

## O GÉNERO *HYPERICUM* L. EM PORTUGAL\*

M. T. D. Nogueira

Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, I.P., Departamento de Tecnologia de Indústrias Químicas, Produtos Naturais, Estrada do Paço do Lumiar, 22, Ed. F, 1649-038 Lisboa, Portugal

### RESUMO

O estudo do género *Hypericum* L. (*Guttiferae*) abrange os treze *taxa* existentes em Portugal Continental. Está em curso o estudo dos restantes quatro *taxa* presentes na Madeira e Açores.

Apresenta-se a revisão taxonómica das treze espécies e os mapas de distribuição geográfica dos onze *taxa* espontâneos.

Analisou-se a composição química dos óleos essenciais de populações dos treze *taxa* por técnicas cromatográficas (GC e GC-MS). Estudou-se o aroma total de plantas e óleos essenciais por olfactometria. Foram ensaiadas culturas dos *taxa* raros e dos medicinais. Realizou-se ensaios de diferentes processos de secagem e conservação das plantas.

Os resultados foram tratados por métodos de análise estatística multivariada (aglomeração e análise de componentes principais) para se obter uma classificação dos treze *taxa* e proceder a uma interpretação das combinações de componentes dos óleos essenciais subjacente à estrutura quimiotaxonómica. Verificou-se a existência de diferenças significativas na análise do aroma e dos óleos essenciais de *H. androsaemum* relativamente aos das restantes espécies. Dentro do grupo de *taxa*, exceptuando *H. androsaemum* e *H. tomentosum*, nota-se alguma diversidade de composição dos respectivos óleos essenciais correlacionada com caracteres taxonómicos (morfológicos). Este padrão de separação não se alterou ao se tomar em consideração os componentes dos óleos essenciais dos restantes seis *taxa* estudados a nível mundial.

### INTRODUÇÃO

Tem-se notado ultimamente uma intensificação na procura e utilização terapêutica de plantas medicinais em todo o mundo. Dos medicamentos à base de plantas com maior incremento de vendas nos últimos anos surgem em primeiro lugar os que compreendem *Hypericum perforatum*, administrados essencialmente para estados depressivos suaves a moderados. Das muitas actividades farmacológicas atribuídas a esta espécie, salientam-se a antidepressiva, antiviral e antibacteriana de extractos alcoólicos e aquosos, as quais confirmam algumas das suas utilizações tradicionais (Barnes *et al.* 2001). O *H. perforatum* está incluído nas monografias da Comissão E Alemã, da ESCOP e em várias farmacopeias.

As restantes espécies do género *Hypericum* presentes em Portugal continental têm sido menos estudadas, surgindo, no entanto, algumas referências do ponto de vista fitoquímico, essencialmente para o *H. androsaemum* (Morteza-Semnani e Saeedi 2005, Guedes *et al.* 2004, Guedes *et al.* 2003, Valentão *et al.* 2003, Dias *et al.* 1999, Andrade *et al.* 1998, Seabra e Alves 1989, Seabra e Alves 1990, Seabra 1988), *H. calycinum* (Klingauf *et al.* 2005, Decosterd *et al.* 1991), *H. hircinum* (Bertoli *et al.* 2000), *H. undulatum* (Kitanov e Nedialkov 1998, Seabra *et al.* 1991), *H. perforatum* (Touafek *et al.* 2005, Couladis *et al.* 2001) e *H. elodes* (Piovan *et al.* 2004, Seabra e Alves 1991, Seabra e Alves 1988). São referidos estudos de bioactividade para *H. androsaemum* (Valentão *et al.* 2004), *H. calycinum* (Öztürk *et al.* 1996) e *H. hircinum* (Pistelli *et al.* 2000).

São várias as espécies deste género com popularidade na medicina tradicional e no mercado dos produtos naturais em Portugal, salientando-se entre as mais procuradas o *H. androsaemum*, o *H. perforatum* e, por vezes, o *H. undulatum*.

---

\* In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático*, pp. 36-47, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal.

No seguimento de estudos que se tem vindo a efectuar no género *Hypericum* (Nogueira *et al.* 1998, Nogueira *et al.* 1999, Nogueira *et al.* 2000, Farinha *et al.* 2002, Nogueira 2002), apresenta-se um enquadramento quimiotaxonómico dos treze *taxa* presentes em Portugal Continental (populações espontâneas e cultivadas). Este estudo baseia-se em caracteres taxonómicos, morfológicos e de composição química dos óleos essenciais, das seguintes espécies *Hypericum androsaemum* L. ("hipericão-do- Gerês"), *H. pulchrum* L., *H. montanum* L., *H. tomentosum* L., *H. pubescens* Boiss., *H. elodes* L., *H. perforatum* L., *H. linarifolium* Vahl., *H. humifusum* L., *H. undulatum* Schousb. ex. Willd ("hipericão-Kneip"), *H. perforatum* L. ("milfurada, erva-de-S.João"), *H. calycinum* L. e *H. hircinum* L. subsp. *majus* (Aiton) N. Robson. Os resultados foram tratados por métodos estatísticos multivariados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material estudado

Procedeu-se ao estudo corológico para Portugal Continental dos 11 *taxa* espontâneos, uma vez que o *Atlas Florae Europaeae* ainda não abrangeu este género. Os elementos de localização de cada espécie recolhidos nos herbários portugueses (BRESA, COI, ELVE, LISE, LISFA, LISI, LISU e PO - GS) foram reunidos em mapas, elaborados com a quadrícula UTM (Universal Transverse Mercator Coordinates) de 10x10 km.

Foram estudadas diferentes populações de cada *taxon*, tentando cobrir a sua área de distribuição geográfica. Fez-se prospecção e colheita da parte aérea de cada amostra no estado fenológico de floração / frutificação, tendo-se procedido ainda ao estudo de diferentes estados fenológicos de algumas espécies, conforme descrito anteriormente (Nogueira 2002).

