insetos, não sendo consideradas plantas carnívoras (Adlassnig *et al.*,



2010). Esta condição poderá ser também, eventualmente, atribuída a *A. unedo*. Todos estes dados indicam que estas estruturas podem ter surgido como um mecanismo evolutivo de adaptação às condições ambientais, não tendo um papel ativo na digestão de tecidos para a obtenção de nutrientes.

## 5. Conclusões e Perspetivas Futuras





Os métodos de propagação clonal são de grande importância em programas de melhoramento de plantas ou na clonagem de génotipos de interesse. A clonagem *in vitro* tem-se revelado, em muitas espécies, um método muito eficaz de propagação, em particular quando as técnicas convencionais de clonagem não são tão viáveis. Em espécies arbóreas utilizadas na silvicultura ou na fruticultura, a propagação a partir de sementes não é normalmente utilizada, uma vez que não se garante a uniformidade, genética e fenotípica, das plantas. No entanto, em alguns casos, a germinação de sementes é interessante, mesmo nestas espécies. Por exemplo, para a obtenção de porta-enxertos ou em programas de melhoramento em que o que se pretende obter é variabilidade genética e não uniformidade. Nestes casos é conveniente que as taxas de germinação sejam elevadas. Neste trabalho, embora o objetivo final não fosse a obtenção de plantas, foram realizados ensaios de germinação, para análise das estruturas secretoras. Os resultados mostraram que a estratificação, a baixas temperaturas e durante períodos de tempo crescentes, é um processo eficaz, permitindo obter taxas de germinação elevadas.

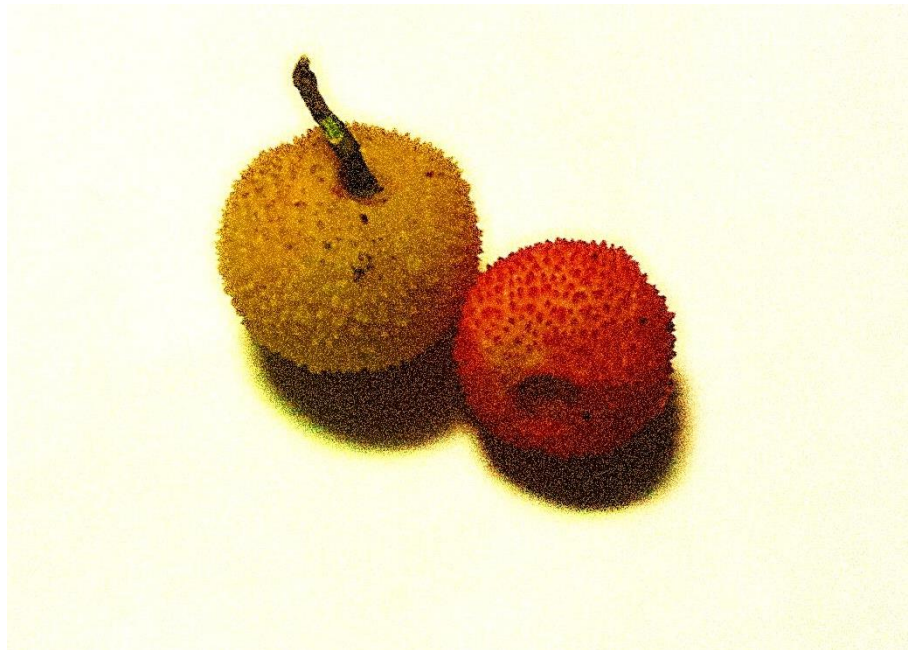
Os ensaios realizados permitiram caracterizar, sob o ponto de vista morfológico, estrutural e histoquímico, as estruturas secretoras presentes nas folhas e nas partes menos lenhificadas do caule dos medronheiros. Verificou-se a existência de dois tipos de estruturas, tricomas de revestimento ou cobertura (não secretoras e presentes apenas nos caules) e emergências glandulares (presentes nos caules e nas folhas, especialmente quando jovens). As emergências consistem de um pedículo pluricelular, multisseriado, e uma cabeça glandular, também pluricelular, não tendo sido encontradas diferenças significativas destas estruturas nas plantas crescidas *in vivo* e *in vitro*. Ainda assim, seria importante realizarem-se, no futuro, estudos ontogénicos detalhados destas estruturas, para averiguar a sua formação e desenvolvimento desde os estados mais iniciais podendo assim, proceder-se a uma caracterização mais rigorosa.

