DEDICO

Para aquelas pessoas que fazem sorrir meu coração,

Para a galera que sempre esteve junto...

...até mesmo quando eu não estava disposta!!!

Para a pessoa que eu esperava que me chutasse quando caí e que foi umas das pessoas que me ajudou a levantar...

Para as pessoas que fizeram diferença em minha vida,

Para as pessoas que quando olho para trás sinto muitas saudades...

Para as pessoas que me aconselharam quando me senti sozinha, e me ajudaram a entender que não importa em quantos pedaços meu coração tenha se partido, o mundo não pára para que eu o conserte.

Para as pessoas que me deram uma força quando eu não estava muito animada para o trabalho!!!

Para as pessoas que amei e que ainda amo...

Para aqueles que encontro todos os dias e não tenho a chance de dizer tudo o que sinto olhando nos olhos...

Para aqueles que já esqueceram o quanto foram importantes para mim...

A vida é um caminho cheio de surpresas e o final dele ninguém conhece...

Você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pela vida inteira ou fazer coisas das quais se orgulhará para o resto da vida.

O que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida...

...temos só uma vida para viver...

E ela é sempre muito mais curta do que imaginamos... cada momento é muito, muito importante...

Por isso queria deixar todo meu carinho aos meus velhos e também novos amigos, amigos reais que estão sempre presentes em minha vida (mesmo que seja apenas em pensamento) com sua alegria e boa vontade!!!

Agradecimentos

A Deus, por tudo.

Aos meus pais e aos meus irmãos e minha sobrinha, pelo carinho e amor.

A minha orientadora querida, Profa. Dra. Giuseppina Pace Pereira Lima, pela paciência e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Química e Bioquímica, do IB, UNESP, em especial ao "Sr. Luiz e Sr. Edson", pelo auxílio recebido. Não esquecendo do Luis Cláudio Correa, pelas dicas fundamentais no laboratório.

A amiga Elaine Maria Boteon, pela grande amizade e ajuda durante toda a fase experimental.

Aos amigos Silvania,Valdir, Maria Olívia, Jéferson, Débora, Cristiano e Renato pela ajuda e horas de conversas e distrações.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do IB, UNESP, em especial ao Serginho.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica, Camila, Cássia, Fábio,Tássia enfim todos que passaram por ele ao longo desses dois anos de estudos.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Química e Bioquímica, do IB, UNESP.

OBRIGADA!!!

ÍNDICE

1. Resumo 01
2. Abstract 03
3. Introdução 05
4. Revisão de literatura.....08
   4.1. Origem e descrição botânica.....09
   4.2. Importância econômica 09
   4.3. Cultura de tecidos 10
   4.4. Atividade antioxidante 13
5. Capítulo I 16
6. Capítulo II 31
7. Considerações Finais.....44
8. Referências bibliográficas..... 42

1 - RESUMO

ZIGIOTTO, D.C. **Compostos fenólicos e atividade antioxidante em plantas *Salvia officinalis* (L) micropropagadas,** 2007. 54p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu**.**

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo a determinação e possível comparação do teor de fenóis e flavonóides totais e a atividade antioxidante, em plantas de sálvia (*Salvia officinalis*) micropropagadas e aquelas cultivadas em casa de vegetação. Inicialmente testou-se 3 tempos de assepsia (15, 30 e 45 minutos em hipoclorito de sódio a 20%), tanto para as sementes como para microestacas (explantes), onde avaliou-se explantes contaminados, mortos e oxidados, número de brotações e eventuais formações de calos. Os explantes foram transferidos para meio de cultivo contendo reguladores vegetais. O experimento constou de 5 tratamentos (T1-MS, T2-MS+1,0 mg L^{-1}BAP, T3-MS+1,0 mg L^{-1}BAP+0,25 mg L^{-1}IBA, T4-MS+2,0 mg L^{-1}BAP, T5-MS+2,0 mg L^{-1}BAP+0,25 mg L^{-1}IBA), com 50 repetições, sendo uma planta por tubo de ensaio. Com 30 e 60 dias foram coletadas plântulas para realização das análises visuais (número de explantes contaminados, oxidados e mortos, sadios, número de brotos por explante e altura média das brotações) e bioquímicas (teores de flavonóides totais e fenóis totais e atividade antioxidante em extrato metanólico). Na assepsia o melhor resultado obtido em hipoclorito de sódio a 20% foi com o tempo de 30 minutos para as microestacas. Não foi observado nas sementes indícios de germinação. Para a proliferação de brotos, o tratamento contendo 1 mg L^{-1} de BAP foi mais eficiente, enquanto que para a altura o melhor meio de cultivo foi a testemunha (MS) (sem adição de reguladores vegetais). IBA promoveu a formação de poucas raízes**.** Para as análises bioquímicas os resultados mostram que microestacas cultivadas em meio contendo BAP e/ou IBA, nas concentrações e combinações utilizadas, não induziu aumento nos teores de flavonóides totais em plantas cultivadas *in vitro.* Plantas cultivadas em meio contendo BAP mostraram os maiores teores de fenóis totais solúveis. A atividade antioxidante foi maior quando se usou no meio a combinação dos dois reguladores vegetais

Palavras-chave: micropropagação, sálvia, flavonóides, atividade antioxidante.

2 - ABSTRACT

ZIGIOTTO, D.C. **Phenolic compounds and antioxidant activity in *Salvia officinalis* (L.) micropropagated,** 2007. 54p. Thesis (MSc) – Biosciences Institute, São Paulo State University (UNESP), Botucatu.

Abstract

The present work aims was to determine and to compare the levels of total phenolics and flavonoids and antioxidant activity between sage (*Salvia officinalis* L.) plants micropropagated and cultivated in greenhouse. It was tested three times of asepsis (15, 30 and 45 minutes with 20% sodium hypochlorite) for seeds and microcuttings (explants) deriving of the cultivated plants in greenhouse. The experiment consisted to five treatment (T1-MS; T2 - MS + 1,0 mg L^{-1} BAP; T3-MS + 1,0 mg L^{-1} BAP (Benzilaminopurine) + 0,25 mg L^{-1} IBA (Indolbutyric cid); T4 – MS + 2,0 mg L^{-1} BAP; T5 – MS + 2,0 mg L^{-1} BAP + 0,25 mg L^{-1}IBA), with 50 repetition and one explant for test-tube. Since 30 and 60 days were collected seedlings to realization of the visual analysis (contaminated explants, oxidaded and/or death, healthy, number and height for shoots) and biochemical analysis (levels of total flavonoids, total phenolics and antioxidant ativity, through the method free-radical DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazil)). The treatment for thirty minutes in sodium hypochlorite was adequate to promote explants with the minor rate contamination, oxidaded and death explants. However, it wasn't observed any rate seed germination. The treatment containing 1 mg L^{-1} of BAP was more effective for the shoots proliferation; to the height the better of culture medium was the control (MS) without addition of plant growth regulators. IBA induced the formation of fews roots. The results of biochemical analysis showed that cultivated explants in medium content BAP and IBA, in the concentration and arrangement used not induced increase in the levels of total flavonoids in plants cultivated *in vitro*. Seedless cultivated in medium with BAP showed the greater phenolic compounds content. The antioxidante activity was greater when the combination was used in medium with growth regulators.