Procedeu-se à cultura dos *taxa* raros e dos já cultivados (*H. montanum*, *H. pubescens*, *H. androsaemum*, *H. calycinum*, *H. hircinum* ssp. *majus*). Cultivou-se também *H. humifusum* para comparação com populações espontâneas e eventual utilização industrial.

Optimizou-se um processo de secagem durante 8 dias em estufa com ventilação com a temperatura controlada entre 25 a 30 °C. A conservação das plantas após colheita fez-se a cerca de -15 °C em embalagens sob vácuo.

### Análises químicas e tratamento dos dados

#### Extracção

Destilação em aparelho tipo Clevenger modificado (Farmacopeia Portuguesa 2002) da parte aérea do material vegetal seco, durante 3h, com um débito de 3mL/min e com água destilada como líquido de arrastamento, tendo os óleos essenciais extraídos sido separados por decantação no próprio aparelho. Este método permitiu a determinação do rendimento em óleo essencial dos diversos *taxa* estudados.

Destilação em microversão do aparelho de Marcusson modificado (Bicchi *et al.* 1983), no caso de amostras com pequenas quantidades de planta (cerca de 15g). Destilou-se a parte aérea seca, durante 2h e usando também água destilada como líquido de arrastamento. O óleo essencial foi recolhido em ciclo-hexano.

#### Análise química

*Cromatografia gás-líquido* (GC): Carlo Erba Mega HR 5300 com 2 detectores FID; Colunas – OV-1 e Carbowax 20 M (25 m x 0,25 mm d.i. e 0,3 µm de espessura de filme); Gás de arrastamento, hidrogénio, fluxo de saída 1,5 mL/min; injeção com relação de divisão 1/20; temperatura do forno foi programada para 50°C, 1 min, aumentando até 220°C (3°C/min), 220°C durante 20min; temperatura do injectore e detector, 230°C e 250°C, respectivamente.

*Cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa* (GC-MS): Hewlett Packard 5890, Serie II; Coluna OV-1 (25mx0,25mm d.i. e 0,3µm de espessura de filme); Gás de arrastamento, hélio; fluxo de saída, 1mL/min; Injeção com relação de divisão 1/10; temperatura

do forno foi programada para 50°C, 1 min., aumentando até 220°C (3°C/min.), 220°C durante 20 min; temperatura do injectador 230°C; detector massa modelo 5988; energia de ionização 70 eV; Temperatura da interface 280°C.

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi assegurada por comparação dos seus índices de retenção (IR nas colunas OV-1 e Carbowax 20M), relativamente a uma mistura padrão de hidrocarbonetos C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub> e ainda pelos espectros de massa com os correspondentes dados de compostos de referência.

*Olfactometria*: “Headspace”, Detector electrónico – A32/50S, Gás de arraste, azoto e unidade de aquisição e tratamento de dados. A olfactometria é uma forma instrumental de caracterização aproximada do aroma total, por detecção electrónica (nariz electrónico). Este equipamento contém um conjunto de 32 sensores químicos, revestidos com 32 polímeros diferentes, que permitem a detecção dum espectro de compostos voláteis semelhante às 30 famílias de receptores do nariz humano. Este método baseia-se na interacção dos compostos químicos voláteis com os polímeros semicondutores, originando alteração da resistência eléctrica de cada um, a qual é medida e dá origem ao “fingerprint” ou impressão digital do aroma total (Nogueira 1999).

### Análise multivariada

A análise multivariada foi efectuada recorrendo ao programa NTSYSpc 2.10u – “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System” (Rohlf 2002): as percentagens de 50 componentes dos óleos essenciais em estudo foram agrupadas numa matriz com 55 amostras de *Hypericum*.

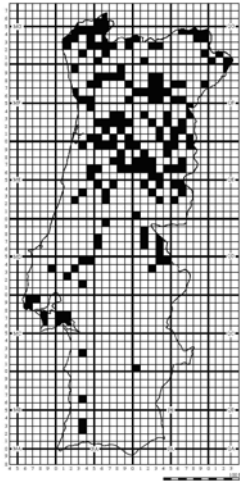
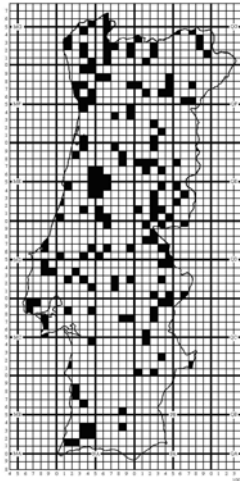
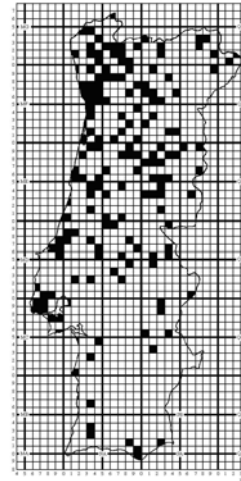
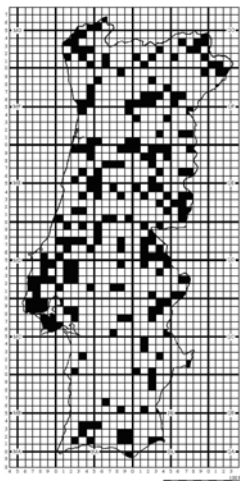
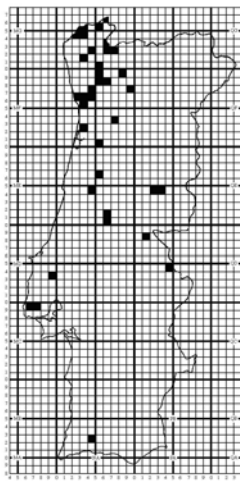
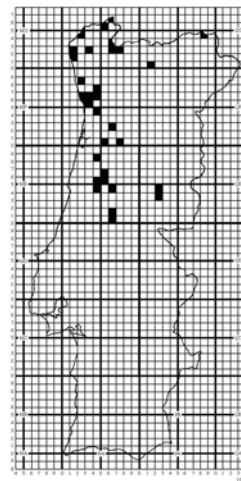
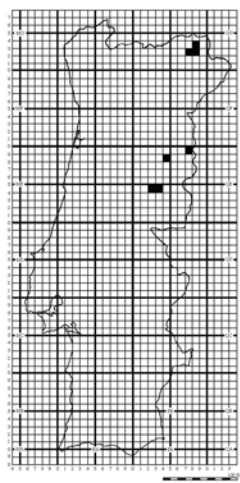
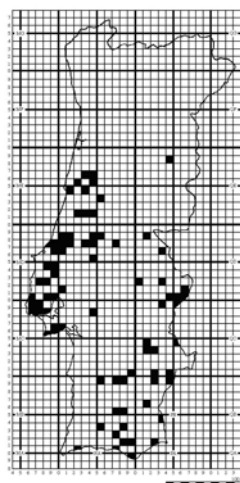
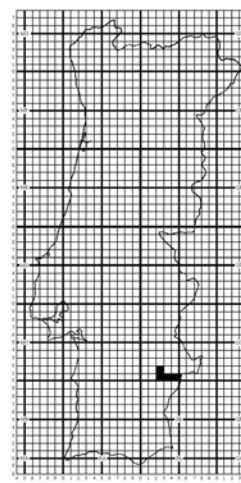
A classificação de amostras e componentes foi feita por análise aglomerativa em grupos (“cluster analysis”), sendo a estratégia de aglomeração o método SINGLE Linkage (vizinho mais próximo). A medida de similaridade considerada entre amostra foi calculada pelo coeficiente da distância Manhattan média. Os resultados da análise aglomerativa em grupos são expressos em dendrogramas.

