

Análise de ductos secretores e da composição e actividade biológica de óleos essenciais de *Pinus pinaster*

João Vidigal, Laura Barrão, Nuno Domingues, Nuno Gonçalves e Raquel Alves

Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Ed.C2, 1749-016 Lisboa, Portugal

Entregue a 15 de Janeiro de 2010

Enquanto produtos do metabolismo secundário das plantas, os óleos essenciais secretados são de extrema importância para a sua manutenção e funcionamento, apesar de não directamente vinculados ao metabolismo primário. Além de possuírem inúmeras actividades que beneficiam a planta, como agentes de defesa, atractores de polinizadores, entre outros, são também muitas vezes procurados pelo seu valor comercial, com aplicação em variadas indústrias. A espécie de estudo seleccionada foi *Pinus pinaster*, uma conífera típica da bacia mediterrânica, caracterizada pela existência destes metabolitos secundários sob a forma de óleoresinas, presentes em estruturas secretoras internas e individualizadas, denominadas de ductos. Para caracterizar estas estruturas e os compostos nelas presentes, procederam-se a testes histoquímicos e para uma análise quantitativa, além de qualitativa, fez-se a extracção dos óleos essenciais seguida de cromatografia e espectrometria de massa de modo a se obterem as suas percentagens relativas. Foram identificados monoterpenos e sesquiterpenos, sendo os dominantes o α -pineno, β -pineno, α -terpineol, e, num dos três quimiotipos utilizados para estudo comparativo, o α -felandreno. Estas espécies químicas, produtos naturais do metabolismo vegetal, revelam-se determinantes para a interacção da planta com o meio ambiente, predominantemente nas suas capacidades de defesa, facto demonstrado através de um ensaio biológico para averiguação de alelopatia.

INTRODUÇÃO

As coníferas (ordem Coniferales) ocupam a maior extensão da Terra entre as plantas (Phillips e Croteau, 1999), sendo os cones reprodutores e as suas folhas em forma de agulha o que as distingue das restantes gimnospérmicas (Singhi *et al.*, 1999). Entre elas encontra-se a família Pinaceae, que constitui a maior família de gimnospérmicas no mundo (Wu e Hu, 1997). *Pinus pinaster* Aiton., uma espécie com distribuição maioritariamente a oeste do Mediterrâneo (Ottavioni *et al.*, 2008), ao longo da costa Atlântica, (Macchioni *et al.*, 2003) faz parte desta família e como todas as plantas produz óleos essenciais, mas também resina, sendo a sua mistura designada de óleoresina.

Os óleos essenciais são misturas de compostos naturais voláteis originados no metabolismo secundário das plantas (Bakkali *et al.*, 2008), que emanam odor. Podem ter diversas actividades na sua protecção, como anti-microbiana, anti-herbivoria, entre muitas outras. Os monoterpenos são dos compostos mais relevantes dos óleos na função de defesa contra agentes patogénicos e contra a herbivoria (Santos *et al.*, 2006), podendo-se também salientar as outras fracções mais abundantes, como os sesquiterpenos e os fenilpropanóides. As plantas segregam estes compostos voláteis não só para actuarem na sua defesa, mas também como atractivos de

agentes polinizadores e noutras estratégias de comunicação com os organismos e o ambiente que as rodeiam.

Na família Pinaceae os óleos essenciais são quase na totalidade idênticos à componente volátil da óleoresina, onde se podem encontrar essencialmente monoterpenos e sesquiterpenos que constituem a fracção volátil, a turpentina (Phillips & Croteau, 1999). A fracção maioritariamente não volátil é designada de rosina e é constituída por ácidos diterpénicos. Os óleos essenciais nas folhas de pinheiro chegam a conter mais de 50 compostos em algumas espécies, sendo a sua constituição essencialmente a mesma da turpentina (Vallejo *et al.*, 1994). Estes são produzidos pelas células epiteliais de ductos resiníferos e segregados para o seu lúmen. Os ductos diferem entre géneros (Wu e Hu, 1997) e são utilizados como indicadores quimiotaxonómicos (Vallejo *et al.*, 1994) e marcadores bioquímicos da origem de diferentes espécies de *Pinus* (Arrabal *et al.*, 2005).

Nas folhas de *Pinus*, os ductos estão rodeados por uma camada de células de parede celular fina e não lenhificada (Wu e Hu, 1997), células vivas que formam o epitélio e células da bainha. Estas últimas são muito ricas em pectinas e podem incluir células mortas que formam um cilindro em torno das células epiteliais, ficando esmagadas aquando da expansão e crescimento dos ductos. Os ductos em si podem ser primários ou secundários. Nas folhas, os primários aparecem no mesófilo apical, paralelos ao eixo longitudinal da

folha, e na porção basal, podem ser distinguidos dois ductos laterais abaxiais. Os ductos secundários são contínuos com os vasos do xilema secundário do eixo dos braquiblastos e acabam pouco acima da base da folha (Fahn, 1990; Werker e Fahn, 2008).

Em *Pinus* existem preocupações na actualidade relacionadas com a sua susceptibilidade a predadores, como a lagarta processionária do pinheiro *Thaumetopoea pityocampa* (Tiberi *et al.*, 1999) ou o nemátode do pinheiro *Bursaphelenchus xylophilus* (Li *et al.*, 2007), uma situação preocupante a nível mundial que afecta fortemente Portugal.

A alelopatia é definida como a interacção entre plantas ou entre estas e outros organismos (Singh *et al.*, 1999), através de metabolitos secundários segregados, que podem ter efeitos no crescimento das organismos alvo, aumentando, reduzindo, ou mesmo inibindo completamente o seu desenvolvimento (Singh *et al.*, 1999; Siddiqui *et al.*, 2009). A actividade biológica de um dado aleloquímico depende tanto da concentração como do limite da resposta da espécie afectada. Essas substâncias pertencem a diferentes categorias de compostos, tais como fenóis, terpenos, alcalóides, poliacetilenos, e péptidos provenientes de diferentes órgãos, incluindo folhas, flores e frutos de muitas espécies vegetais (Rice, 1984). De modo a determinar os efeitos fitotóxicos de substâncias alelopáticas, fazem-se ensaios em *Lemna minor* (Leather & Einhellig, 1988; Lockhart *et al.*, 1989; Vesonder *et al.*, 1992). Trata-se de uma pequena angiospérmica aquática que consiste numa raiz e numa fronde (Einhellig *et al.*, 1985). Estes factos explicam a utilização dos ensaios em *L. Minor*, pois são rápidos (Vesonder *et al.*, 1992) e maximizam a sensibilidade do teste, enquanto as amostras necessárias ao ensaio são mínimas quando comparadas com outras espécies (Einhellig *et al.*, 1985; Vesonder *et al.*, 1992).