Key-words: micropropagation, sage, flavonoids, antioxidant activity

3 – INTRODUÇÃO

A sálvia (*Salvia officinalis* L.*)* é uma planta originária do Sul da Europa, pertencente à família Lamiaceae, muito utilizada na medicina, assim como na fabricação de cosméticos e na culinária. É planta de clima quente sem excesso de calor, desenvolvendo-se bem em solos drenados argilo-arenosos, podendo sofrer em solos úmidos (Martins et al., 1998).

O gênero *Salvia* é representado por 900 taxa em todo o mundo. É muito difundida no Mediterrâneo, África e Américas Central e do Sul (Avato et al., 2005).

Algumas espécies são amplamente usadas na medicina popular e como plantas ornamentais, assim como para propósitos culinários (Skala & Wysokiinska, 2004). Pesquisa feita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) mostrou que aproximadamente 80% da população de países em desenvolvimento ainda utilizam como recurso primário no atendimento da saúde, a medicina tradicional que consiste no uso de extratos vegetais e seus princípios ativos (Farnsworth et al., 1991).

A sálvia possui diversas propriedades terapêuticas, dentre elas destacam-se a emenagoga, diaforética, germicida, antibactericida, anti-séptico, antiflamatória, antioxidante e adstringente (Evans, 1991; Hertwig, 1991; Costa, 1994), além de ser usada para combater a inflamação da cavidade bucal e da gengiva e, também, como agente gastrintestinal (Tekel'ova, 1993). Extratos de sálvia ou óleo essencial apresentam propriedades hipotensiva, ação no sistema nervoso central e atividade antiespasmódica (Newall, 1996).

Vem sendo amplamente estudada devido aos seus componentes antioxidantes (Cuvelier et al., 1996; Tepe et al., 2005). Alguns compostos químicos presentes em sálvia apresentam alta atividade antioxidante (Matsingou et al., 2003), isto é, são capazes de diminuir os danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas através de processos oxidativos.

Os metabólitos presentes em sálvia estão sendo identificados e foi verificado que os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos na espécie, contribuindo para a atividade antioxidante. Vários trabalhos descrevem os diferentes compostos (Kosar et al., 2005), porém, o estudo em plantas cultivadas *in vitro* é escasso. Além disso, plantas cultivadas dessa forma podem apresentar variações no conteúdo devido a técnica. Por outro lado, a micropropagação pode aumentar a produção de plantas, independente de interferências do meio. A propagação *in vitro* fornece plantas em qualquer época do ano e é uma importante ferramenta para estudos bioquímicos.

Apesar das dificuldades no ajuste e desenvolvimento de protocolos para cultura *in vitro,* estudos desta natureza são relevantes, podendo-se destacar a cultura da sálvia, pela sua importância econômica.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo determinar o teor de alguns compostos antioxidantes em plantas micropropagadas de sálvia (*Salvia officinalis* L.) comparando-as com plantas cultivadas em casa de vegetação.

4 - REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Origem e descrição botânica

Salvia officinalis L. é originária do mediterrâneo e foi aclimatada na região sul do Brasil. Pertence a família Lamiaceae Lindley (Labiateae Juss) e pertence à sub classe Asteridae, ordem Lamiales (Cronquist, 1981), e possuindo aproximadamente, 220 gêneros e 4000 espécies de distribuição cosmopolita (Hedge,1992). Segundo Harley (1994), no Brasil ocorrem 29 gêneros e 505 espécies. De acordo com Barroso (1986), são poucos os gêneros de nossa flora e muitos foram introduzidos em nossa cultura como plantas medicinais, que são produtoras de óleos essenciais, utilizadas como condimentos ou ornamentais.

Em geral, as Lamiaceae são plantas herbáceas ou arbustivas com folhas opostas cruzadas, inteiras. As flores são pequenas ou grandes, na maioria vistosas, reunidas em densas inflorescências, quase sempre axilares. As flores são diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras, fortemente zigomorfas e bilabiadas. O androceu é formado por dois ou quatro estames e as flores que possuem dois estames, apresentam dois estaminódios. O ovário, na família, é súpero, envolto num disco glandular unilateralmente expandido e saliente; este ovário é também bicarpelar, bilocular, com dois óvulos por lóculo e falsamente tetralocular por invaginação dos carpelos; seu estilete é ginobásico. O fruto é seco constituído por quatro núculas. As sementes raramente possuem endosperma e quando este aparece, é escasso e o embrião é reto (Barroso, 1986; Joly, 1993; Heywood, 1993).

Desenvolve-se bem em regiões de clima ameno como o sul do Brasil e quando cultivada em locais que recebam luz solar e cujo clima seja quente, sem excesso de calor. Em climas tropicais só se conserva viva em vasos, protegidos do excesso de radiação solar. Prefere solos de terrenos bem drenados, permeáveis, argilo-arenoso, leves, ricos em matéria orgânica e nutriente, com bom suprimento inicial e periódico de nitrogênio e com uma boa exposição à luz solar, podendo sofrer em terrenos úmidos (Martins et al.,1998).

O gênero *Salvia* possui cerca de 800 espécies (Judd, 1999) de ampla dispersão, principalmente no Mediterrâneo e Oriente, e nas regiões montanhosas subtropicais (Barroso, 1986).

4.2. Importância econômica

A família destaca-se por sua importância econômica, sendo suas espécies amplamente utilizadas como medicinais, condimentos, aromáticas e ornamentais, como por exemplo: *Salvia officinalis* L. (sálvia), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Ocimum basilicum* (basílico), *Mentha sp* (hortelã), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Lavandula angustifolia* Mill. (alfazema), *Salvia splendens* Sellow ex Roem. (sangue de adão), *Salvia guaranitica* A.St.Hill.- ex Benth. (salvia-azul) (Judd,1999).

A sálvia é uma planta medicinal muito popular que há décadas vem sendo estudada, devido aos seus componentes antioxidantes. É amplamente usada na medicina para tratamentos de vários grupos de doenças e muitas pessoas usam na preparação de alimentos (Cuvelier et al., 1996).

Os extratos aquoso, alcoólico e cetônico de *Salvia officinalis* são usados como agentes anti-sépticos, antibactericida, fungicida e antiinflamatório. É muito usado para combater a inflamação da cavidade bucal e da gengiva e também, como agente gastrintestinal (Tekel'ova, 1993). São combinados na preparação de medicamentos para o tratamento de bronquite aguda e crônica (Manolova et al., 1995), apresentando ainda propriedades hipotensiva, ação no sistema nervoso central e atividade antiespasmódica (Newall, 1996).

A atividade antioxidante da sálvia tem sido descrita em diversos trabalhos (Gulcin et al., 2004; Tepe et al., 2005) e a presença em maior ou menor quantidade desses compostos, depende de diversos fatores, tais como modo de cultivo, variações sazonais, adubação, etc.