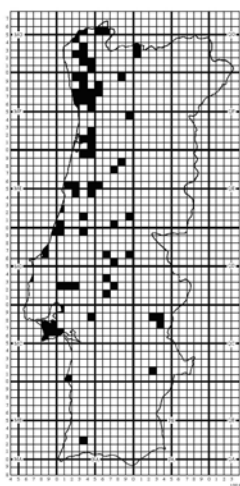
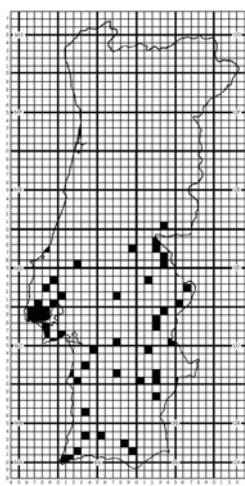
Para a representação simultânea de amostras e componentes obtendo redução das dimensões da estrutura dos dados realizou-se Análise em Componentes Principais (ACP) na matriz. Esta técnica de ordenação permite ter uma ideia da distribuição das 55 amostras de *Hypericum* no espaço definido pelos 50 caracteres químicos, em que a distância entre cada par de amostras exprime o seu grau de parecimento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da revisão corológica dos 11 *taxa* espontâneos do género *Hypericum* L. verifica-se diferenças significativas da sua distribuição geográfica em Portugal Continental, sendo referida de seguida a principal ocorrência de cada *taxon*:

- O *H. linariifolium*, o *H. humifusum*, o *H. undulatum* e o *H. perforatum* são relativamente vulgares no nosso país, como se pode observar nas figuras 1, 2, 3 e 4, respectivamente.
- O *H. androsaemum* é uma espécie de características atlânticas aparecendo essencialmente em altitude no Norte e Centro de Portugal Continental (Fig. 5).
- O *H. pulchrum* ocorre também no Norte e Centro do país, predominantemente em regiões de fraca continentalidade (Fig. 6).
- O *H. montanum* surge em locais montanhosos de tendência continental, sendo raro (Fig. 7).
- O *H. tomentosum* distribui-se principalmente no Centro e Sul de Portugal (Fig. 8).
- O *H. pubescens* ocorre exclusivamente no concelho de Serpa, sendo muito raro (Fig. 9).
- O *H. elodes* ocorre essencialmente no Norte e Centro da metade litoral de Portugal Continental (Fig. 10).
- O *H. perfoliatum* distribui-se maioritariamente no Centro e Sul do país (Fig. 11).

Fig. 1. Distribuição de *H. linariifolium*.Fig. 2. Distribuição de *H. humifusum*.Fig. 3. Distribuição de *H. undulatum*.Fig. 4. Distribuição de *H. perforatum*.Fig. 5. Distribuição de *H. androsaemum*.Fig. 6. Distribuição de *H. pulchrum*.Fig. 7. Distribuição de *H. montanum*.Fig. 8. Distribuição de *H. tomentosum*.Fig. 9. Distribuição de *H. pubescens*

Fig. 10. Distribuição de *H. elodes*.Fig. 11. Distribuição de *H. perfoliatum*.

O rendimento médio obtido em óleo essencial (% v/p) foi de 0,4 para *H. calycinum*; 0,3 para *H. undulatum*, *H. humifusum* e *H. elodes*; 0,2 para *H. perfoliatum* e *H. pulchrum* e 0,1 para *H. androsaemum*, *H. hircinum* ssp. *majus*, *H. perforatum*, *H. linarifolium*, *H. tomentosum* e *H. pubescens*.

Os componentes químicos dos óleos essenciais das várias amostras de cada uma das treze espécies de *Hypericum* estudadas são apresentados na Tabela 1, sendo referidos os valores da percentagem média ( $\mu$ )  $\pm$  desvio padrão ( $\sigma$ ) para cada espécie. Os compostos desconhecidos são designados pelo respectivo índice de retenção.