Neste trabalho pretendeu-se extrair o óleo essencial de 3 indivíduos de *Pinus pinaster* diferentes, para identificação dos compostos presentes e determinou-se ainda a sua actividade biológica num ensaio em *Lemna minor* e *Pisum sativum*. Para além disso, identificou-se as estruturas secretoras dos diferentes compostos com testes histoquímicos, com fim a detectar diferencialmente a sua presença nos vários tecidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Histoquímica: A **microscopia óptica de campo claro** (luz visível) foi feita com microscópio Leitz SM-Lux e câmara Leica WILD MPS52 e a **microscopia de fluorescência** (luz ultravioleta) em microscópio Leitz Dialux com câmara Leica WILD MPS52). As imagens foram obtidas em ambos os casos, em filme Kodak Professional Elite Chrome 400. A detecção diferencial de terpenóides, nomeadamente de essências e ácidos resínicos, em luz visível, foi efectuada através do reagente de Nadi, à temperatura ambiente, no escuro, durante 60 a 90 minutos, tendo-se procedido a uma lavagem em líquido de extracção durante 2 min. A detecção geral de lípidos, a luz visível, foi efectuada através dos corantes negro de sudão B e vermelho de sudão IV (Pearse 1980), numa solução saturada (0,3%) em etanol a 70%, durante cerca de 15 min. Seguidamente efectuou-se uma lavagem rápida em etanol a 70% e outra em água. Foi também utilizado o vermelho de sudão 7B [2] a 0,1% em polietilenoglicol 400 e glicerol a 90% (v/v) durante cerca de 60 minutos, lavando-se de seguida em água. Para a

observação de lípidos em luz ultravioleta, utilizou-se uma solução de vermelho neutro, a 0,1% em tampão fosfato de sódio a 0,1% pH6,5 durante 20 min, lavando-se rapidamente em água. Os fenóis foram caracterizados em luz visível, através do dicromato de potássio [9] a 10% durante cerca de 30 minutos, repetindo a lavagem rápida em água. Relativamente à detecção dos flavonóides, foram utilizados dois comprimentos de onda, um em luz ultravioleta e outro para a luz azul.

Os hidratos de carbono foram detectados em luz visível através da utilização do ácido periódico-reagente de Schiff (PAS). Foi utilizada uma solução de tetrahidreto boreto de sódio a 1%, durante 30 min, uma solução de ácido periódico a 1% durante 10 min, efectuando-se uma lavagem rápida em água. O reagente de Schiff actuou durante cerca de 30 min, procedendo-se a uma lavagem em solução de metabissulfito de sódio a 0,5% durante 2 minutos, repetindo o procedimento 3 vezes. Lavou-se novamente em água. Todos os compostos identificados nas respectivas estruturas anatómicas da planta (cortes transversais da folha e caule) foram posteriormente observados por **microscopia electrónica de varrimento** (Microscópio JEOL T220 com 20 Kv) após terem sido sujeitas a uma metalização por fina camada de ouro com cerca de 500 Å num aparelho Polaron E5300 e secagem num aparelho de ponto crítico Biorad. As imagens captadas foram registadas em filme Kodak a preto e branco Tmax 100.

Destilação: A destilação foi feita através da condensação e decantação dos mesmos compostos e os voláteis permaneceram na água de destilação, em 3 diferentes durações: 15 min, 30 min e 60 min, num aparelho de Clevenger. Começou-se por colocar-se o material biológico, previamente pesado numa balança de precisão, num Erlenmeyer com água destilada. De salientar que o material se encontrava seco, por congelação para evitar perdas nos compostos de interesse e tornando-os mais manuseáveis, mantidos dentro de sacos ou envelopes de papel, um material inócuo. Colocou-se num Erlenmeyer o material em água sobre uma placa de aquecimento, que se ligou a 75°. Mediu-se o rendimento da destilação pela escala graduada do aparelho (1 mL=0,05%).

Destilação/Extracção: Foi feita com um aparelho de Likens-Nickerson (fig), não graduado, usando-se como solvente orgânico pentano e mantido a 25°C numa manta de aquecimento. Num Erlenmeyer (2-3 L) com o material em água destilada, sobre placa de aquecimento (75%). O óleo diluído no pentano foi recolhido no balão onde se encontra o restante solvente e após o fim do tempo de destilação (15,30 e 60 min), recorreu-se à utilização de um evaporador rotativo (Yamato Rotary Evaporator RE-51), para remoção do pentano e se obter maior concentração do óleo. Utilizaram-se 70/80 rotações/min.

Cromatografia Gás-Líquido: As análises quantitativas de cromatografia gás-líquido (CGL) foram efectuadas num cromatógrafo Perkin Elmer 8700 equipado com dois detectores de ionização de chama (DIC), um sistema de tratamento de dados e um injector, no qual foram instaladas duas colunas de polaridade diferente: DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone (30m x 0,25mm d.i., espessura de filme 0,25µm; J & W Scientific Inc.) e DB-17HT de sílica fundida (30m x 0,25mm d.i., espessura de filme 0,25µm; J & W Scientific Inc.). Através de uma rampa de temperaturas, a temperatura do forno foi de 45°C a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a

15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida isotérmica durante 10 min, de modo a limpar a coluna de qualquer resíduo. As temperaturas do injector e dos detectores foram de 290°C e 280°C, respectivamente. O hidrogénio foi o gás de arrasto, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s. Relação de repartição de fluxo, 1:50. A composição percentual dos óleos foi determinada pela integração das áreas dos picos sem utilização de factores de correcção. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de duas injeções.

Cromatografia Gás-Líquido - Espectrometria de Massa: Nas análises qualitativas de cromatografia gás líquido/espectrometria de massa (CGL-EM) utilizou-se um Autosystem XL equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30m x 0,25mm d.i., espessura de filme 0,25µm; J & W Scientific Inc.) ligado a um Perkin-Elmer Turbomass (versão de programa 4.1). Através de uma rampa de temperaturas, a temperatura do forno foi programada de 45° a 175 °C, com incrementos de 3 °C/min, e subsequentemente a 15 °C/min até 300 °C. Atingidos os 300 °C a temperatura foi mantida isotérmica (de forma a limpar a coluna de resíduos) durante 10 min; temperatura da linha de transferência, 280 °C; temperatura da câmara de ionização, 220 °C; gás de arrasto, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s; relação de repartição de fluxo, 1:40; energia de ionização, 70eV; corrente de ionização, 60µA; gama de massas, 40-300u; tempo de varrimento, 1s. A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção, em relação aos dos *n*-alcanos C₈-C₂₄ e espectros de massa, utilizando-se o software Turbomass e com o auxílio da biblioteca construída na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Ensaio biológico: Foram utilizadas duas espécies, *Lemna minor* e *Pisum sativum*. Em *Lemna minor* utilizaram-se caixas com vários poços, procede-se à divisão das amostras em diferentes concentrações de óleo e água de destilação. Em todas as placas foram usadas 4 indivíduos de *L.minor*, excepto na 7 que se usaram 10. Na placa 7 foram utilizados 6 poços com diferentes concentrações de óleo, nos quais os 3 primeiros continham 30 µl e os 3 seguintes 15 µl. No controlo e nas placas 1, 2 e 7 foram colocados 3 ml de água em cada poço, acrescentando-se as respectivas diluições dos óleos em etanol (2:3 na placa 1; 1:3 na placa 3). Nas restantes, foram colocados 3 ml de água de destilação (água obtida na extracção dos óleos) a diferentes tempos (15 min e 30 min, placas 3 e 5) e nas placas 4 e 6 juntaram-se ainda 15 µL do óleo extraído. Durante um período de 8 dias, as plantas foram mantidas a uma temperatura constante de 24°C, estando expostas a um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas sem iluminação. Foi também analisada a actividade do óleo nas folhas de *Pisum sativum*, visto que esta é uma espécie modelo no estudo da produção de fitoalexinas. Foram utilizadas caixas de Petri contendo uma folha de ervilha, com a página superior para baixo, sulfato de cobre utilizado como indutor abiótico (3 gotas, caixa 1), algumas de gotas de óleo essencial (caixa 2 e 3) e água a cobrir o fundo de cada uma das caixas.