A produção de plantas de sálvia para suprir o mercado, pode ser incentivada através de diferentes métodos. Entre eles, pode-se citar a propagação massal *in vitro*.

4.3. Cultura de tecidos de plantas

De acordo com Gratapaglia & Machado (1998), a atividade comercial da micropropagação, hoje, concentra-se principalmente na limpeza clonal e na multiplicação de espécies ornamentais e arbustivas. Num segundo plano vêm as lenhosas, com destaque para a multiplicação de porta-enxertos de fruteiras de clima temperado e árvores-elites de essências florestais de rápido crescimento. Além das razões econômicas, esta distribuição reflete o maior sucesso encontrado com a micropropagação de espécies herbáceas. Dentre estas, destacam-se as plantas medicinais que vêm despertando grande interesse econômico para a indústria farmacológica. Neste contexto, o processo de micropropagação é uma importante ferramenta não só para a produção massal de plantas isentas de patógenos, mas também para a produção de metabólitos secundários tais como alcalóides, taninos, flavonóides, fenóis, entre outros (Captan et al., 2001).

O termo cultura de tecido de plantas foi definido por George (1993) como a ciência do crescimento de células, tecidos ou órgãos isolados de uma planta em um meio artificial. Devido ao tamanho dos propágulos utilizados, a propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos é a de maior impacto (Torres et al., 1998).

As técnicas de cultura de tecidos constituem excelente instrumento de trabalho à disposição de pesquisadores das mais diferentes áreas do conhecimento científico. No caso de plantas que se propagam por sementes, estas podem apresentar variabilidade genética, que pode ser prontamente superada pela propagação *in vitro* (Pasqual & Ando, 1989). As pesquisas em células e tecidos

vegetais superiores cultivados *in vitro* têm sido estimuladas, em parte, com o objetivo de propagação de plantas em massa, estudos de fisiologia e bioquímica do crescimento e diferenciação, assim como manipulação genética (George, 1993).

A regeneração de plantas completas pode ser derivada a partir da cultura de tecido de três principais formas, que são a partir de um ápice caulinar ou gema lateral pré–existente, a partir da indução de novos ápices caulinares (organogênese) e, ainda, a partir da indução de embriões somáticos (George,1993).

Dentre as várias técnicas de cultura de tecidos, a organogênese apresenta muitas vantagens quando comparada à propagação clonal via métodos convencionais (enraizamento de estacas e enxertos, por exemplo), onde destaca-se a possibilidade de obter uma rápida e elevada multiplicação de plantas, partindo-se de um único explante (Merkle et al., 1990).

Teoricamente, todas as células vivas de plantas possuem potencial para regenerar um organismo inteiro (totipotência). Esta potencialidade tem sido explorada através da cultura *in vitro* de protoplasto, de células, de tecidos e órgãos. Tecidos que estão mitoticamente quiescentes, em vias de diferenciação ou já comprometidos com alguma função, podem ser redirecionados para a formação de órgãos ou embriões em meio de cultura apropriado (Thorpe, 1994).

De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), o processo de micropropagação divide-se em três estágios: no estágio I realiza-se a seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas. No estágio II, promove-se a multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação. No estágio III, ocorre a transferência das partes aéreas produzidas para o meio de enraizamento e subseqüente transplantio das plantas obtidas para substrato ou solo, processo este também chamado de aclimatização. Dos três estágios citados, o estágio I (assepsia do material) e estágio III (aclimatização) são considerados os estágios mais críticos no processo de micropropagação.

Geralmente, em cultura de tecidos, usam-se reguladores vegetais, tais como auxinas e citocininas, para indução de raiz e parte aérea. Contudo, nem sempre é benéfica a aplicação de reguladores vegetais imediatamente após o isolamento do explante da planta-matriz. Eles podem estimular respostas indesejadas como a formação de calo e, eventualmente, intoxicar os tecidos (Grattapaglia & Machado, 1998). Pode ser interessante, em alguns casos, fazer um pré-condicionamento dos explantes, inoculando-os em meio nutritivo sem biorreguladores. Nessa etapa, que pode durar de uma a duas semanas, são detectadas contaminações e observado o comportamento dos explantes, podendo ser selecionados aqueles que melhor resistirem à desinfestação ou que apresentaram maior vigor.

As citocininas são indispensáveis para a quebra de dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares. O tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o

sucesso da multiplicação *in vitro.* O BAP (Benzilaminopurina) tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina por excelência, para a multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias, além de apresentar menor custo. A razão da maior eficiência do BAP, seguida em ordem decrescente por cinetina (KIN) e isopenteniladenina (2iP), pode estar na capacidade dos tecidos vegetais metabolizar os hormônios naturais mais rapidamente do que os reguladores sintéticos (Hasegawa, 1980; Hu & Wang, 1983; Zaerr & Mapes,1985).

As concentrações de auxina usadas em cultura de tecidos são freqüentemente baixas se comparadas com as citocininas para manter um balanço auxina/citocinina menor que 1. Concentrações excessivas de auxina podem inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente o enraizamento ou formação de calo, em detrimento da multiplicação (Hu & Wang, 1983).

O NAA (Ácido naftalenoacético) e o IBA (Ácido indolbutírico) são, normalmente, adicionados em concentrações abaixo de 0,5 mg L^{-1}, enquanto o IAA (Ácido indol-acético), por ser menos estável em cultura, pode ser adicionado em concentrações superiores.

Além dos reguladores vegetais podem-se variar diversos elementos no meio de cultivo, entre eles está a sacarose que segundo Grattapaglia & Machado (1998), a concentração desta ou de outra fonte de açúcar, tem também efeito sobre a multiplicação e o crescimento. Concentrações de 2 a 4% (p/v) são as comuns, abaixo dessa faixa, pode ocorrer clorose nas culturas e acima dela, pode incorrer em problemas de excessivo potencial osmótico do meio, possibilitando deterioração das culturas.

Trabalhos de micropropagação de sálvia têm sido descritos, procurando principalmente obter o melhor protocolo. O uso de diferentes explantes (apical e segmento nodal) foram estudados em *Salvia valentina* e *Salvia blancoana* e a taxa máxima de proliferação de brotos foi obtida cultivando microestacas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com citocinina, porém o enraizamento foi baixo, mesmo utilizando o IAA ou IBA (Cuenca & Amo-Marco, 2000).

Liu et al. (2000) verificaram alta freqüência organogênica em *Salvia sclarea* L., usando 2,4-D (Ácido 2,4 diclorofenoxiacético) e a multiplicação dos tecidos foi realizada em meio contendo IAA e BA (Benziladenina).

O melhor meio para multiplicação de brotos via ápice caulinar em *Salvia nemerosa* foi obtido em meio MS suplementado com 8,6 µM BA e 2,9 µM IAA, enquanto que o uso da lâmina foliar como explante, forneceram calos e brotações em meio contendo 0,9 µM de BA e 2,9 µM IAA. Nesta espécie, o uso de NAA não induziu brotações, mas favoreceu a formação de raízes (Skala & Wysokinska, 2004).