Os óleos essenciais das diferentes populações dos 13 taxa em estudo são constituídos fundamentalmente por hidrocarbonetos monoterpénicos e hidrocarbonetos sesquiterpénicos, embora, em alguns casos existam percentagens significativas de outros compostos. Os monoterpénos oxigenados surgem no *H. tomentosum*, sendo os sesquiterpénos oxigenados muito pouco significativos, Tabela 2.

Na figura 12 apresenta-se um dendrograma obtido pela análise aglomerativa em grupos dos resultados do perfil quantitativo em 50 componentes dos óleos essenciais das 55 amostras de *Hypericum*. Ao nível da espécie, os 13 taxa parecem bem circunscritos em grupos distintos, confirmando a classificação taxonómica.

Pela Análise de Componentes Principais (ACP) e no plano definido pelos eixos 3 e 2, representado na Fig. 13, é evidente uma forte oposição entre *H. androsaemum* e os restantes taxa.

Um padrão semelhante de agrupamento de amostras surge no espaço definido pelos 3 primeiros eixos, onde *H. androsaemum* e *H. tomentosum* estão igualmente afastados dos restantes taxa, como se pode observar na fig. 14.

Acrescentando aos resultados do presente estudo, os dos restantes 6 taxa mundiais estudados anteriormente (*H. foliosum* – Santos *et al.* 1999, *H. olympicum* - Gudzic *et al.* 2001, *H. scabrum* - Çakir *et al.* 1997, *H. dogonbadanicum* – Sajjadi *et al.* 2001, *H. ericoides* – Cardona *et al.* 1983 e *H. elodeoides* – Mathela *et al.* 1984) e ainda dados de outros autores referentes a *H. perforatum* (Weyerstahl *et al.* 1995, Gudzic *et al.* 2001, Çakir *et al.* 1997 e Chialva *et al.* 1981), *H. hircinum* (Bertoli *et al.* 2000) e *H. perfoliatum* (Couladis *et al.* 2001), confirma-se o mesmo padrão de agrupamento de amostras, com *H. androsaemum* e *H. tomentosum* afastados dos restantes taxa. Neste caso surge ainda um grupo formado pelo *H. elodeoides* (Fig. 15).



Tabela 2. Teor médio dos grupos de componentes dos 13 taxa (%). HM – Hidrocarbonetos monoterpênicos, MO – Monoterpenos oxigenados, HS - Hidrocarbonetos sesquiterpênicos, SO - Sesquiterpenos oxigenados.

Taxa	Componentes agrupados				
	HM	MO	HS	SO	Outros
<i>H. calycinum</i>	80	2	10	2	4
<i>H. androsaemum</i>	6	<1	32	1	4
<i>H. hircinum</i> ssp. <i>majus</i>	3	<1	41	4	36
<i>H. perforatum</i>	18	<1	30	7	21
<i>H. undulatum</i>	1	<1	13	2	63
<i>H. perfoliatum</i>	63	<1	6	1	25
<i>H. humifusum</i>	69	1	11	2	5
<i>H. linarifolium</i>	38	1	23	4	7
<i>H. pulchrum</i>	61	1	15	4	5
<i>H. montanum</i>	9	0	47	7	9
<i>H. tomentosum</i>	1	19	16	4	6
<i>H. pubescens</i>	50	1	19	3	5
<i>H. elodes</i>	4	<1	21	5	60