RESULTADOS

Microscopia electrónica de varrimento: Através de microscopia electrónica de varrimento puderam-se evidenciar as os ductos resiníferos, em caules de *Pinus pinaster* (Fig.1B-

F). Os ductos secretores observados nas imagens da Fig.1 correspondem a espaços intercelulares, de forma circular a elíptica. Na Fig.1A observa-se a superfície inferior de uma folha de *Pinus pinaster*, onde se evidencia a disposição regular e paralela das longas células epiteliais, bem como das orlas elípticas das câmaras epistomáticas, a única parte do complexo estomático sempre visível na superfície da folha. Por outro lado também se verificam a existência de tricomas não glandulares defensivos, bastante aguçados. Já nas Figs.1B e D obtivemos imagens de corte transversal de caule, onde se verificam os ductos xilémicos e do córtex, vistos mais pormenorizadamente numa maior ampliação na Fig.1C e E, onde se consegue reconhecer bem os ductos bem como as células epiteliais secretoras em toda a sua extensão, sendo o ducto do córtex o da Fig.1C e o do xilema secundário o da Fig.1E.

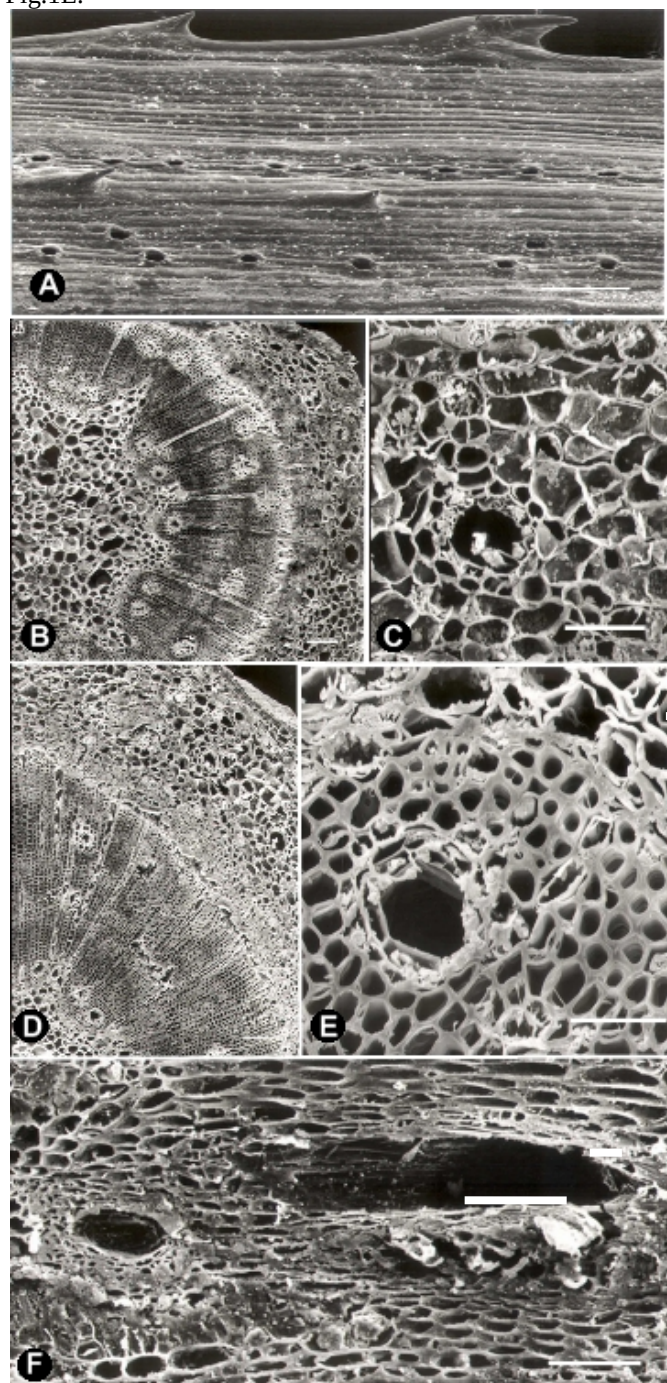


Figura 1- Microscopia electrónica de varrimento exibindo cortes de secções transversais e longitudinais revelando ductos secretores e sua dimensão em

diferentes locais de *Pinus pinaster*. A- Secção longitudinal da superfície direita da folha, 100µm; B- Corte transversal do caule, 100 µm; C- Corte transversal do caule (ampliação do ducto do cortex), 100µm; D- Corte

transversal do caule, 100µm; E- Corte transversal do caule (ampliação do ducto do xilema secundário), 100µm; F- Corte longitudinal do caule, 50µm.