Para *Salvia fruticosa* Mill Arikat et al. (2004) estabeleceram protocolo de micropropagação usando tecido apical e as brotações obtidas em meio MS acrescido de 0,75 µM de BA e a indução de raízes ocorreu em meio contendo 2,7 µM de IBA. Neste estudo foram analisados os teores de

óleos essenciais e o resultado aponta para o maior teor de cânfora borneol em material oriundo do cultivo *in vitro* durante a aclimatação.

Avato et al. (2005) relatam muitas dificuldades na fase de estabilização de brotos de sálvia. Resultados mostram que ocorre uma baixa porcentagem de crescimento (45 a 47%) com a adição de diferentes concentrações de BAP (1 ou 0,5 mg L^{-1}), as quais não apresentaram diferenças entre si. Os brotos desenvolvidos mostraram diferentes sintomas de estresse, tais como 13 a 20% de vitrificação, 20 a 27 % de oxidação e 8 a 19% de contaminação. Os autores relatam ainda que o uso de outros reguladores vegetais, tais como giberelinas, KIN e IAA, não produziram efeitos positivos.

Santos-Gomes et al. (2003) identificaram 20 compostos fenólicos em calos de *Salvia officinalis* oriundos de microestacas cultivados em meio contendo 2,4-D, BA (benziladenina) ou zeatina (ZEA) ou cinetina (KIN).

De acordo com os autores citados, entre outros trabalhos verificados na literatura, o cultivo *in vitro,* poderia potencializar o teor de algumas substâncias, como no caso deste trabalho, o teor ou atividade de substâncias antioxidantes (removedoras de radicais livres).

4.4. Atividade antioxidante

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são compostos os quais acredita-se ter um papel crucial na senescência prematura, doenças crônicas, armazenamento de alimentos e preparações farmacológicas (Kosar et al., 2005). As ROS são moléculas quimicamente reativas derivadas de oxigênio e são geradas nos organismos vivos como produto das vias metabólicas. As espécies reativas de oxigênio podem reagir diretamente com biomoléculas tais como carboidratos, proteínas, lipídeos e DNA e há evidências que o acúmulo de ROS nos sistemas biológicos causam danos oxidativos para o tecido, afetando a integridade e função das células (Zhao et al*.,* 2005).

Os danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio têm sido freqüentemente associados a patogênesis e problemas de saúde, como envelhecimento, artrite, câncer, inflamação e doenças do coração em humanos (Abe & Berk, 1998).

Diversas substâncias são descritas por apresentarem atividade antioxidante, tais como vitaminas C e E, carotenóides, compostos fenólicos, entre outros. Atualmente o uso de antioxidantes naturais em alimentos e bebidas ricas em polifenóis pode exercer efeito benéfico na saúde humana (Block et al., 1992) e seu estudo tem sido alvo de incessantes pesquisas.

Antioxidantes podem agir pelos seguintes mecanismos na peroxidação de lipídeos: diminuindo a concentração de oxigênio, prevenindo a cadeia de iniciação através do processo de remoção de radicais inicializadores, ligação catalítica com íons metálicos prevenindo a geração de radicais iniciantes e quebra de cadeia para diminuir a contínua retirada de hidrogênio por radicais

ativos (Dorman et al., 2003), ou ainda diminuir a atividade de outras enzimas como IAA oxidase (Mathesius, 2001).

A atividade antioxidante de espécies vegetais, causada principalmente pelos compostos fenólicos, tem sido demonstrada em muitos trabalhos nos últimos anos. Fenóis simples (C_6) ocorrem naturalmente e são divididos em grupos: ácidos fenólicos derivados de ácido benzóico ($C_6 - C_1$), que podem estar livres ou combinados com ésteres ou glicosídeos (ácido gálico); fenóis ácidos derivados do ácido cinâmico ($C_6 - C_3$) (ácidos cumárico, cafeico, ferúlico) que são amplamente distribuídos e ocorrem raramente no estado livre e às vezes estão estereficados e, os ésteres glicosídeos fenilpropanóides (Bruneton, 1999; Skerget et al., 2005).

Compostos fenólicos são metabólitos secundários e protegem a planta contra danos oxidativos, infecção de patógenos, entre outros (Dixon et al., 1989). Fenólicos estão localizados no vacúolo como fenol-glicosídeos e são substratos pobres para enzimas oxidativas (Calderón et al., 1992), eles necessitam ser hidrolizados antes da reação enzimática (Arnaldos et al.., 2001).

A atividade antioxidante da sálvia (*S. officinalis*) foi relatada por diversos autores (Santos-Gomes et al., 2002). Alguns dos compostos fenólicos presentes tem revelado grande especificidade ao oxigênio ativo, tais como radicais superóxido, hidroxilas e O_2 (Makaki et al.,1995), inibindo a peroxidação de lipídios (Hohmann et al.,1999).

Os flavonóides também são compostos fenólicos e têm sua estrutura baseada em 2-fenil-benzopirano ($C_6C_3C_6$), sendo representados por várias classes, de acordo com o grau de oxidação do anel central. São compostos hidrossolúveis presentes nos vacúolos das células das plantas e representam o maior grupo de compostos fenólicos vegetais. Mais de 3000 diferentes flavonóides foram descritos e são divididos em várias classes, incluindo as amplamente distribuídas antocianinas, flavonas e flavonóis (Raven, 2001). Os flavonóides são fenilbenzopironas que, usualmente, são conjugados com açúcares e estão presentes em plantas vasculares. Diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas aos flavónoides. Estes benefícios são explicados pelo seu potencial antioxidante como quelante de metal ou removedores de radicais livres, como observado por Ross & Kasum, (2002).

À *Salvia officinalis* tem sido creditado diversos usos medicinais e seus compostos fenólicos têm sido identificados por apresentarem atividade antimicrobiana, assim como, removedora de radicais livres (Makaki et al., 1995; Tepe et al., 2005).

Os compostos fenólicos presentes em sálvia tem sido identificados em diversos trabalhos e cita-se o ácido rosamarínico, ácido carnosínico, ácido salvianólico e seus derivados carnosol, rosmanol, epirosmanol, rosmadial e metil-carnosatos (Lu & Foo, 2001), entre outros.

Santos-Gomes et al. (2003) encontraram durante o cultivo de calos de *Salvia officinalis* vinte compostos fenólicos e nas células em suspensão, 18 compostos, sendo que nos dois tipos de células, houve predominância de ácido rosamarínico, representando 94-97% dos fenóis totais.

Vários trabalhos têm demonstrado a atividade antioxidante de algumas plantas, utilizando diversos métodos. A atividade removedora de radicais de alguns compostos antioxidantes pode ser avaliada através da reação com DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate), que contém radical livre estável e tem sido muito usado para avaliar a capacidade de remoção de radicais através de reações com antioxidantes (Malencic et al., 2000; Zhao et al., 2005).