A análise histoquímica da secreção revelou que esta tem características de uma oleorresina, composta em grande parte por lípidos, flavonóides e terpenóides. Outros compostos, como proteínas, polissacarídeos, mucilagens, pectinas e fenóis, foram detetados nas células glandulares mas não na secreção, provavelmente por não existirem em quantidade significativa ou por a secreção ser frequentemente arrastada, devido à sua hidrofília.

Quanto à avaliação da atividade proteásica da secreção, através de diferentes ensaios, concluiu-se que ela era residual. Aparentemente, a secreção não tem este tipo

de atividade, pelo que não se considera esta espécie como uma planta insetívora. Deste modo, tendo em conta a abundância das emergências nos caules e nas folhas jovens, e a sua quase inexistência no estado adulto, é de admitir que estas estruturas constituam um mecanismo de proteção da planta contra fatores abióticos e bióticos, nomeadamente contra a herbivoria devida a pequenos insetos sugadores da seiva. No entanto, vários autores já demonstraram que outros ensaios são igualmente importantes para determinar esta característica e que, mesmo não existindo proteases, tal não significa que a planta não possa ser considerada uma protocarnívora. Assim, outros testes deverão ser realizados no futuro, para se averiguar se *A. unedo* possui tal estatuto, visto partilhar diversas características em comum com este tipo de plantas.

## 6. Referências Bibliográficas





- Abreu, M. M., Godinho, B., Magalhães, M. C. F. (2014). Risk assessment of *Arbutus unedo* L. fruits from plants growing on contaminated soils in the Panasqueira mine area, Portugal. *Journal of Soil Sediments*, 14, 744-757.
- Abu-Asab, M. S. & Cantino, P. D. (1987). Phylogenetic implications of leaf anatomy in subtribe *Melittidinae* (Labiatae) and related taxa. *Journal of the Arnold Arboretum*, 68, 1-34.
- Adlassing, W., Lendl, T., Peroutka, M., Lang, I. (2010). Deadly Glue – Adhesive Traps of Carnivorous Plants. Chapter 2. Biological Adhesive Systems, pp, 15-28. Springer Vienna, Austria.
- Adlassnig, W., Steinhauser, G., Peroutka, M., Sterba, J. H., Lichtscheidl, I. K., Bichler, M. (2009). Expanding the menu for carnivorous plants: uptake of potassium, iron and manganese by carnivorous pitcher plants. *Applied Radiation and Isotopes*, 67, 2117-2122.
- Alarcão-e-Silva, M. L. C. M. M., Leitão, A. E. B., Azinheira, H. G., Leitão, M. C. A. (2001). The *Arbutus* berry: studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 27-35.
- Anónimo (2012). Medronhos e um passeio. Uma pedra de sal. Acedido em 20 de Abril de 2014. <http://umapedradesal.blogspot.pt/2012/11/medronhos-e-um-passeio.html>.
- Anónimo (n.d.). Aljezur, SW Portugal. Acedido em 20 de Abril de 2014. [http://www.aljezurswportugal.com/index.php?route=product/product&product\\_id=98](http://www.aljezurswportugal.com/index.php?route=product/product&product_id=98).
- Anónimo (n.d.). Confraria do Medronho “Os Monchiqueiros”. Acedido em 20 de Abril de 2014. <http://confrariadomedronhomonchique.blogspot.pt/2012/12/tiago-laginha-gold-regional-nature.html>.
- Anónimo (n.d.). Fitoterapia. Modo de Preparar os Chás. Blogue. Acedido em 20 de Abril de 2014. <http://alquimiamistyka.blogspot.pt/2012/03/fitoterapia-modo-de-preparar-os-chas.html>.
- Ascensão, L. & Pais, M. S. (1987). Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *maritima*): ontogeny and histochemistry of secretor products. *Botanical Gazzete*, 148, 221-227.