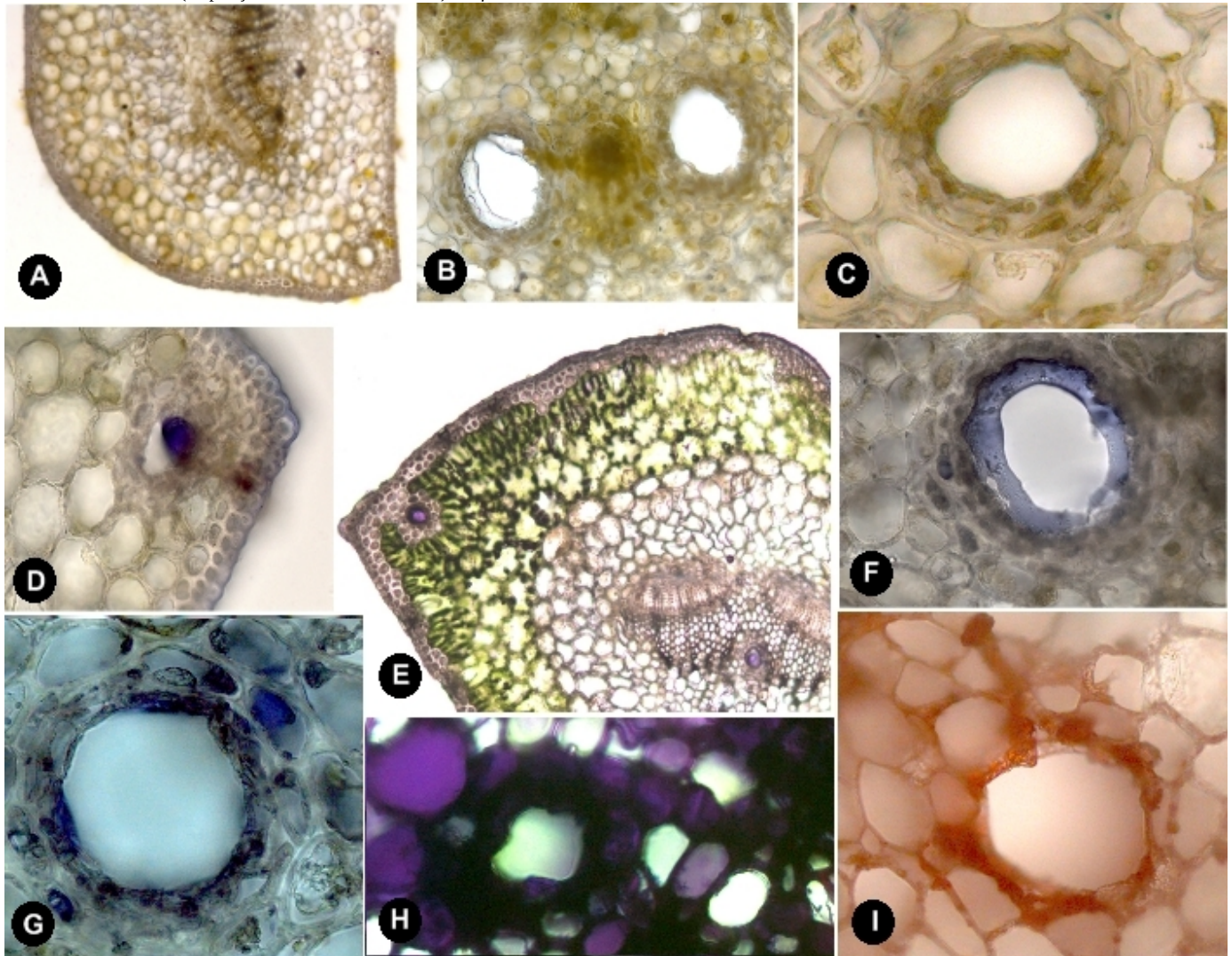


Figura 2- Microscopia óptica de campo claro de ductos secretores em cortes transversais da folha de *Pinus pinaster*. **A e B.** Testes controle, **C.** Teste com dicromato de potássio. Presença de fenóis revelada por cor castanho-avermelhado, **D,E e F.** Teste com reagente de Nadi. Coloração azulada no lúmen indicadora de maior teor de óleos essenciais e cor púrpura no exterior revelando a presença de ácidos resínicos. **G.** Teste com Negro de Sudão. Lípidos coram de azul/negro, **H.** Teste com PAS. Hidratos de carbono coram de rosa. **I.** Teste com Vermelho de Sudão IV, com os lípidos corados de vermelho.

Microscopia de campo claro: Como se pode observar na Fig.2D, E e F, o resultado do teste com o reagente de Nadi utilizado na detecção diferencial de terpenóides (nomeadamente as essências e ácidos resínicos) em luz visível foi positivo, visto observar-se um secretado de cor púrpura, o qual resulta da mistura de óleos essenciais que coram de azul com os ácidos resínicos que coram de vermelho. Portanto, a cor resultante da mistura destes compostos dependerá da predominância de cada componente. É possível verificar a existência de algum secretado de coloração ainda no lúmen dos ductos secretores (Fig.2 – D,E e F). Este apresenta-se com uma coloração azulada, o que significa ser principalmente óleo essencial. No que respeita aos compostos fenólicos, a coloração é de um tanto acastanhada perto do epitélio dos ductos, não revelando a cor castanho avermelhado, resultado positivo do teste do dicromato de potássio, indicando a inexistência de fenóis, como mostra a Fig.2C. Foi também possível detectar lípidos através do corante vermelho de sudão IV e negro de sudão B, a luz visível, onde se observa secretado com coloração vermelha, para o Vermelho de Sudão

IV, e de coloração azul, para o Negro de Sudão B, ambos fora do lúmen e principalmente evidente no epitélio desses mesmos ductos (Fig.2G e I). Através do método do PAS (ácido periódico – reagente de Schiff), fez-se uma caracterização geral dos polissacarídeos, onde se evidenciam os polissacarídeos da parede celular e alguns dentro das células circundantes evidenciado pela coloração rosa (Fig.2H). Todos estes testes devem ser comparados com os testes controle (Fig.2A e B).

Dimensões dos ductos secretores: Através da observação dos ductos secretores, por microscopia óptica e com o auxílio de uma ocular micrométrica, foram obtidos valores de diâmetro para ductos na parte basal e apical da folha. A média aritmética final resultou em 48,13 µm correspondendo à parte basal e 56,88 µm correspondentes à zona apical. O valor obtido para a área dos ductos secretores foi de 1,8 mm² para os ductos secundários da parte basal e 2,54 mm² para os primários na parte apical.

Microscopia de fluorescência: Após cortes em que não se realizou nenhum teste histoquímico (sem acrescento de

fluorocromos), observou-se a autofluorescência resultante

para luz ultravioleta e luz azul.

observável neste caso. Na Fig.3C observa-se uma fina camada de secretado na superfície do ducto, mas essencialmente ainda nas células epiteliais, indicando também a presença de fenóis.

Identificação dos compostos do óleo essencial: Com o auxílio da biblioteca da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, compararam-se os tempos de retenção para identificação dos diferentes picos presentes nos cromatogramas. Obteve-se assim as percentagens relativas de cada composto em cada uma das duas injeções para os 3 óleos essenciais analisados pela cromatografia gasosa e espectrometria de massa acopladas, respectivos aos diferentes quimiotipos de *Pinus pinaster* fornecidos (I, II, III) e calculou-se a média das duas injeções (Tabela 2). Somando-se as percentagens relativas consoante o grupo de compostos obteve-se as composições por grupos do óleo essencial, que podem ser observadas na Tabela 1. Foram identificados 25 compostos com percentagem relativa superior a 0,05%. Os compostos abaixo deste limiar foram também identificados aquando do estudo comparativo dos cromatogramas mas ignorados na apresentação dos resultados por constituírem quantidades desprezáveis no óleo essencial. Os principais grupos de compostos identificados (Tabela 1) foram os monoterpenos (95,4% de média percentual dos três quimiotipos) e os sesquiterpenos (2,4% de média percentual). Dos monoterpenos 87,9% eram hidrocarbonetos terpénicos e 7,5% eram monoterpenos oxigenados; dos sesquiterpenos 2,2% eram hidrocarbonetos sesquiterpénicos e 0,2% sesquiterpenos oxigenados.

Globalmente os compostos mais abundantes no óleo foram o α -pineno (33,5%), o β -pineno (36,3%), o α -terpineol (5,4%), o β -mirceno (3,2%), o limoneno (2,8%), o terpinoleno (2,1%) e o acetato de bornilo (1,3%). Mas, conforme seria esperado, existiam algumas diferenças entre os três quimiotipos estudados de *Pinus pinaster*. A divergência mais notável deu-se com o α -felandreno, inexistente nos quimiotipos I e III mas com uma quantidade considerável (21,7%) em II. O terpinoleno também se encontrava presente em maior percentagem neste último do que nos dois anteriores que por sua vez, continham consideráveis quantidades percentuais de feniletil 2-metil butanoato (1,9% e 1,1% respectivamente) enquanto que em II eram muito baixas.

Tabela 1 - Grupos de compostos presentes nos óleos essenciais dos quimiotipos de *Pinus pinaster* I, II e III.