Miliauskas et al. (2004) estudaram pela reação com DPPH a atividade antioxidante em *S. officinalis,* entre outras plantas e verificaram que a sálvia mostrou maior ação contra radicais livres. Comparando *S. miltiorrhiza* e *Panax ginseng,* Zhao et al. (2005) notaram que o potencial antioxidante da sálvia foi maior, usando também reação com DPPH.

De acordo com Lamaison et al. (1990), algumas espécies do gênero *Salvia* mostraram significante atividade antioxidante em extratos hidroalcóolicos com DPPH, tais como *S. lavandulifolia* (IC_{50} 80 μg mL^{-1}), *S. officinalis* (IC_{50} 41 μg mL^{-1}), *S. sclarea* (IC_{50} 45 μg mL^{-1}) e *S. triloba* (IC_{50} 50 μg mL^{-1}). Malenic et al. (2000) verificaram que *S. reflexa* apresentou índice superior (IC_{50} 106,20 μg mL^{-1}).

5 - CAPÍTULO I

Reguladores vegetais na micropropagação de *Salvia officinalis* L.[1]

Zigiotto, D.C.[1], Lima, G.P.P.[1]

[1] Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, CP 510, CEP 18.618-000, Botucatu, SP. e-mail: gpplima@ibb.unesp.br

RESUMO

Microestacas e sementes de plantas de *Salvia officinalis* foram submetidas à assepsia e inoculadas em meios nutritivos com o objetivo de produção de plantas *in vitro*. O presente trabalho foi dividido em dois experimentos. No primeiro objetivou-se testar três formas de assepsia em meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962), semi-sólido, ausente de reguladores vegetais. No segundo, foram utilizadas diferentes concentrações de reguladores vegetais (BAP – Benzilaminopurina e IBA – Ácido indol butírico) no meio de cultivo para a regeneração e multiplicação de explantes oriundos de plantas cultivadas em casa de vegetação. Durante os 60 dias de experimento foram realizadas análises visuais quanto à porcentagem de explantes contaminados, mortos e oxidados, número e altura média dos brotos. No experimento I o melhor resultado obtido para assepsia com hipoclorito de sódio a 20% foi o tempo de 30 minutos para as microestacas. As sementes não mostraram indicio de germinação. Para a proliferação de brotos, o tratamento contendo 1 mg L^{-1} de BAP foi mais eficiente, enquanto que para a altura o melhor meio de cultivo foi a testemunha (MS) sem adição de reguladores vegetais e o IBA promoveu a formação de poucas raízes.

Palavras-chave: sálvia, assepsia, BAP, IBA, cultivo *in vitro*.

ABSTRACT – Plant Growth regulators in the micropropagation of *Salvia officinalis* L. Microcuttings and seeds of *Salvia officianalis* plants have been submitted to asepsis and inoculated in nutritive medium with aims to production of the *in vitro* plants. The present work has been divided in two experiments. In the first, the aims was test three forms of asepsis in the basic culture-medium called MS (1962) semisolid, without addition of plant growth regulators. In the second has been utilizated differents concentrations of the plant growth regulators (BAP-6-benzilaminopurine, IBA-indolbutyric acid) in the cultive medium for the regeneration and multiplication of the explants originate of the cultivated plants in greenhouse. During the 60 days of the experiment was accomplished visual analysis as to percentage of contamination explants, oxidaded and death, healthy, medium number shoot height. In the experiment I the best results for obtained of asepsis in

20% sodium hyplochlorite for 30 minutes for microcuttings. However it wasn't observed any rate seed germination. The treatament containing 1 mg L^{-1} of BAP was more effective for the shoots proliferation, whereas to the height the better of culture-medium was the control (MS) without addition of plant growth regulators. The IBA induced the formation of fews roots.

Key words: sage, assepsis, BAP, IBA, micropropagation.

INTRODUÇÃO

A sálvia (*Salvia officinalis* L.) é uma planta originária do Sul da Europa, muito utilizada na medicina, assim como na fabricação de cosméticos e na culinária (Martins et al., 1998).

Ressaltando a importância das plantas medicinais nos seus diversos aspectos para a saúde humana, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que 80% da população mundial as utiliza como principal recurso básico de saúde. O mercado internacional de fitoterápicos movimenta milhões de dólares anualmente. No Brasil, cerca de 25% do faturamento da indústria farmacêutica está relacionado com fármacos derivados de plantas, mas apesar de todo este potencial, o Brasil ainda importa 84%, a um custo elevado (Simões et al., 1999).

As plantas medicinais e aromáticas têm uma grande importância para a indústria farmacêutica e para a medicina tradicional em vários países. A sálvia é uma planta medicinal muito popular e é reconhecida desde os tempos remotos pelo seu uso como tônico, estimulante, carminativo, anitséptica, entre outros (Kintzios, 2000). Mais recentemente, efeitos antioxidantes da sálvia vêm sendo demonstrados (Tepe et al., 2005; Avato et al., 2005).

Embora *S. officinalis* seja uma das espécies mais importantes comercializadas como fins medicinais, a aplicação biotecnológica de métodos de propagação tem sido pouco usado (Avato et al., 2005). A micropropagação é uma forma de obtenção vantajosa de se obter grande número de plantas, em pequeno espaço físico e temporal, além de fornecer material vegetal para estudos bioquímicos e fisiológicos, como o teor de substâncias antioxidantes.

Trabalhos de micropropagação de sálvia têm sido descritos, procurando, principalmente, obter o melhor protocolo. O uso de diferentes explantes (apical e segmento nodal) foram estudados em *Salvia valentina* e *Salvia blancoana* e a taxa máxima de proliferação de brotos foi obtida cultivando microestacas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com citocinina, porém o enraizamento foi baixo, mesmo utilizando IAA ou IBA (Cuenca & Amo-Marco, 2000).

Liu et al. (2000) verificaram alta freqüência organogênica em *Salvia sclarea* L., usando 2,4-D (Ácido 2,4 diclorofenoxiacético) e a multiplicação dos tecidos foi realizada em meio contendo IAA e BA (Benziladenina).

Devido ao interesse econômico da planta, o presente trabalho teve com objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação de sálvia (*Salvia offininalis* L.), usando BAP (benzilaminopurina) e IBA (ácido indolbutírico), para produção massal e futuros estudos bioquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação, do Departamento de Química e Bioquímica, do Instituto de Biociências (IB), UNESP, em Botucatu-SP.

A primeira etapa (Experimento I) teve como objetivo testar três formas de assepsia em meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962), utilizando como explante microestacas e sementes.

A segunda (Experimento II) teve como objetivo determinar concentrações adequadas de reguladores vegetais no meio de cultivo para a fase de regeneração e multiplicação de explantes. Durante esta fase foram realizadas as análises visuais não destrutivas.

O material vegetal utilizado para os experimentos foi obtido de plantas cultivadas no Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP/Botucatu (Jardim Clonal).

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio nutritivo, ausente de regulador vegetal. Como meio de cultura utilizou-se a combinação de nutrientes proposta por Murashige & Skoog (MS) (1962), acrescido de fonte de carbono (sacarose-30%) e solidificado com ágar (7%). No caso do experimento II (regeneração e multiplicação) acrescentou-se ao meio de cultura MS combinações de concentrações de benzilaminopurina (BAP) e ácido indol butírico (IBA).