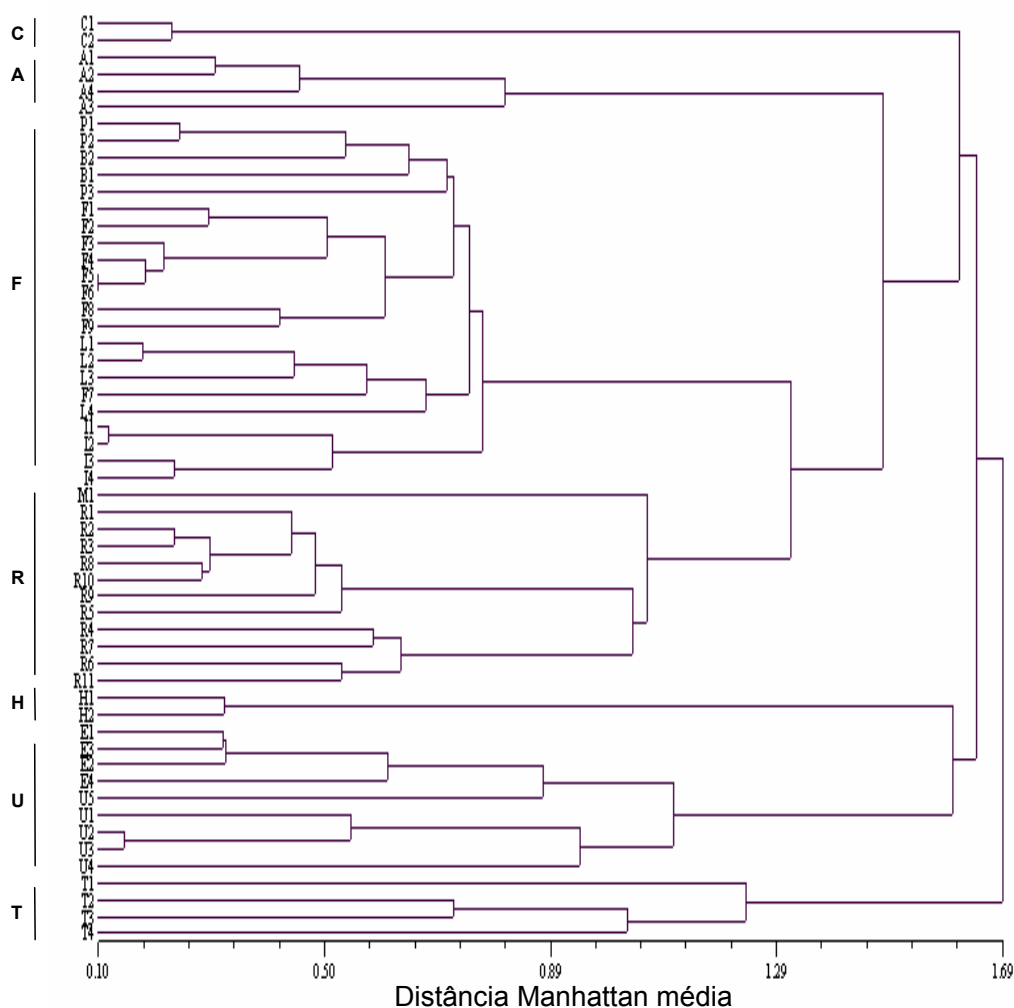


Fig. 12. Dendrograma das 55 amostras de *Hypericum* obtido pela análise aglomerativa em grupos e pela estratégia de aglomeração Single. **C** – *H. calycinum*; **A** – *H. androsaemum*; **F** – *H. pulchrum*, *H. pubescens*, *H. humifusum*, *H. linarifolium* e *H. perfoliatum*; **R** – *H. montanum* e *H. perforatum*; **H** – *H. hircinum* ssp. *majus*; **U** – *H. elodes* e *H. undulatum*; **T** – *H. tomentosum*.

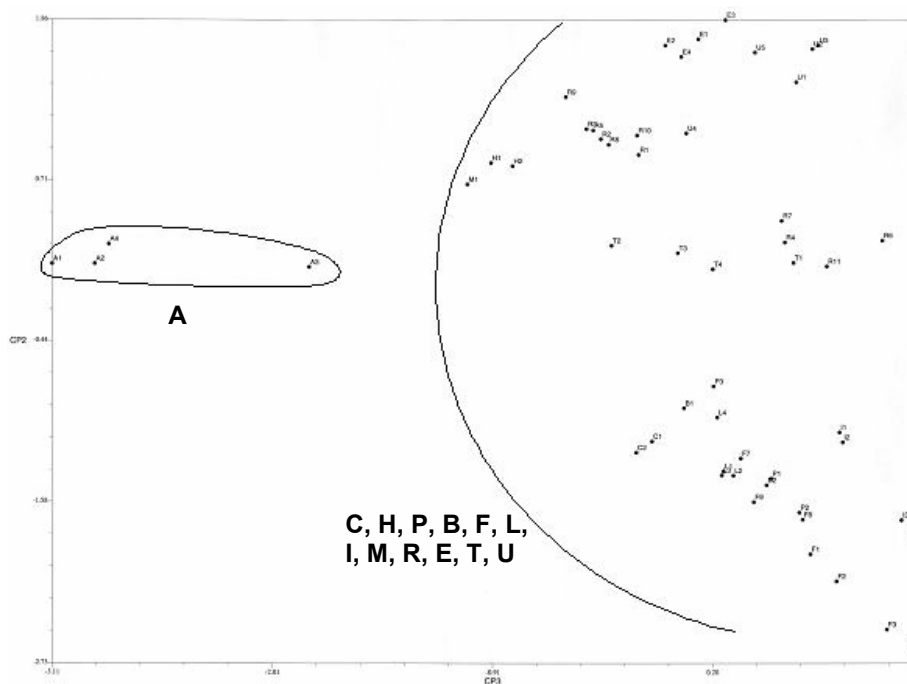


Fig. 13. Ordenação (ACP) das 55 amostras de *Hypericum* no espaço definido pelas CP3 e CP2. **A** – *H. androsaemum*; **C, H, P, B, F, L, I, M, R, E, T, U** – *H. calycinum*, *H. hircinum* ssp. *majus*, *H. pulchrum*, *H. pubescens*, *H. humifusum*, *H. linarifolium*, *H. perfoliatum*, *H. montanum*, *H. perforatum*, *H. elodes*, *H. tomentosum* e *H. undulatum*.

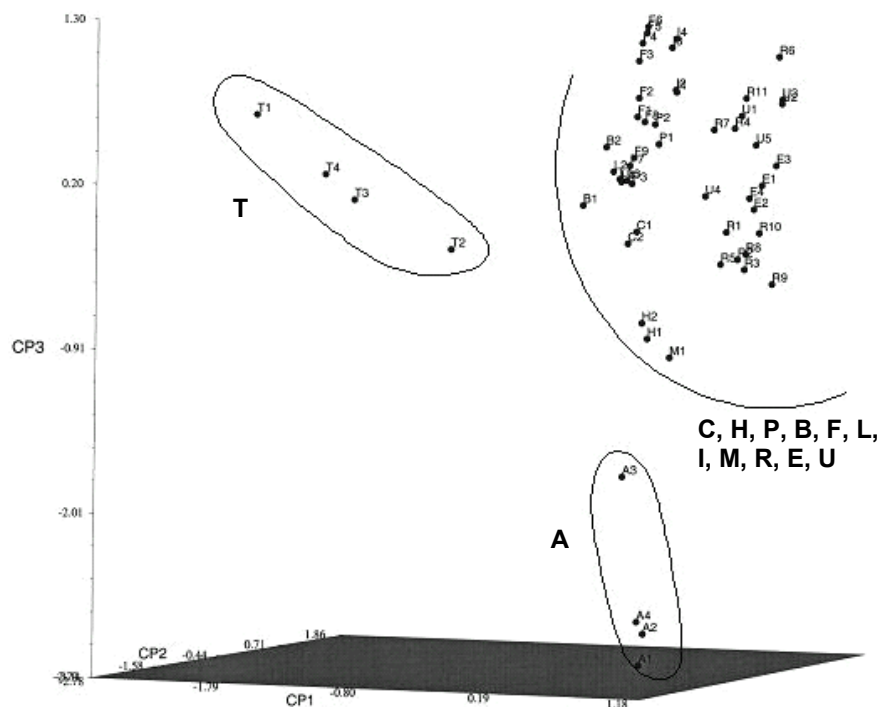


Fig. 14. Ordenação (ACP) das 55 amostras de *Hypericum* no espaço definido pelas CP1, CP2 e CP3. **A** – *H. androsaemum*; **T** - *H. tomentosum*; **C, H, P, B, F, L, I, M, R, E, U** – *H. calycinum*, *H. hircinu* ssp. *majus*, *H. pulchrum*, *H. pubescens*, *H. humifusum*, *H. linarifolium*, *H. perfoliatum*, *H. montanum*, *H. perforatum*, *H. elodes*, e *H. undulatum*.