Componentes agrupados	Percentagens relativas (%)			
	I	II	III	Média
Monoterpenos	95,9	97,1	93,1	95,4
Hidrocarbonetos monoterpénicos	89,5	88,9	85,2	87,9
Monoterpenos oxigenados	6,4	8,2	7,9	7,5
Sesquiterpenos	1,8	1,6	3,8	2,4
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	1,7	1,5	3,4	2,2
Sesquiterpenos oxigenados	0,1	0,1	0,4	0,2
Diterpenos	0,0	0,1	0,0	0,0
Outros	1,9	0,1	1,1	1,0

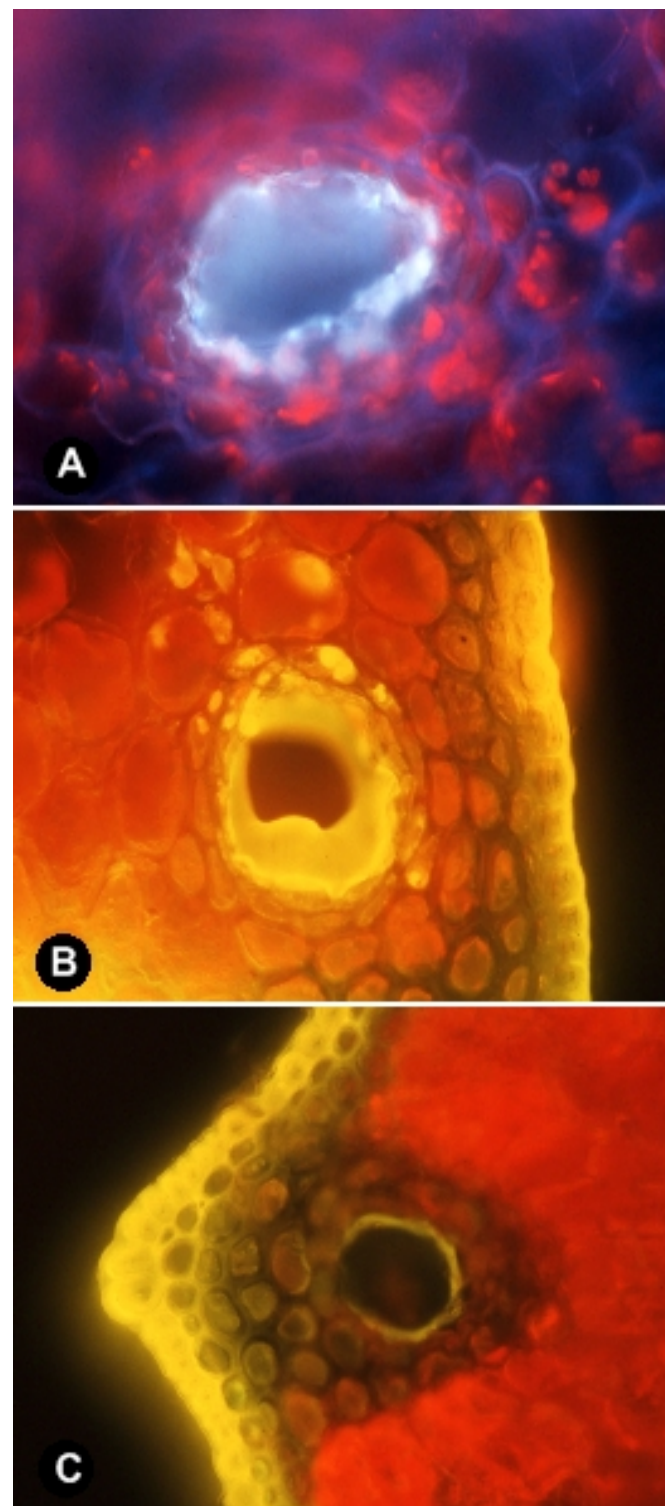


Figura 3- Cortes transversais observados com microscopia de fluorescência evidenciando a autofluorescência dos ductos secretores das folhas e caules de *Pinus pinaster*, para diferentes comprimentos de onda. A - Corte de caule em luz ultravioleta, evidência de autofluorescência com uma certa coloração branco-azulado, um sinal de fenóis no secretado; B e C - Cortes de folhas em luz azul, autofluorescência amarelo-esverdeada indica presença de fenóis.

Com a luz ultravioleta foi possível obter uma coloração com tonalidade azul esbranquiçada no lúmen do ducto e rosa no epitélio secretor (Fig.3A). Com a luz azul é possível observar uma coloração alaranjada e amarelada no lúmen (Fig.3B), indicando a presença de fenóis no secretado que foi

Tabela 2 – Componentes individuais dos óleos essenciais dos quimiotipos de *Pinus pinaster* I, II e III (RI é o índice de retenção; % de identificação corresponde à percentagem do composto no total dos constituintes do óleo).

Compostos identificados	Percentagens relativas (%)				
	RI	I	II	III	Média
α -Tujeno	924	0,1	0,1	0,1	0,1
α-Pineno	930	42,3	22,7	35,5	33,5
α -Fencheno	938	0,6	0,5	1,4	0,8
Canfeno	938	1,9	1,4	0,5	1,3
β-Pineno	963	35,7	32,8	40,3	36,3
β-Mirceno	975	4,0	2,6	2,9	3,2
α-Felandreno	995	0,0	21,7	0,0	7,2
β -Felandreno	1005	0,6	0,5	0,8	0,6
Limoneno	1009	2,9	3,1	2,4	2,8
Terpinoleno	1064	1,4	3,5	1,3	2,1
endo-Fenchol	1085	0,2	0,3	0,3	0,3
trans-Verbenol	1114	0,1	0,1	0,1	0,1
α -Felandrol*	1134	0,1	0,1	0,1	0,1
Borneol	1134	0,1	0,1	0,1	0,1
Terpinen-4-ol	1148	0,0	0,1	0,1	0,1
α-Terpineol	1159	4,3	6,3	5,7	5,4
Acetato de bornilo	1265	1,4	1,2	1,2	1,3
Longifoleno	1399	0,3	0,4	0,5	0,4
trans- β -Cariofileno	1414	1,1	0,8	1,4	1,1
α -Humuleno	1447	0,1	0,1	0,0	0,1
Fenil etil 2-metil butanoato	1467	1,9	0,1	1,1	1,0
α -Muuroleno	1494	0,1	0,1	0,1	0,1
δ -Cadineno	1505	0,1	0,1	0,3	0,2
Longiborneol	1574	0,1	0,1	0,1	0,1
Sandaracopimarinal*	2157	0,0	0,1	0,0	0,0
% de Identificação	-	99,60	98,90	98,00	98,8
Rendimento (v/p)	-	0,26	0,19	0,21	0,2