Após o ajuste do pH para 5,8, os meios foram autoclavados a uma temperatura de 121 ºC por 20 minutos (1 atm).

Experimento I – Assepsia

Para implantação do experimento de assepsia utilizou-se como fonte de explantes sementes e microestacas (gemas apicais e laterais) com um centímetro de comprimento, obtidas segundo

descrição anterior. Esta fase é extremamente delicada, pois a partir de experimentos prévios, a assepsia se torna determinante na obtenção de plântulas sadias.

O experimento de germinação i*n vitro* de sementes foi realizado em delineamento inteiramente casualizado contendo três tratamentos utilizando o ácido sulfúrico (2N) por 5, 10 e 20 minutos e três sub-tratamentos, desinfestação em hipoclorito de sódio 20% (contendo 2% de cloro ativo) por 3, 6 e 9 minutos, com cinco repetições, cada uma contendo 20 sementes sendo que o procedimento com o ácido foi feito em capela e depois levado para a câmara de fluxo, onde estas foram imersas em banho de hipoclorito de sódio a 20%. Foi testada também uma assepsia sem o uso do ácido sulfúrico. As sementes após lavagem em água estéril (três vezes), foram inoculadas em meio MS ausente de reguladores vegetais.

Após a inoculação das sementes, os vidros foram levados para a câmara de crescimento, onde permaneceram 15 dias no escuro e 30 dias no claro ou até os explantes atingirem 1 cm de altura, com temperatura controlada em torno de 24 ± 1 ºC e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro).

Outros testes foram realizados na tentativa de promover a germinação *in vitro* de sálvia, tal como redução pela metade da concentração dos sais propostos por Murashige & Skoog (1962) e uso de escuro em toda a fase experimental.

Para o experimento com gemas utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado contendo três tratamentos [desinfestação em hipoclorito de sódio (20%) por 15, 30 e 45 minutos], com cinco repetições cada uma contendo cinco explantes (gemas laterais e apicais). Os explantes foram inoculados em meio MS básico contendo apenas a metade da concentração dos sais minerais e em outro com adição de reguladores vegetais (0,5 mg L^{-1} de BAP e 0,25 mg L^{-1} de IBA), Durante essa fase foram feitas análises visuais quanto ao número de plântulas contaminadas, mortas, presença de oxidação, brotação, enraizamento e vitrificação.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa computacional SIGMA STAT 2.0.

A partir dos resultados obtidos neste primeiro ensaio, implantou-se o segundo ensaio utilizando-se o método de assepsia que apresentou menor percentagem de explantes contaminados, mortos ou oxidação.

Experimento II – Regeneração e multiplicação

Para a realização do segundo experimento utilizou-se plantas oriundas da germinação das sementes em substrato específico, com aproximadamente 3 cm, contendo 2 pares de folhas (incluindo as cotiledonares). O substrato foi constituído por mistura de 1:1:1 de areia branca fina, esterco de curral e grama seca. O delineamento foi inteiramente casualizado, contendo cinco

tratamentos com cinqüenta repetições de uma amostra cada, totalizando cinqüenta explantes por tratamento.

As plantas formadas, denominadas explantes foram coletadas assim que atingiram 1 cm de altura e levadas para o laboratório onde estas passaram pelo processo de assepsia que consistiu em 3 minutos em álcool 70 % e em hipoclorito de sódio 20% (solução comercial, contendo 2% cloro ativo) por 30 minutos (melhor resultado de assepsia obtido no experimento I). Passaram pela tríplice lavagem em água esterilizada sendo transferidas para meio semi-sólido de cultura (MS) acrescido de sacarose, ágar e diferentes concentrações e combinações de reguladores vegetais (BAP e IBA) (Tabela 1).

TABELA 1. Combinações de diferentes concentrações de BAP e IBA referentes aos tratamentos utilizados durante a fase de multiplicação e regeneração (Fase II).

TRATAMENTOS	CONCENTRAÇÕES (mg L^{-1})
TRATAMENTO 1	TESTEMUNHA (MS)
TRATAMENTO 2	1,0 BAP
TRATAMENTO 3	1,0 BAP x 0,25 IBA
TRATAMENTO 4	2,0 BAP
TRATAMENTO 5	2,0 BAP x 0,25 IBA

Após 30 dias de inoculação em meio, foram realizadas as primeiras análises quanto ao tamanho (altura em cm), número de brotações, formação de raízes, presença de calos, oxidação, contaminação e mortalidade.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa computacional SIGMA STAT 2.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I – Assepsia

a. Gemas apicais ou laterais

Foram testados diversos tipos de assepsia para as gemas, porém, devido ao baixo número de plantas sobreviventes (Tabela 2), novas plantas foram semeadas em estufa, de onde foram retiradas gemas para inoculação *in vitro.*

Um dos fatores limitantes ao sucesso da micropropagação *in vitro* é a adequação da metodologia de assepsia dos explantes. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), uma das dificuldades da micropropagação reside no fato de se obter um explante descontaminado sem conduzi-lo a morte quando isolado.

O uso de hipoclorito de sódio 20% por 45 minutos induziu alta taxa de oxidação nos explantes logo nos primeiros 5 dias, promovendo o aparecimento de partes escuras nas plantas e no meio, causando a morte de todos os explantes, sendo portanto, este tratamento não utilizado. Nota-se pela tabela 1 que o número de explantes sadios, sobreviventes nos dois tempos de assepsia foi muito baixo. O uso de hipoclorito de sódio 20% por 30 minutos, promoveu menor infestação de fungos e bactérias, agentes causais da contaminação observada no presente trabalho, porém a taxa de sobrevivência de 33,33% é muito baixa para micropropagação, já que o custo de produção é alto. Testes com concentrações maiores de hipoclorito foram utilizados, porém a taxa de oxidação foi muito alta.

TABELA 2. Porcentagem de explantes contaminados, oxidados, sadios (sobreviventes) e com brotações, obtidos de gemas axilares e apicais de plantas de sálvia, em dois tempos de desinfestação com hipoclorito de sódio (20 %).

	15 MINUTOS	30 MINUTOS	C.V (%)
CONTAMINADOS	10,00 a	12,28 a	7,3
OXIDADOS	23,33 a	14,04 b	0,72
SADIOS	16,67 b	33,33 a	4
C/BROTOS	0,5 b	3,75 a	3,5

A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado ou senescente, que contém alta concentração desses componentes (George & Sherington, 1984). Esses compostos fenólicos são oxidados por enzimas polifenol oxidases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura (Grattaplaglia & Machado, 1998; Guerra, 1989). Uma das possibilidades técnicas para reduzir esse problema inclui a lavagem em água corrente dos explantes coletados, antes da desinfestação, auxiliando a lixiviação dos compostos fenólicos (Grattapaglia & Machado, 1998), técnica realizada no presente experimento, porém sem êxito.