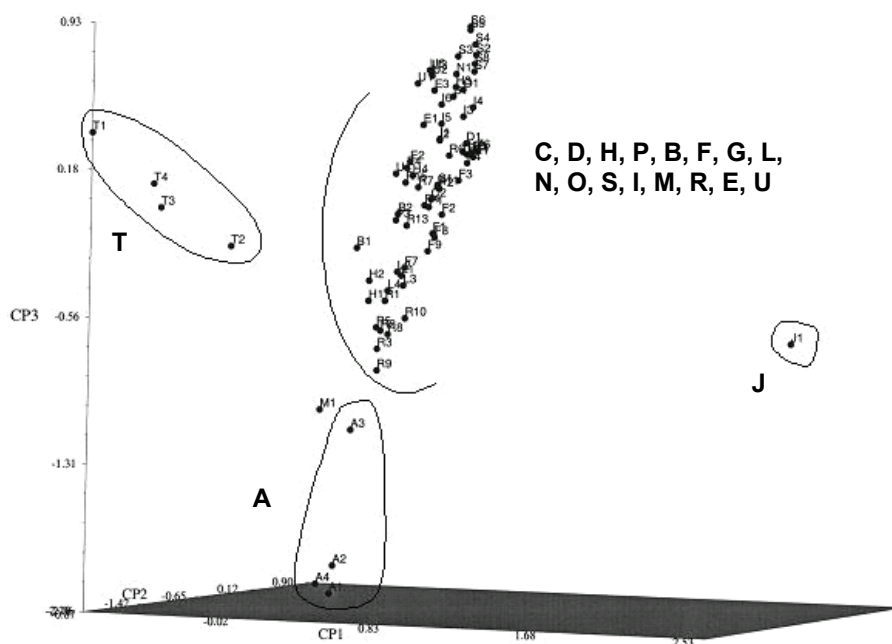


Fig. 15. Ordenação (ACP) das 76 amostras de *Hypericum* no espaço definido pelas CP1, CP2 e CP3. **A** – *H. androsaemum*; **T** – *H. tomentosum*; **J** – *H. elodeoides*; **C, D, H, P, B, F, G, L, N, O, S, I, M, R, E, U** – *H. calycinum*, *H. dogonbadanicum*, *H. hircinum* ssp. *majus*, *H. pulchrum*, *H. pubescens*, *H. humifusum*, *H. scabrum*, *H. linarifolium*, *H. ericoides*, *H. olympicum*, *H. foliosum*, *H. perfoliatum*, *H. montanum*, *H. perforatum*, *H. elodes*, e *H. undulatum*.

A interpretação dos resultados da ACP sugere que os componentes dominantes e os exclusivos são os de maior poder discriminante para separar os *taxa*:

- H. calycinum*** ( $\beta$ -pineno 48%)
- H. hircinum* ssp. *majus*** ( $\beta$ -cariofileno 34%)
- H. pulchrum*** ( $\alpha$ -pineno 45%)
- H. pubescens*** ( $\alpha$ -pineno 40%)
- H. humifusum*** ( $\alpha$ -pineno 61% e ác. dodecanoico 1%)
- H. linarifolium*** ( $\alpha$ -pineno 29%)
- H. perfoliatum*** ( $\alpha$ -pineno 59%)
- H. montanum*** (germacreno D 30%)
- H. perforatum*** (2-metiloctano 15%, 2-metildecano 2% e RI 1622 3%)
- H. elodes*** (*n*-nonano 49%, *cis*- $\beta$ -ocimeno 3% e RI 1256 2%)
- H. undulatum*** (*n*-nonano 33%, 3-metilnonano 15%, 2-metiloctano 10% e RI 1336 5%)
- H. androsaemum*** (componentes com RI 1496 2%, 1510 6%, 1520 6% e 1531 20%)
- H. tomentosum*** (RI 1057 14%, 1141 5%, 1546 4%, linalol 8%, *cis* e *trans*-óxido de linalilo 5 e 3% e pulegona 2%).

A ACP dos resultados do aroma total dos óleos essenciais de *Hypericum*, pelo método de olfactometria, confirma a oposição das amostras de *H. androsaemum* relativamente às das restantes *taxa* (Fig. 16). Neste método o próprio equipamento possui uma unidade de aquisição e tratamento de dados, usando uma técnica de ordenação (Sammon Mapping) idêntica à ACP (Nogueira 1999), o que é uma vantagem.

Do estudo de análise multivariada das fontes de variabilidade intrínsecas dos óleos essenciais dos 13 *taxa* do género *Hypericum* estudados pode concluir-se que diferenças inter-específicas são sempre superiores às intra-específicas, resultando agrupadas amostras dos mesmos *taxa*. Verificou-se alguma variação intra-específica quantitativa, nomeadamente ao longo das variações

sazonais e seguindo características ambientais ou biogeográficas. Não se notou alteração significativa da composição do óleo essencial com a cultura.