Efeito alelopático do óleo essencial de *Pinus pinaster* em *Lemna minor* e *Pisum sativum*: O óleo essencial de *Pinus pinaster* demonstrou actividade biológica sobre *Lemna minor*, sendo esta verificada 1 e 8 dias após as espécies em estudo estarem sob o efeito das várias condições utilizadas. Ao fim de 24 horas, apesar de ser pouco evidente já se notava uma ligeira alteração na pigmentação das folhas de *Lemna minor* existentes na placa 7 (placa que continha o óleo mais concentrado). Após 8 dias eram bastante evidentes as alterações na cor, observando-se um resultado bastante diferente nas amostras que estavam mergulhadas em óleo e nas que se encontravam em água de destilação. Nas placas que estavam sob o efeito do óleo (placas 1,2 e 7), foi possível verificar que as folhas que se encontravam em óleo puro (placa 7) apresentavam despigmentação total quando

comparadas com as folhas mergulhadas em óleo diluído (placas 1 e 2). Na placa 1 todas as plantas apresentam uma perda quase total de clorofila em toda a sua estrutura, verificando-se algum crescimento vegetativo. Tal facto não se verifica na placa 2, na qual quase todas as plantas apresentam perda de clorofila mas não de uma maneira tão evidente como na placa 1 (algumas delas apresentam uma coloração igual à da placa controlo). As plantas que estavam sobre o efeito da água de destilação apresentam características bem diferentes das anteriores (placas 3,4,5 e 6). Na placa 3 verifica-se alteração da estrutura, coloração, ligeiro escurecimento do meio e presença de fungos, facto este que ocorre também nas placas 4, 5 e 6, sendo que na ultima as folhas estão completamente subjugadas pelos fungos. Na placa que contém óleo puro (placa 7) observa-se

uma total despigmentação (100%), tanto nos poços com 30 µl de óleo como nos que contêm 15 µl do mesmo. Em condições controlo, não se verificou qualquer alteração na cor das folhas, observando-se algum crescimento vegetativo.

Em *Pisum sativum* também se verificam alterações provocadas pelos componentes existentes no óleo essencial do *Pinus pinaster*. Um dia após o início dos testes já era possível observar uma ligeira alteração de cor na zona de corte da planta (caixa 2). Após 8 dias era evidente a alteração em todas as plantas, tanto nas que continham óleo como na que continha sulfato de cobre (CuSO₄), que serviu como controlo positivo. CuSO₄ é uma forma do cobre disponível para ser absorvida pelas plantas. A sua toxicidade deve-se ao facto de afectar a actividade fotossintética por inibição de diversas reacções deste processo quando em concentrações excessivas. Na caixa que continha 3 gotas de CuSO₄ (caixa 1) é possível observar uma completa dissolução de uma delas com consequente descoloração da folha, principalmente na zona de contacto com a gota. Nas caixas que continham 3 gotas de óleo puro (caixa 2 e 3), apesar das concentrações de óleo usadas serem exactamente as mesmas, observou-se uma ligeira diferença na despigmentação. Na caixa 2 a folha encontra-se completamente descolorada apresentando a existência de fungos à superfície. O mesmo não acontece na caixa 3 em que é possível observar a perda de clorofila da folha apenas nas zonas de contacto com a gota de óleo. Em condições normais (caixa controlo) não se verificou qualquer alteração da estrutura e coloração da folha.

DISCUSSÃO

As dimensões obtidas das áreas dos ductos secretores secundários da parte basal rondaram os 1,8 mm para a parte basal e 2,54 mm para a parte apical. O valor mais pequeno para os ductos basais parece revelar que os ductos secundários são mais estreitos que os secundários.

Com os testes histoquímicos e posterior observação por microscopia de campo claro, microscopia electrónica de varrimento e microscopia de fluorescência, evidenciou-se a presença de vários metabolitos secundários nas células epiteliais dos ductos. Na maioria dos cortes, excepto nalguns casos em que foi possível observar uma grande quantidade de secretado no lúmen dos ductos (Fig.2D e Fig.3B), apenas era observável secretado em redor da sua parede. A luz visível, o teste com reagente de Nadi revelou a presença de terpenóides, nomeadamente óleo essencial e ácidos resínicos que coraram de azul e vermelho respectivamente. A mistura resultante destes compostos originou uma coloração púrpura, estando de acordo com os resultados esperados, uma vez que esta planta é uma grande produtora de ácidos resínicos. (Phillips e Croteau, 1999).

A presença de lípidos, a luz visível, foi evidenciada por dois testes ambos de caracterização geral, o vermelho de sudão IV e o negro de sudão B. Em todos os testes efectuados se obteve resultados positivos, isto é, o vermelho de sudão IV corou de vermelho e o negro de sudão B corou de azul negro, ambos exclusivamente para os epitélios secretores, mas não para o lúmen dos ductos. Ou seja estes resultados vêm confirmá-lo nas células epiteliais, na forma de corpos lipídicos (Jimenez, 1999), não se observando no lúmen por

não haver secretado, provavelmente devido ao corte que permitiu que escapasse.

Fazendo referência aos compostos hidrofílicos, foram detectados polissacáridos apenas nas células do epitélio do ducto e não no secretado.

Já com os compostos fenólicos não foram detectados inicialmente por luz visível, mas depois sim em microscopia de fluorescência. Sendo esta muito utilizada na caracterização histoquímica de diversas substâncias, não só pelo facto de detectar substâncias em muito baixa concentração, mas também por colocar em evidência um grande número de compostos, quer directamente quer após tratamento químico. Neste caso os fenóis, não possuem fluorescência natural, mas quando se incide um comprimento de onda UV ou de cor azul estes evidenciam autofluorescência (Hutzler e tal, 1999).

Apesar de *Pinus pinaster* não possuir uma grande diversidade de estruturas secretoras, isto é, só possui ductos resiníferos, é um grande produtor de óleo resinoso, rico em compostos terpénicos e fenólicos, evidenciados pelos diferentes testes histoquímicos realizados e pela análise da constituição do óleo essencial. Estes óleos são alvo de interesse por parte da indústria farmacêutica e química, uma vez que possuem várias características farmacopeicas e de valor comercial.

A caracterização dos voláteis emitidos pelas várias espécies do género *Pinus* tem efeito no padrão de selecção do hospedeiro por parte dos insectos herbívoros (Santos *et al.*, 2006). As diferenças no género *Pinus* parecem ser maioritariamente quantitativas, podendo as diferentes espécies dentro do género ser discriminadas. O tipo de tecido também influencia a quantidade relativa dos metabolitos secundários, podendo mesmo haver diferenciação ao nível dos diferentes enantiómeros de um composto (Santos *et al.*, 2006).

Analisando as percentagens relativas dos óleos em cada quimiotipo, foi possível identificar uma série de compostos comuns, monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, encontrados em grandes quantidades nos óleos recolhidos de *Pinus pinaster*. Como seria de esperar os mais abundantes foram α -pineno e β -pineno. De um modo geral, as plantas emitem uma maior quantidade e variedade de compostos voláteis após danos mecânicos (Dudareva *et al.*, 2004), normalmente causados por predadores, ocorrendo também este fenómeno nos pinheiros, com o α - e o β - pineno (Marpeau *et al.*, 1989). O α -pineno está envolvido na protecção contra a herbivoria e insectos fitófagos, sendo parte componente dos fenómenos de agregação e anti-agregação na sua forma enantiomérica. β -pineno foi identificado como um interveniente na defesa contra a poluição em parques, onde as plantas periféricas e mais expostas aos agentes poluentes eram mais abundantes neste composto. Ambos são importantes anti-irritantes, germicidas e fontes de químicos industriais (Dewick, 2009).