- Ascensão, L. & Pais, M. S. (1998). The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: Histochemistry, ultrastructure and secretion. *Annals of Botany*, 81, 263-271.
- Ascensão, L. (2007). Estruturas secretoras em plantas. Uma abordagem morfo-anatómica. Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas. Curso Teórico-Prático, pp, 19-28. Centro de Biotecnologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Ascensão, L., da Silva J. A. T., Barroso, J. G., Figueiredo, A. C., Pedro, L. G. (2011). Glandular trichomes and essential oils of *Helichrysum stoechas*. *Israel Journal of Plant Science*, 49, 115-122.
- Ascensão, L., Figueiredo, A., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Schriepsema, J., Deans, S. G., Scheffer, JJ. (1998). *Plectranthus madagascariensis*: morphology of the glandular trichomes, essential oil composition and its biological activity. *International Journal of Plant Science*, 159, 31-38.
- Ascensão, L., Marques, N., Pais, M. S. (1995). Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany*, 75, 619- 626.
- Ascensão, L., Marques, N., Pais, M. S. (1997). Peltate trichomes of *Leonotis leonurus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions. *International Journal of Plant Science*, 158, 247-256.
- Ascensão, L., Mota, L., Castro, M. M. (1999). Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany*, 84, 437-447.
- Becerra, J. & Ezcurra, J, (1986). Glandular hairs in the *Arbutus xalapensis* complex in relation to herbivory. *American Journal of Botany*, 73(10), 1427-1430.
- Brosse, J. (2010). Larousse des Arbres: Dictionnaire des arbres et des arbustes. Larousse.
- Bruneton, J. (1991). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 2<sup>a</sup> ed. Lavoisier. Paris.
- Cain, AJ. (1947). The use of the Nile blue in the examination of lipids. *Journal of Microscopy Science*, 88, 383-392.

- Canhoto, J. M. (2010). Biotecnologia vegetal, da clonagem de plantas à transformação genética. Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Carcache-Blanco, E. J., Cuendet, M., Park, E. J., Su, B. N., Riviero-Cruz, J. F., Farnsworth, N. R., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. (2006). Potential cancer chemopreventive agentes from *Arbutus unedo*. Natural Product Research, 20, 327-334.
- Cardoso, PR. (2011). Estruturas Secretoras em Plantas. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, São Paulo.
- Castaldi, S., Carfora, A., Fiorentino, A., Natale, A., Messere, A., Miglietta, M., Cotrufo, F. (2009). Inhibition of net nitrification activity in a Mediterranean woodland: possible role of chemicals produced by *Arbutus unedo*. Plant Soil, 315, 273-283.
- Castro, M. M. & Machado, S. R. (2006). Células e tecidos secretores (2<sup>a</sup>ed). In Anatomia vegetal (Apezato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S. M., eds). Universidade Federal de Viçosa.
- Ceccherini, L., Raddi, S., Andreoli, C. (1998). The effect of seed stratification on germination of 14 *Cupressus* species. Seed Science Technology, 26, 159-168.
- Celikel, G., Demirsoy, L., Demirsoy, H. (2008). The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. Scientia Horticulturae, 118, 115-119.
- Charrière-Ladreix, Y. (1976). Rèpartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. Planta, 129, 167-174.
- Chawla, HS. (2010). Introduction to plant biotechnology. Enfield: Science Publishers.
- Croteau, R. (1998). Catabolismo of monoterpenes in essencial oil plants. In “Flavours and Fragrances: A World Perspective” (Lawrence, B. M., Mookherjee, B.D., Willis, B. J., eds). Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congresso f Essencial Oils, 1986, pp, 65-83, Elsevier, Amsterdam.
- Dadalioglu, I. & Evrendilek, G. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects os essencial oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), spanish lavender (*Lavandula stoechas*) and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne patogens. Journal of Agriculture Food and Chemistry, 52, 8255-8260.