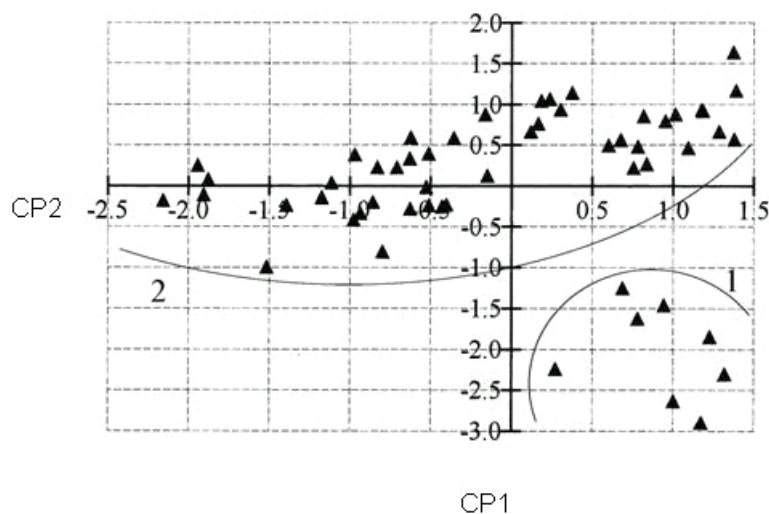


Fig. 16. Ordenação (ACP) das amostras do aroma total de óleos essenciais de taxa de *Hypericum* no espaço definido pelas CP1 e CP2. 1 – *H. androsaemum*; 2 - *H. pulchrum*, *H. undulatum*, *H. perforatum*, *H. linarifolium*, *H. humifusum*, *H. perfoliatum* e *H. tomentosum*.

Os resultados da análise de componentes principais sugerem alguns padrões para a definição quimiotaconómica dos taxa:

- Predominância de determinado componente do óleo essencial: *H. calycinum* (48% de  $\beta$ -pineno), *H. pubescens* (40% de  $\alpha$ -pineno), entre outros.
- Presença de componente(s) exclusivo(s) do taxon (taxa): *H. androsaemum*, *H. tomentosum*, *H. linarifolium* e *H. humifusum*.

A circunscrição dos 13 taxa do género *Hypericum*, usando como caracteres diferenciadores os principais componentes dos respectivos óleos essenciais confirma a classificação taxonómica (baseada essencialmente em caracteres morfológicos e anatómicos), excepto para o ***Hypericum androsaemum*** e o ***H. tomentosum***.

O ***H. androsaemum*** aparece como um grupo separado quer pela análise multivariada dos compostos do aroma total quer pela análise dos componentes dos óleos essenciais. Este taxon já foi anteriormente considerado um género ***Androsaemum Duhamel*** (Choisy 1821 in Robson 1977) separado do género *Hypericum*.

O ***H. tomentosum*** surge também como um grupo destacado da espécie anterior e dos restantes taxa somente na análise dos componentes dos óleos essenciais.

Estes taxa, em especial o ***H. androsaemum***, poderia(m) enquadrar-se noutra categoria taxonómica.

Ao alargar a análise multivariada dos resultados de composição dos óleos essenciais dos 13 taxa presentes em Portugal Continental aos restantes 6 taxa do género *Hypericum* estudados a nível mundial, confirma-se o mesmo padrão de agrupamento de amostras.

A técnica de olfactometria pode ser relevante no controlo de qualidade de produtos de origem vegetal (plantas e fármacos) e na classificação preliminar de amostras, antes da utilização de métodos analíticos (GC e GC-MS).

Os estudos quimiotaconómicos podem contribuir para o conhecimento fitoquímico que serve de base ao controlo de qualidade dos produtos naturais com *Hypericum* e, ainda, para a selecção de taxa com interesse industrial.

## REFERÊNCIAS

- Andrade PB, RM Seabra, P Valentão, F Areias (1998) Simultaneous determination of flavonoids, phenolic acids and coumarins in seven medicinal species by HPLC/DAD. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 21(18): 2813-2820.
- Barnes J, LA Andersen, JD Phillipson (2001) *Hypericum perforatum* L.: A Review of its Chemistry,