Numa outra espécie de pinheiro, *Pinus caribaea*, foram descritas significativas variações diárias da concentração de terpenos voláteis na composição dos seus óleos, possivelmente associados à actividade de um insecto ao qual seriam desfavoráveis a presença destes compostos nas folhas de que se alimentava. Esta defesa selectiva à herbivoria é patente pela presença de β -pineno e mirceno e que as variações diárias patentes no estudo de *P. caribaea* podem estar directamente relacionadas com as horas de actividade desse mesmo insecto (Barnola *et al.*, 1997). Experiências mais recentes mostraram também que existia uma correlação

directa entre a activação de genes relacionados com a síntese de sesquiterenos aquando da deposição de ovos do lóforo grande do pinheiro, *Diprion pini*, em *Pinus sylvestris*, uma resposta específica de defesa que não se repetia, por exemplo, com danos mecânicos (Köpke *et al.*, 2008). O α -terpineol, β -mirceno e o limomeno têm também utilizações na produção de anti-sépticos, aditivos alimentares e na aromaterapia (Dewick, 2009).

O α -felandreno é o componente dissonante na análise dos quimiotipos, inexistente em dois deles e em elevada quantidade no outro, indicando que este poderá ter uma função importante nestes indivíduos, e actualmente foi descrito como um composto importante enquanto pesticida contra insectos de cereais (Liu Q., 2007). Isto pode levar a crer que a sua elevada concentração pode constituir uma interacção da planta com determinadas espécies de insectos. Esta ideia foi reforçada em estudos que evidenciavam os seus efeitos repelentes (Bleeker *et al.*, 2009) e em demonstrações que o α -felandreno, enquanto um dos principais constituintes de um óleo essencial, apresenta alguma toxicidade e propriedades alelopáticas (Pontes *et al.*, 2007; Kpoviessi *et al.*, 2009).

Seria necessária informação mais aprofundada sobre a localização e condições ambientais e de crescimento de cada quimiotipo para investigar tais especulações, bem como uma maior informação sobre a actividade alelopática destes compostos. Verificou-se que existem vários trabalhos dedicados à extracção quantitativa destes compostos para potencial aplicação na indústria farmacêutica – os óleos de *P. pinaster* são utilizados no tratamento de afecções do sistema respiratório (Cunha, 2006). No entanto, eram raros os que se debruçavam sob a função dos mesmos compostos na alelopatia específica das plantas de onde eram extraídos.

Através dos resultados obtidos verificou-se que o óleo essencial de *Pinus pinaster* apresenta um enorme efeito alelopático. A perda de clorofila, a contaminação das espécies em estudo por fungos e alteração de cor do meio em determinados poços são alguns aspectos que confirmam este facto. Os efeitos do óleo essencial sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento da planta são frequentemente explicados em termos individuais através da acção de alguns dos principais constituintes. Os resultados obtidos mostram que tanto as folhas de *Lemna minor* como as de *Pisum sativum* apresentam maior actividade alelopática quando expostas a acção de óleos mais concentrados, uma vez que ocorreu uma perda total de clorofilas nas folhas expostas a maiores concentrações de óleo essencial. Nas placas onde foram utilizadas as águas de destilação, desenvolveram-se fungos, facto que pode ser explicado devido às amostras de plantas estarem contaminadas com estes agentes quando efectuada a sua extracção, ou mesmo por contaminação das placas ou qualquer material utilizado. A água de destilação possui mucilagens e outros polissacáridos que são excretados pelas plantas, que não sendo voláteis, ficam na água de destilação. A presença destes polissacáridos permitiu o desenvolvimento dos fungos, visto que estes adsorvem ao substrato mucilaginoso (Gould e Northcote, 1986), de onde adquirem também carbono. Os resultados do efeito dos óleos foram atribuídos em ensaios semelhantes por Filho *et al.*, 2009, à composição química dos mesmos, especificamente à presença de monoterpenos, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos, agentes que podem reduzir ou inibir completamente o crescimento vegetal (Cutler, 1999). O óleo

obtido através desta espécie evidencia uma actividade alelopática, em intensidades que variaram em função da concentração do óleo, da espécie emissora para as espécies receptoras. De facto, sabe-se que muitas gimnospérmicas segregam composto alelopáticos, sendo este fenómeno mais observado em famílias de coníferas como a Pinaceae (Sing *et al.*, 1999). Seria interessante averiguar qual ou quais os compostos específicos do óleo essencial exercem esta actividade.

CONCLUSÕES

Os metabolitos secundários produzidos pelas plantas têm uma grande diversidade de efeitos fisiológicos nos organismos alvo. Dependendo do seu efeito, poderão traduzir-se nas mais diversas aplicações para o Homem, tornado-se importante conhecer o modo de acção biológica destes compostos, para se averiguar possíveis aplicações na indústria, saúde e ambiente (Bakkali *et al.*, 2008). Com os avanços na biologia molecular e outras tecnologias desenvolveu-se a caracterização de genes responsáveis pela codificação de enzimas chave nas vias biossintéticas de metabolitos secundários e o papel destas na sua produção e regulação. No futuro dever-se-á tentar compreender melhor os efeitos que estes compostos têm na fisiologia das plantas e o seu impacto nas interacções entre as plantas e o ambiente (Dudareva *et al.*, 2004), bem como outras possíveis aplicações destes compostos para o Homem. Estudos citológicos para identificação das estruturas onde são maioritariamente produzidos os compostos de interesse, potencializarão outros estudos que revelem as vias biossintéticas que levam à produção desse composto nesses tecidos, para, através da engenharia genética, obtermos uma maior produção de um composto de interesse.

No caso do género *Pinus*, podemos estabelecer uma relação directa entre a produção de terpenos voláteis e as suas propriedades de defesa contra a herbivoria por parte do género *Pinus*. Estudos mais detalhados e específicos da acção destes compostos em *Pinus pinaster* podem-se revelar valiosos na compreensão da praga do nemátode do pinheiro, que assola Portugal e Espanha. Para suportar estes dados, foi sugerido recentemente que os voláteis libertados por *Pinus massoniana* podem ser a base da relação quimioecológica entre o nemátode *Bursaphelenchus xylophilus* e o seu insecto vector (Li *et al.*, 2007). Tal demonstra que os terpenos continuam a demonstrar cada vez maior importância biológica na interacção da planta com o seu meio ambiente e necessitam de continuar a ser estudados para que estes mecanismos possam ser previstos e descritos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arrabal, C., Cortijo, M., Simón, B.F., Vallejo, M.C.G., Cadahía, E. (2005) Differentiation among five Spanish *Pinus pinaster* provenances based on its oleoresin terpenic composition, *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**: 1007-1016.
2. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils – A review, *Food and Chemical Toxicology*, **46**: 446-475.
3. Barnola, L.F., Aragua, C., Hasegawa, M. (1997). Intraindividual Variations of Volatile Terpene Contents in *Pinus caribaea* Needles and its Possible Relationship to *Atta laevigata* Herbivory. *Biochemical Systematics and Ecology*, **8**: 707-716.