- David, R. & Carde, J. P. (1964). Coloration différentielle des pseudophylles de Pin maritime au moyen du réactif de Nadi. Academy of Sciences of Paris, Série D, 258, 1338-1340.
- De Fossard, R. A., Nitsch, C., Cresswell, R. J., Lee, H. C. M. (1974). Tissue and organ culture of Eucalyptus. New Zealand Journal For Science, 4, 267-278.
- Demarco, D. (2005). Estruturas secretoras florais e coléteres foliares em espécies de cerrado de *Aspidosperma* Mart. e *Blepharodon* Decne. (Apocynaceae), SP, Brasil. Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Demirsoy, L., Demirsoy, H., Celikel, G., Macit, I., Ersoy, B. (2010). Seed treatment with GA3 or stratification enhances emergence of some strawberry tree genotypes – Short communication. Horticultural Science. 37, 34-37.
- Duke, S. O. (1994). Glandular trichomes - a focal point of chemical and structural interactions. International Journal of Plant Sciences, 155(6), 617-620.
- Edris, A. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. Phytother Res 21, 308-323.
- Ellison, A. M. (2006). Nutrient limitation and stoichiometry of carnivorous plants. Plant Biology, 8, 740-747.
- Endress, P. K. (1994). Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge, Cambridge University Press.
- Ertabaklar, H., Kivcak, B., Mert, T., Töz, S. O. (2009). *In vitro* activity of *Arbutus unedo* leaf extracts against *Trichomonas vaginalis* trophozoites. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 33(4), 263-265.
- Ertekin, M. & Kirdar, E. (2010). Breaking seed dormancy of the strawberry tree (*Arbutus unedo*). International Journal of Agriculture & Biology, 12, 57-60.
- Esau, K. (1977). Anatomy of Seed Plants. 2<sup>nd</sup>, Willey, New York.
- Evert, R. F. (2006). Esau's Plant Anatomy. Meristems, Cells and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function and Development. 3<sup>rd</sup>ed, Wiley, New Jersey.
- Fahn, A. (1979). Secretory tissues in plants. Academic Press, London.

- Fahn, A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol*, 108, 229-257.
- Fahn, A. (1990). *Plant Anatomy*. 4<sup>th</sup> Edition. Pergamon Press, Oxford.
- Farmacopeia Portuguesa VIII (2005) INFARMED, Vol I. Lisboa.
- Feder, N. & O'Brien, T. P. (1968). Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*, 55, 123-142.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J., Pedro, L. G., Scheffer, J. J. C. (1997). Physiological aspects of essential oil production. In Franz C, Máthé Á, Buchbauer G (eds). 27<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils. *Essencial Oils: basic and applied research*, pp, 95-107.
- Figueiredo, A. C. S., Barroso, J. M. G., Pedro, L. M. G., Ascensão, L. (2007). *Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos*. Centro de Biotecnologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 1<sup>a</sup> ed. Repro 2000, Lisboa.
- Fiorentino, A., Castaldi, S., D'Abrosca, B., Natale, A., Carfora, A., Messere, A., Monaco, P. (2007). Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 809-811.
- Fisher, D. B. (1968). Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*, 16, 92-96.
- Gang, D. R. (2005). Evolution of flavours and scents. *Annual Review Plant Biology*, 56, 301-325.
- Gaspar, E., Neves, H., Noronha, J. (1997). Application of HPLC-PBMS to the identification of unknown components in a triterpenoid fraction of *Arbutus unedo* fruits. *Journal of High Resolution Chromatography*, 20, 417-420.
- Glauert, A. M., Lewis, P. R. (1998). *Biological Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy*, vol. 17. Portland Press. London.

- Godinho, B., Abreu, MM. & Magalhães, MC. (2010). Avaliação biogeoquímica dos solos e do medronheiro na área mineira da Panasqueira. *Revista de Ciências Agrárias*, 33, 226- 235.
- Godinho-Ferreira, P. G., Azevedo, A. M., Rego, F. (2005). Carta da tipologia florestal de Portugal Continental. *Silva Lusitana*, 13, 1–34.
- Gomes, F. & Canhoto, J. M. (2009). Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Development Biology Plant*, 45, 72-82.
- Gomes, F. (2011). Strategies for the improvement of *Arbutus unedo* L. (Strawberry tree): *in vitro* propagation, mycorrhization and diversity analysis. Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra.
- Gomes, F., Lopes, M. L., Santos, T., Canhoto, J. M. (2009). Micropropagation of selected trees of *Arbutus unedo* L. through axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 839, 111-116.
- Gomes, F., Machado, H., Martin, E. S., Portugal, A., Canhoto, J. M. (2013). Mycorrhizal synthesis between *Pisolithus arhizus* and adult clones of *Arbutus unedo* in vitro and in nursery. *Journal of Forestry Research*, 24(4), 659–670.
- Gomes, F., Simões, M., Lopes, M. L., Canhoto, J. M. (2010). Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). *New Biotechnology*, 27, 882-892.
- González, G. L. (2006). Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares: especies silvestres y las principales cultivadas. 2ª Edição. Madrid, MundiPrensa.
- Goodwin, T. W. & Mercer, E. I. (1983). “Introduction to Plant Biochemistry”, 2<sup>nd</sup>. Pergamon Press, Oxford.
- Gratani, L., & Ghia, E. (2002). Adaptative strategy at the leaf level of *Arbutus unedo* L. to cope with Mediterranean climate. *Flora*, 197, 275-284.
- Greek strawberry tree fruits from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 619-623.