- Pharmacology and Clinical Properties. *J. of Pharmacy and Pharmacology* 53: 583-600.
- Bertoli A, L Pistelli, I Morelli (2000) Constituents of *Hypericum hircinum* oils. *J. Essent. Oil Res.* 12: 617-620.
- Bicchi C, A D'Amato, GM Nano, C Frattini (1983) Improved method for the analysis of small amounts of essential oils by microdistillation followed by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 279: 409-416.
- Çakir A, ME Duru, M Harmandar, R Ciriminna, S Passannanti, F Piozzi (1997) Comparison of the volatile oils of *H. scabrum* L. and *H. perforatum* L. from Turkey. *Flavour Fragr. J.* 12:285-287.
- Cardona ML, JA Marco, JM Sendra, E Seoane, JT Ibañez (1983) Waxes and volatile oils in *H. ericoides* (*Guttiferae*). *Lipids* 18: 439-442.
- Chialva F, G Gabri, PAP Liddle, F Ulian (1981) Indagine sulla composizione dell'olio essenziale di *H. perforatum* L. e di *Teucrium chamaedrys* L. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 63: 286-288.
- Couladis M, P Baziou, PV Petrakis, C Harvala (2001) Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. growing in different locations in Greece *Flavour Fragr. J.* 16: 204-206.
- Decosterd LA, E Hoffmann, R Kyburz, D Bray, K Hostettmann (1991) A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and *in vitro* antimalarial activity *Planta Med.* 57: 548-551.
- Dias ACP, RM Seabra, PB Andrade, M Fernandes-Ferreira (1999) The development and evaluation of an HPLC-DAD method for the analysis of the phenolic fractions from *in vivo* and *in vitro* biomass of *Hypericum* species. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 22(2): 215-227.
- Farinha A, JM Martins, T Nogueira, R Tavares, F Duarte (2002) HPLC Analysis of *Hypericum* L. species from Portugal in Rauter et al. (eds.), *Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application*, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 125-134.
- Farmacopeia Portuguesa (2002) VII ed. INFARMED, Lisboa: 191-192.
- Gudzic B, S Dordevic, R Palic, G Stojanovic (2001) Essential oils of *H. olympicum* L. and *H. perforatum* L. *Flavour Fragr. J.* 16: 201-203.
- Guedes AP, LR Amorim, A Vicente, M Fernandes-Ferreira (2004) Variation of the essential oil content and composition in leaves from cultivated plants of *Hypericum androsaemum* L. *Phytochem. Anal.* 15: 146-151.
- Guedes AP, LR Amorim, AMS Vicente, G Ramos, M Fernandes-Ferreira (2003) Essential oils from plants and *in vitro* shoots of *Hypericum androsaemum* L. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1399-1404.
- Kitanov GM, PT Nedialkov (1998) Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 26:647-653.
- Klingauf P, T Beuerle, A Mellenthin, SAM El-Moghazy, Z Boubakir, L Beerhues (2005) Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures *Phytochemistry* 66: 139-145.
- Mathela D K, CS Mathela, V Dev (1984) Volatile constituents of *H. elodeoides* Choisy. *J. Indian Chem. Soc.* 61: 792-793.
- Morteza-Semnani K, M Saeedi (2005) The essential oil composition of *Hypericum androsaemum* L. leaves and flowers from Iran. *Flavour Fragr. J.* 20: 332-334.
- Nogueira T (2002) O género *Hypericum* L. em Portugal Continental. Contribuição para o estudo quimiotaxonómico. Tese de doutoramento, UTL – ISA, Lisboa.
- Nogueira T, F Duarte, F Venâncio, R Tavares, M Lousã, C Bicchi, P Rubiolo (1998) Aspectos Quimiotaxonómicos do Género *Hypericum* L. em Portugal. *Silva Lusitana* 6: 55-61, Portugal.
- Nogueira T, F Duarte, R Tavares, MJ Marcelo-Curto, J Capelo, AC Freitas (1999) Comparative study of the aromas of *Hypericum* L. species from Portugal using olfactoscopy. *Flavour Fragr. J.* 14: 195-9.
- Nogueira T, F Duarte, R Tavares, MJ Marcelo-Curto, C Bicchi, P Rubiolo, J Capelo, M Lousã (2000) Quimiotaxonomia do género *Hypericum* L. em Portugal Continental. *Portugaliae Acta Biol.* 19: 21-30.
- Öztürk Y, S Aydin, R Beis, KHC Baser (1996) Effects of *Hypericum calycinum* L. extract on the central Nervous system in mice. *Phytotherapy Research* 10: 700-702.
- Piovan A, R Filippini, R Caniato, A Borsarini, LB Maleci, EM Cappelletti (2004) Detection of hypericins in the "red glands" of *Hypericum elodes* by ESI-MS/MS. *Phytochemistry* 65:411-414.
- Pistelli L, A Bertoli, S Zucconelli, I Morelli, L Panizzi, F Menichini (2000) Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*. *Fitoterapia* 71: S138-S140.
- Rohlf, FJ (2002) NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.10u, Exeter Software, Setauket, New York.
- Santos, PAG, AC Figueiredo, JG Barroso, LG Pedro, JJC Scheffer (1999) Composition of the essential oil of *Hypericum foliosum* Aiton from five Azorean Islands. *Flavour Fragr. J.* 14: 283-286.
- Seabra RM e AC Alves (1989) Identificação de 3-sulfato de quercetina em *Hypericum androsaemum*. *Revista Portuguesa de Farmácia* 39(1): 16-18.
- Seabra RM e AC Alves (1990) Flavonoids from *Hypericum* species. *Fitoterapia* 61(2): 146-147.
- Seabra RM (1988) Identificação de  $\beta$ -amirina e  $\beta$ -sitosterol em *Hypericum androsaemum*. *Revista Portuguesa de Farmácia* 38(1): 67-69.
- Seabra RM, MH Vasconcelos e AC Alves (1991) Flavonoid sulphates from *Hypericum undulatum*. *Revista*

- Portuguesa de Farmácia* 41(4): 16-18.
- Seabra RM, AC Alves (1991) Quercetin 3'-sulphate from *Hypericum elodes*. *Phytochemistry* 30(4): 1344-1345.
- Seabra RM, AC Alves (1988) Quercetin 3-glucuronide-3'-sulphate from *Hypericum elodes*. *Phytochemistry* 27(9): 3019-3020.
- Sajjadi SE (2001) Constituents of Essential Oil of *Hypericum dogonbadanicum* Assadi, J. *Essent. Oil Res.*, 13: 43-44.
- Touafek O, A Nacer, A Kabouche, Z Kabouche (2005) Analysis of the essential oil of Algerian *Hypericum perforatum*. *Flavour Fragr. J.* 20(6): 669-670.
- Valentão P, M Carvalho, E Fernandes, F Carvalho, PB Andrade, RM Seabra, ML Bastos (2004) Protective activity of *Hypericum androsaemum* infusion against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in isolated rat hepatocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 92: 79-84.
- Valentão P, M Carvalho, F Carvalho, E Fernandes, RP Neves, ML Pereira, PB Andrade, RM Seabra, ML Bastos (2004) *Hypericum androsaemum* infusion increases tert-butyl hydroperoxide-induced mice hepatotoxicity *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology* 94: 345-351.
- Valentão P, A Dias, M Ferreira, B Silva, PB Andrade, ML Bastos, RM Seabra (2003) Variability in phenolic composition of *Hypericum androsaemum*. *Natural Product Research* 17(2): 135-140.
- Weyerstahl P, U Splittgerber, H Marschall, VK Kaul (1995) Constituents of the leaf essential oil of *Hypericum perforatum* L. from India. *Flavour Fragr. J.* 10: 365-370.
-