4. Bleeker, P.M., Diergaarde, P.J., Ament, K., Guerra, J., Weidner, M., Schutz, S., de Both, M.T.J., Haring, M.A., Schuurink, R.C. (2009) The role of specific tomato volatiles in tomato-whitefly interaction. *Plant Physiology*, **151**: 925-935.
5. Cunha, A.P., Silva, A.P., Roque, O.R. (2006) *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia* (2ª Ed.), Fundação Calouste Gulbenkian.
6. Cutler, H.C., Cutler, S.J. (1999) *Biologically active natural products agrochemicals* (1ª Ed.), CRC Press, 320 pp.
7. Dewick, P. M. (2009) *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (3ª Ed.), John Wiley and Sons, Ltd.
8. Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J. (2004) Biochemistry of Plant Volatiles, *Plant Physiology*, **135**: 1893-1902.
9. Einhellig, F.A., Leather, G.R., Hobbs, L.L. (1985) Use of *Lemna minor* L. as a bioassay in allelopathy, *Journal of Chemical Ecology*, **11**(1): 65-72.
10. Fahn, A. (1990) Secretory ducts and laticifers In *Plant Anatomy* (4ª Ed.), Pergamon Press, pp.134-151.
11. Filho, A.P.S.S., Vasconcelos, M.A.M., Zoghbi, M.G.B., Cunha, R.L. (2009) Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas, *Acta Amazonica*, **39**(2): 389- 396.
12. Gould, J., Northcote, D.H. (1986) Cell-cell recognition of host surfaces by pathogens: The adsorption of maize (*Zea mays*) root mucilage by surfaces of pathogenic fungi, *Biochemistry Journal*, **233**: 395-405.
13. Hutzler, P., Fishbach, R., Heller, W., Jungblut, T. P., Reuber, S., Schmitz, R., Veit, M., Weissenböck, G., Schnitzler, J. (1998) Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany*, **49**: 953-965.
14. Jiménez, M. S., Zellnig, G., Stabentheiner, E., Peters, J. Morales, D., Grill, D. (2000) Structure and ultra-structure of *Pinus canariensis* needles. *Flora*, **195**: 228-235.
15. Köpke, D., Schröder, R., Fischer, H.M., Gershenzon, J., Hilker, M., Schmidt, A. (2008). Does egg deposition by herbivorous pine sawflies affect transcription of sesquiterpene synthases in pine? *Planta*, **228**: 427-438
16. Kpoviessi, D.S.S., Gbenou, J.D., Gbguidi, F.A., Ahoussi, L., Accrombessi, G.C., Moudachirou, M., Quenti-Leclercq, J. (2009) Justicia anselliana (Nees) T. Anders Essential Oils Compounds and Allelopathic Effects on Cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp Plant. *Journal of Essencial Oil Research*, **21**: 83-88.
16. Leather, G.R., Einhellig, F.A. (1988) Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity, *Journal of Chemical Ecology*, **14**(10): 1821-1828
17. Li, L.Z., Wei, W., Le K., Jiang, H.S. (2007). Chemotaxis of the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, to Volatiles Associated with Host Pine, *Pinus massoniana*, and its Vector *Monochamus alternatus*. *Journal of Chemical Ecology*, **33**: 1207-1216.
18. Liu, Q., Peng, W. (2007). *Application of Recovering Wastewater from Eucalyptus Oil by Pyrolysis Treatment*. Research Institute of Forestry of Ganzhou City.
19. Lockhart, W.L.; Billeck, B.N.; Baron, C.L. (1989) Bioassays with a floating aquatic plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate, *Hydrobiologia*: **188/189**: 353-359.
20. Macchioni, F., Cioni, P.L., Flamini, G., Morelli, I., Maccioni, S., Ansaldi, M. (2003) Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy, *Flavour and Fragrance Journal*, **18**: 139-143.
21. Marpeau, A., Walter, J., Launay, J., Charon, J., Baradat, P., Gleizes, M. (1989) Effects of wounds on the terpene content of twigs of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) *Trees*, **4**: 220-226.
22. Ottavioli, J., Bighelli, A., Casanova, J. (2008) Diterpene-rich needle oil of *Pinus pinaster* Ait. from Corsica, *Flavour and Fragrance Journal*, **23**: 121-125.
23. Periotto, F., Perez, S.C.J.G.A., Lima, M.I.S. (2004) Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. Benth. na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. *Acta Botanica Brasilica*, **18**(3): 425-430.
24. Petrakis, P.V., Tsitsimpikou, C., Tzakou, O., Couladis, M., Vagias, C., Roussis, V. (2001) Needle volatiles from five *Pinus* species growing in Greece, *Flavour and Fragrance Journal*, **16**: 249-252.
25. Phillips, M.A., Croteau, R.B. (1999) Resin-based defenses in conifers, *Trends in Plant Science*, **4**(5): 184-190.
26. Pontes, J.T., de Oliveira, J.C.S., da Camara, C.A.G., Lopes, A.C.H.R., Gondim, M.G.C., de Oliveira, J.V., Schwartz, M.O.E. (2007) Composition and acaricidal activity of the resin's essential oil of *Protium bahianum* daly against two spotted spider mite (*Tetranychus Urticae*), *Journal of Essencial Oil Ressearch*, **19**: 379-383.
27. Rice E.L. (1984) *Allelopathy* (2ª Ed.), New York: Academic Press.
28. Sant'Anna-Santos, B.F., Thadeo, M., Meira, R.M.S.A., Ascensão, L. (2006) Anatomy and histochemistry of stem secretory structures of *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *Revista Árvore*, **30**: 481-489.
29. Santos, A.M., Vasconcelos, T., Mateus, E., Farrall, M.H., da Silva, M.D.R., Paiva, M.R., Branco, M. (2006) Characterization of the volatile fraction emitted by phloems of four pinus species by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1105**: 191-198.
30. Siddiqui, S., Yadav, R., Yadav, K., Wani, F.A., Meghvansi, M.K., Sharma, S., Jabeen, F. (2009) Allelopathic Potentialities of Different Concentration of Aqueous Leaf Extracts of Some Arable Trees on Germination and Radicle Growth of *Cicer arietinum* Var. – C-235, *Global Journal of Molecular Sciences*, **4**(2): 91-95.
31. Singh, H.P., Kohli, R.K., Batish, D.R., Kaushal, P.S. (1999) Allelopathy of Gymnospermous Trees, *Journal of Forest Research*, **4**: 245-254.
32. Tiberi, A.N., Curini, M., Epifano, Marcotullio, M.C., Rosati, O. (1999) The Role of the Monoterpene Composition in *Pinus* spp.. Needles, in Host Selection by the Pine Processionary Caterpillar, *Thaumetopoea pityocampa*, *Phytoparasitica* **27**(4): 263-272
33. Vallejo, M.C.P. (1994) Volatile Wood Oils of the Brazilian *Pinus Caribea* Var. *Hondurensis* and Spanish *Pinus pinaster* Var. *Mediterranea*, *Journal of Brazilian Chemical Society*.: **5**(2): 107-112.
34. Vesonder, R.F., Labeda, D.P., Peterson, R.E. (1992) Phytotoxic activity of selected water-soluble metabolites of *Fusarium* against *Lemna minor* L. (Duckweed), *Mycopathologia*, **118**: 185-189.
35. Vidal, M.C., Diniz, B.M., Peixoto, H.F.N. (2003) Efeito da aplicação de extractos de sementes de adubos verdes na germinação de cenoura. *Journal of Plant Physiology*, **15**: 293.
36. Werker, E., Fahn, A.F.L.S. (2008) Resin ducts of *Pinus halepensis* Mill.– Their structure, development and pattern of arrangement, *Botanical Journal of the Linnean Society*, **62**(4): 379 – 411.
37. Wu, H., Hu, Z. (1997) Comparative anatomy of resin ducts of the Pinaceae, *Trees*, **11**: 135-143.