- Hagemeyer, J. & Waisel, Y. (1988). Excretion of ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) by *Tamarix aphylla*. *Physiologia Plantarum*, 73, 541-546.
- Hall, J. L. (1978). *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. Elsevier, New York.
- Hallahan, D. L. & Gray, J. C. (2000). *Plant Trichomes. Advances in Botanical Research, incorporating advances in plant pathology*, vol. 31, Academic Press, London. ISBN 0-12-005931-2.
- Hammami, I., Jellali, M., Ksontini, M., Rejeb, M. N. (2005). Propagation of the strawberry tree through seed (*Arbutus unedo*). *International Journal of Agriculture & Biology*, 7, 457-459.
- Harborne, J. B. (2001). Twenty-five years of chemical ecology. *Nat Prod Rep*, 18, 361-379.
- Johanson, D. A. (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York.
- Juniper, B. E., Robins, R. J., Joel, D. M. (1989). *The Carnivorous Plants*, 1<sup>st</sup> Ed. Academic Press Limited, London.
- Kisser, J. (1958). Der Stoffwechsel sekundärer Pflanzenstoffe. In "Handbuch der Pflanzenphysiologie", vol. 10 (Ruhland W, ed), pp, 91-131. Springer, Berlin.
- Kivcak B., Mert, T. (2001). Quantitative determination of  $\alpha$ -tocopherol in *Arbutus unedo* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*, 72, 656-661.
- Kivcak, B., Mert, T., Demirci, B., Baser, K. H. C. (2001). Composition of the essential oil of *Arbutus unedo*. *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 37(5).
- Kivcak, B., Mert, T., Ertabaklar, H., Balcioğlu, C., Töz, S. Ö. (2009). *In vitro* Activity of *Arbutus unedo* Against *Leishmania tropica* Promastigotes, 33(2), 114-115.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head to Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Legssyer, A., Ziyat, A., Mekhfi, H., Bnouham, M., Herrenknecht, C., Roumy, V., Fourneau, C., Laurens, A., Hoerter, J., Fischmeister, R. (2004). Tannins and catechin

gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta. *Phytotherapy Research*, 18, 889-894.

Levin, D. A. (1973). The role of trichomes in plant defense. *Quarterly Review of Biology*, 94, 2027-2036.

Mace, M. E. (1963). Histochemical localization of phenols in healthy and diseased banana roots. *Physiologia Plantarum*, 16, 915-925.

Males, Z., Plazibat, M., Vundać, V. B., Zuntar, I. (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the Strawberry tree – *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharmaceutical*, 56(2), 245-250.

Malheiro, R., Sá, O., Pereira, E., Aguiar, C., Baptista, P., Pereira, J. A. (2012). *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, 37, 473-478.

Martins, J. (2012). Estudos de cultura *in vitro* em medronheiro (*Arbutus unedo* L.) aplicados ao seu melhoramento. Dissertação, Universidade de Coimbra.

Mayer, J. L. S., Cardoso-Gustavson, P., Appezzato-da-Glória, B. (2011). Colleters in monocots: New record for Orchidaceae. *Flora*, 206, 185-190.

Mazia, D., Brewer, P. A., Alfert, M. (1953). The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biology Bulletin*, 104, 57-67.

McManus, J. F. A. (1946). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*, 23, 99-108 modificado por Feder, N. & O'Brien, T. P. (1968). Plant microtechnique: some principals and new methods. *American Journal of Botany*, 55, 123-142.

Meira, R. M. S. A., Francino, D. M. T., Ascensão, L. (2014). Oleoresin Trichomes of *Chamaecrista dentata* (Leguminosae): Structure, Function and Secretory Products. *International Journal of Plant Sciences*, 175(3), 336-345.

Mendes, L., Freitas, V., Baptista P., Carvalho, M. (2011). Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2285-2291.