Segundo Leifert et al. (1994), os principais gêneros de fungos, causa mais comum da perda de explante em cultura de tecidos, têm sido o *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus, Botrytis, Alternaria* e *Fusarium* e Borges et al. (1997) sugerem que o pré-tratamento de matrizes seja determinante para a redução da porcentagem de contaminação e não o tratamento de desinfestação.

Pode-se também atribuir a ocorrência dessas contaminações à manipulação dos explantes, durante a inoculação. Bactérias do gênero *Bacillus* são bastante tolerantes ao calor, podendo os esporos resistir a temperaturas maiores que 100°C e a tratamentos com álcool e hipoclorito de cálcio ou sódio (Leifert et al., 1994), sendo que os principais gêneros de bactérias fitopatogênicas são: *Xanthomonas, Pseudomonas, Erwinia, Corynebacterium e Agrobacterium*. Os resultados do presente trabalho indicam que o método de assepsia usando hipoclorito de sódio por 30 minutos reduziu a porcentagem de contaminação, porém não de modo satisfatório para se ter uma produção em larga escala e de baixo custo.

A contaminação por fungos e bactérias presentes no meio de cultura pode ser causada pela presença de fungos e bactérias endógenas, pela manipulação do material vegetal utilizado ou pela desinfestação inadequada dos materiais de laboratório. A contaminação endógena, geralmente é causada pelas bactérias presentes nos tecidos vegetais. Os métodos de desinfestação nem sempre eliminam os microorganismos associados aos tecidos vegetais, muitos deles permanecem latentes no interior das células e nos espaços intercelulares ou vasos condutores ficando protegidos dos agentes químicos e, freqüentemente, se manifestam nas primeiras semanas de cultivo (Capó, 1998).

Neste experimento, uma alternativa para diminuir a incidência de contaminação seria a utilização de antibióticos ou mesmo fungicidas, mas como na planta poderia ocorrer dano, ou alteração de cor ou de forma, ou qualquer variação, alterando o teor de substâncias antioxidantes, já que se trata de uma medicinal, evitou-se o uso destes produtos.

Observa-se também que não ocorreu brotação com o uso da menor concentração do agente desinfestante, por outro lado, a contaminação foi menor, mas a taxa de explantes escurecidos, provavelmente oxidados, foi maior. Assim, devido à baixa taxa de brotação obtida no tempo de 30 minutos, as gemas axilares e apicais foram inoculadas em meios contendo reguladores vegetais, esperando-se uma taxa de sobrevivência maior, com brotações, mesmo perdendo-se plantas por contaminação.

Os resultados da tabela 3 mostram que explantes, desinfestados com hipoclorito de sódio, por 30 minutos, apresentaram maior taxa de plantas sadias e menor oxidação, quando inoculados em meio contendo reguladores vegetais. Nota-se que o uso de reguladores (BAP – 0,5 mg L^{-1} e IBA – 0,25 mg L^{-1}) induziu a formação de calos em ambos os tratamentos. Mesmo com estes resultados obtidos, a taxa de explantes sobreviventes foi baixa e, portanto, a obtenção de plantas via sementes em casa de vegetação, se tornou um método mais eficiente para obter grande número de explantes (gemas apicais e laterais).

TABELA 3. Porcentagem de explantes contaminados, oxidados, sadios, com brotações e com calos obtidos de gemas axilares e apicais de plantas de sálvia oriundas do Jardim Clonal (FCA/Botucatu), em dois tempos de desinfestação com hipoclorito de sódio (20%) e cultivadas em meio MS com 0,5 mg L^{-1} de BAP e 0,25 mg L^{-1} IBA.

	15 MINUTOS	30 MINUTOS	C.V (%)
CONTAMINADOS	10,00 b	15,79 a	11
OXIDADOS	23,33 a	14,03 b	9
SADIOS	18,33 b	31,58 a	4
C/BROTOS	3,39 b	17,54 a	6,8
CALOS	6,67 a	7,02 a	2,1

b. Inoculação de sementes

Todos os testes realizados com sementes não induziram germinação *in vitro*. Diversos testes tais como, uso de ácido sulfúrico, lavagem em água corrente e escarificação mecânica, foram efetuados na tentativa de induzir a germinação das sementes de sálvia em meio de cultura, porém sem sucesso. O primeiro fator que poderia afetar seria a dormência das sementes, mas após testes em gerbox, notou-se boa taxa de germinação (80%), o que levou a descartar a possível dormência. Testaram-se também diversos lotes de sementes, mas todos apresentaram o mesmo resultado.

Diversos trabalhos mostram que as sementes de sálvia apresentam boa taxa de germinação. Menezes et al. (2004), em trabalho com salvia ornamental, notaram que a semente de sálvia comporta-se como indiferente à luz, e as temperaturas de 15, 20 e 25°C afetam a velocidade de germinação das sementes, sendo que 15°C retarda o processo germinativo. Neste trabalho, todas as sementes foram mantidas a 25°C e foram testados tanto escuro como luz, sendo que nenhum tratamento foi eficiente para induzir a germinação *in vitro*. Esses resultados não se repetiram quando plantou-se em substrato e em estufa, e nesse experimento a taxa de germinação foi de 90%.

A baixa percentagem de germinação ou emergência pode ser uma conseqüência de problemas como dormência das sementes, baixo vigor ou devido a fatores ambientais como temperatura, luz, dificuldade de embebição, que por não serem bem conhecidos, dificultam o manuseio e causam prejuízos (Menezes et al., 2004), o que foi descartado neste trabalho, já que as sementes germinaram bem em substrato e em casa de vegetação (Figura 1).

FIGURA 1. Germinação de semente em substrato para obtenção de explantes de *Salvia officinalis*.

Experimento II – Regeneração, multiplicação *in vitro*

A partir dos resultados obtidos no primeiro experimento, implantou-se o segundo, utilizando-se o melhor tempo de assepsia, isto é, 30 minutos em hipoclorito de sódio a 20%. Os explantes (microestacas com 1 cm), após inoculação em meio de cultura, foram levados para a câmara de crescimento onde permaneceram no claro por 60 dias em temperatura controlada em torno de 24 ± 1ºC e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro).

Na Tabela 4 nota-se que mesmo usando explantes cultivados em casa de vegetação, a taxa de contaminação foi alta, principalmente no tratamento 5. Em todos os tratamentos, a contaminação foi geralmente devido a bactérias e não ocorria no meio e sim, na planta, nos levando a supor que possivelmente seria uma contaminação endógena, necessitando o uso de antibióticos, tanto na assepsia, como no meio de cultura. Entretanto, como a finalidade deste projeto é de obter atividade antioxidante da sálvia, não foi usado fungicida ou antibiótico, os quais poderiam interferir nas determinações.

TABELA 4. Porcentagem de explantes contaminados e oxidados e número médio de brotos e altura média de brotos em sálvia cultivada *in vitro*, sob efeito de diferentes concentrações e combinações de BAP e IBA.