- Mereti, M., Grigoriadou, K., Nanos, G. (2002). Micropropagation of the Strawberry tree, *Arbutus unedo* L. *Scientia Horticulturae*, 93, 143-148.
- Metaxas, D. J., Syros, T. D., Yupsanis, T., Economou, A. E. (2004). Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. *Plant Growth Regulation*, 44, 257-266.
- Metcalfe, C. R. & Chalk, L. (1983). "Anatomy of the Dicotyledons", 2<sup>nd</sup> ed, vol II, "Wood Structure and Conclusion of the General Introduction". Clarendon Press, Oxford.
- Milhau, G., Valentin, A., Benoit, F., Mallie, M., Bastide, J., Pelissier, Y., Bessiere, J. (1997). *In vitro* antimicrobial activity of eight essential oils. *J Essent Oil Res*, 9, 329-333.
- Mirande R. (1920). Sur le carmin aluné et son emploi, combine avec celui du vert du iode. *Histologie végétale CR, Academy of Science*, 170, 197-199.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology of Plant*, 15, 473-497.
- Nicolson, S. W., Nepi, M., Pacini, E. (2007). *Nectaries and nectar*. Springer-Verlag, The Netherlands.
- O'Connell, K. L. & Stults, J. T. (1997). Identification of mouse liver proteins on two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *in situ* enzymatic digests. *Electrophoresis*, 18, 349-359.
- Oliveira, I., Baptista, P., Bento, A., Pereira, J. A. (2011). *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. *Journal of Food and Nutrition Research*, 50(2), 73-85.
- Oliveira, I., Baptista, P., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., Pereira, J. A. (2011). Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International*, 44, 1401-1407.
- Oliveira, I., Coelho V., Baltasar R., Pereira, J. A., Baptista, P. (2009). Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1507-1511.



- Oliveira, I., Pinho, P G., Malheiro, R., Baptista, P., Pereira, J. A. (2011). Volatile profile of *Arbutus unedo* L. fruits through ripening stage. *Food Chemistry*, 128, 667-673.
- Orak, H. H., Yagar, H., Isbilir, S. S., Demirci, A. Ş., Gümüş, T., Ekinci, N. (2011). Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of Strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf. *Food Sci. Biotechnol*, 20(5), 1249-1256.
- Owen, T. P. & Thomson, W. W. (1991). Structure and function of a specialized cell Wall in the trichomes of the carnivorous bromeliad *Brocchinia reducta*. *Canadian Journal of Botany*, 69, 1700-1706.
- Pacini, E., Nepi, M., Vesprini, J. L. (2003). Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution*, 238, 7-22.
- Paiva, N. L. (2000). An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant-microbe communication. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19, 131-143.
- Pearse, A. G. E. (1968). *Histochemistry. Theoretical and Applied*, (3<sup>rd</sup> ed). Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Pedro, J. G. (1994). Portugal Atlas do Ambiente. Notícia Explicativa II.6. Carta da distribuição de figueira e medronheiro. Lisboa: Ministério do Ambiente e Recursos Naturais, pp.39.
- Piotto, B., Bartolini, G., Bussotti, F. (2001). Schede informative sulla propagaione per seme degli alberi e degli arbusti più diffusi della flora mediterranea. In: Piotto B, Noi A (eds) *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*, Dipartimento Prevenzione e Risanamento Ambientali, Manuale ANPA (Agenz. Naz. per la Protezi. dell Ambiente), 32-38, ISBN 88-448-0271-6.
- Pizzolato, P. & Lillie, R. D. (1973). Mayer's tannic acid – ferric chloride stain for mucins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 21, 56-64.
- Prada, M. A. & Arizpe, D. (2008). *Riparian tree and shrub propagation handbook*. Valenci,a pp. 27-29, ISBN 978-84-482-4965-6.
- Proença da Cunha, A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. (2005). Fármacos aromáticos (Plantas aromáticas e óleos essenciais). Cap. 16, pp: 338-401. *In* Proença da Cunha, a. (Coord.). 2005. *Farmacognosia e Fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.

- Rost, K. and Schauer, R. (1977). Physical and chemical properties of the mucin secreted by *Drosera capensis*. *Phytochemistry*, 16, 365–368.
- Rotondi, A., Rossi, F., Asunis, C., Cesaraccio, C. (2003). Leaf xeromorphic adaptations of some plants of a coastal Mediterranean macchia ecosystem. *Journal of Mediterranean Ecology*, 4(3-4), 25-35.
- Salgueiro, L. R. (1994). Os tomilhos portugueses e seus óleos essenciais. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Sanjust, E., Mocci, G., Zucca, P., Rescigno, A. (2008). Mediterranean shrubs as potential antioxidant sources. *Natural Product Research*, 22, 689-708.
- Serçe, S., Özgen, M., Torun, A. A., Ercişli, S. (2010). Chemical composition, antioxidant activities and total phenolic content of *Arbutus andrachne* L (Fam. Ericaceae) (the Sangwan N S, Farooqui AHA, Shabih F, Sangwan RS (2001) Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul*, 34, 3-21.
- Silva, J. (2007). Árvores e Florestas de Portugal Vol. V, Floresta e Sociedade. Público pp 143-145 ISBN 978-989-619-102-3.
- Simoneit, B. R. T., Medeiros, P. M., Wollenweber, E. (2008). Triterpenoids as Major Components of the Insect-Trapping Glue of *Roridula gorgonias*. *Z. Naturforsch*, 63(c), 625-630.
- Sirova, D., Borovec, J., Santruckova, H., Santrucek, J., Vrba, J., Adamec, L. (2010). *Utricularia* carnivory revisited: plants supply photosynthetic carbon to traps. *Journal of Experimental Botany*, 61, 99–103.
- Smiris, P., Pipinis, E., Aslanidou, M., Mavrokordopoulou, O., Milios, E., Kouridakis, A. (2006). Germination study on *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) and *Podocytisus caramanicus* Boiss. & Heldr. (Fabaceae). *Journal of Biological Research*, 5, 85-91.
- Sorensen, P. D. (1987). *Arbutus tessellata* (Ericaceae), new from Mexico. *New York Botanical Garden*, 39(2), 263-267.
- Spurr, A. R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26, 31-43.

Svoboda, K. P. & Svoboda, T. G. (2000). Secretory structures of aromatic and medicinal plants. Microscopix Publications.

Tenhunen, J. D., Lange, O. L., Jahner, D. (1982). The control by atmospheric factors and water stress of midday stomatal closure in *Arbutus unedo* growing in a natural macchia. *Oecologia*, 55, 165-169.

Theobald, W. L., Krahulik, R. C., Rollins, R. C. (1980). Trichome description and classification. In: Metcalf CR, L Chalk L (eds). *Anatomy of Dicotyledons*, 2<sup>nd</sup> ed., vol. I, p, 40-53. Clarendon Press, Oxford.

Tilki, F. (2004). Improvement in seed germination of *Arbutus unedo* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7, 1640-1642.

Tisserand, R., Balacs, T. (1995). *Essencial oil safety. A guide for health care professionals*. Churchill livingstone. Edinburg, Hong-Kong, London, Madrid, Melbourne, New York and Tokyo.

Torres, J. A., Valle, F., Pinto, C., García-Fuentes, A., Salazar, C., Cano, E. (2002). *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. *Plant Ecology*, 160, 207-223.

Uphof, JCT. (1962). "Plant Hairs". *Encyclopedia of Plant Anatomy IV*, vol. 5, pp, 1-206. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Nikolassee.

Voight, D., Gorb, S. (2010). Desiccation resistance of adhesive secretion in the protocarnivorous plant *Roridula gorgonias* as na adaptation to periodically dry environment. *Planta*, 232, 1511-1515.

Wagner, F. (1991). Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology*, 96, 675-679.

Wagner, G. J., Wang, E., Shepherd, R. W. (2004). New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. *Annals of Botany*, 93, 3-11.

Waisel, Y. (1972). "Biology of Halophytes". Academic Press, New York.

Web site of the Global Facilitation Unit for Underutilized Species (2008) Acedido em 20 de Abril de 2014. [www.biodiversityinternational.org](http://www.biodiversityinternational.org).

Werker, 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*. *Israel Journal of Botany*, 34, 31-45.

Wiemer, A. P., Moré, M., Benitez-Vieyra, S., Cocucci, A. A., Raguso, R. A., Sérsic, N. A. (2009). A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cuclopogon elatus* (Orchidaceae). *Plant Biology*, 11, 506-514.