	TRATAMENTOS					
	T1	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**	**C.V (%)**
Contaminados (%)	18,10 b	21,46 b	22,97 ab	20,72 b	26,00 a	9,38
Oxidados ou mortos (%)	25,52 a	24,31 ab	20,67 b	20,36 b	22,00 b	8,44
Número médio de brotos	3,61 ab	4,10 a	1,98 c	2,99 b	3,11 b	12,09
Número médio de raízes	-	-	1	-	2	-
Altura média de brotos	2,67 a	1,81 b	1,46 b	1,80 b	1,70 b	22,39

Médias seguidas da mesma letra na horizontal, não mostram diferenças significativas ($p < 0,05$)

Pode-se observar que plantas inoculadas em meio contendo apenas a solução básica de sais proposta por Murashige e Skoog (1962), apresentaram menor taxa de contaminação e maior porcentagem de oxidação e ou mortalidade. O maior número de brotos ocorreu no tratamento 2, isto é, contendo apenas 1 mg L^{-1} de BAP.

As citocininas como a 6-benzilaminopurina (BAP) promovem a formação de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação, ao passo que a cinetina (CIN) e o 2iP permitem o crescimento normal sem múltiplas brotações (Hu & Wang, 1983). As citocininas de modo geral, promovem a produção de partes aéreas, mas seu excesso pode ser tóxico e levar ao encurtamento dos entrenós e a problemas na fase de enraizamento (Leshem et al., 1988). Neste trabalho, nota-se que a menor concentração de BAP utilizada promoveu a maior formação de brotos e em concentrações maiores, este resultado não foi observado, principalmente quando em combinação com IBA. Erig et al. (2002) também notaram que a combinação de BAP com IBA não influenciou o número de brotações, enquanto que o uso de BAP isoladamente aumentou a taxa de multiplicação de brotos em amoreira preta. Por outro lado, para George (1996), a associação, no meio de cultura, de BAP e IBA, pode induzir a proliferação de partes aéreas, diferente do observado no presente trabalho.

Skala & Wysokinska (2004), trabalhando com *Salvia nemerosa*, observaram que a adição de IBA não foi tão eficiente na produção de brotos, mesmo combinado com BA (benziladenina), quando comparado com o uso de BA isoladamente.

Pode ser observada a presença de raízes em plantas de sálvia cultivadas na presença da auxina, sendo que esse regulador vegetal foi determinante para a formação de raízes, mesmo que em baixo número. Resultados semelhantes são descritos por diversos autores (Couto et al., 2003; Bosa et al., 2003). Segundo George (1996), a presença de auxina é necessária para a indução do enraizamento em segmentos caulinares. Plantas que respondem à ausência de auxina exógena possuem, presumivelmente, suficientes níveis endógenos.

Diversos trabalhos mostram a eficiência do IBA na indução de raízes durante a micropropagação de sálvia. Em *S. nemerosa*, Skala & Wysokinska (2004) obtiveram, após 4 semanas, 82% de enraizamento usando este regulador vegetal, enquanto que o uso de IAA induziu a formação de 96% de raízes e NAA, 100%. Por outro lado, para *Salvia sclarea*, Liu et al. (2000) não observaram bons resultados para enraizamento usando IAA ou NAA, enquanto que em *Salvia valentina*, Cuenca & Amo-Marco (2000) notaram inibição da formação de brotos e as raízes produzidas foram pequenas e em número reduzido.

Na tabela 3 observa-se também, que explantes cultivados em meio MS básico sem adição de reguladores vegetais, apresentaram maior alongamento dos brotos em relação aos demais tratamentos. Nota-se que com aumento das concentrações de BAP houve diminuição na altura dos

brotos, como também relatado por outros autores (Fráguas et al., 2004; Koubouris & Vasilakakis, 2006).

Conclusão

O melhor tempo de assepsia de microestacas de sálvia foi de 30 minutos com hipoclorito de sódio a 20%. Para a proliferação de brotos, o uso de BAP (1 mg L^{-1}) foi eficiente. A formação de raízes podem ser induzidas por IBA.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AVATO, P.; FORTUNATO, I.M.; RUTA, C.; D'ELIA, R. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. **Plant Science**, v.169, p.29-36, 2005.

BORGES, A.L.; ALVES, EJ; SILVA, SO; SOUZA, L.S. **O cultivo da banana**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CMPMF, 1997. 109p. (Circular técnica, 27).

BOSA N.; CALVETE, E.O.; NIENOW, A.A.; SUZIN,M. Rooting and aclimatization of micropropagated *Gypsophila paniculata* plants. **Horticultura Brasileira**, v.21, p.207-210, 2003.

CAPÓ, Y. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. In: CAPÓ, Y.; KOSKY, R.; GONZALES, E.; PERES, P. (Eds.). **Propagacion y mejora genetica de plantas por biotecnologia**. Santa Clara: s.n., 1998. p. 80-102.

COUTO, M.; WAGNER JUNIOR, A.; QUEZADA, A.C. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'Barrier' em diferentes concentrações de acido indol-3-butirico (AIB) e do meio Murashige & Skoog (MS). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, p.367-370, 2003.

CUENCA, S.; AMO-MARCO, J.B. *In vitro* propagation of two spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation. ***In Vitro* Cellular and Development Biology-Plant**, v.36, p.225-229, 2000.

ERIG, A.C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G.R.L. 6-Benzylamino purine and indol butyric acid on the in vitro multiplication of blackberry (*Rubus idaeus*), cv. Tupy. **Ciencia Rural**. V.32, p.765-770, 2002.

FRÁGUAS, C.B.; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F.; CAZETTA, J.O. Micropropagation of fig (*Fícus carica*) 'Roxo de Valinhos' plants. In vitro Cellular and developmental Biology-Plant, v.40, n.5, p.471-474, 2004.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part II – In Practice. Edingdon, Wilts : Exegetics, 1996. 1361p.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture, handbook and diretory of commercial laboratories. Everley:Exegetics, 1984. 709p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH, 1998. p.183-260.

GUERRA, M.P. Embriogenese somática em *Euterpe eduilis* Mart. (Palmae). 1989. 202 p. Tese (Doutorado em Botanica), Universidade Estadual Paulista, Sao Paulo.

HU, Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y.; ed. **Handbook of plant cell culture:** techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan, p.117-227, 1983.

KINTZIOS, S.E.; Medicinal and aromatic plants – industrial profiles, Sage, The genus Salvia. **Harwood Academic Publishers**, The Netherlands. v.14, 2000.

KOUBOURIS, G.; VASILAKAKIS, M. Improvement of *in vitro* propagation of apricot cultivar 'Bebecou'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.85, p.173-180, 2006.

LEIFERT, C.; MORRIS, C.E.; WAITES, W.M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants; reasons for contamination problems *in vitro*. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v.13, n.2, p.139-183, 1994.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALER, D.P. The effect of cytokinins on vitrification ain melon and carnation. **Annals of Botany,** v.62, p.271-276, 1988.

LIU, C.Z.; MURCH, S.J.; El-DEMENDASH, M. Regeneration of *Salvia sclarea* via organogenesis. **In vitro Cell. Development Biolog. Plant.,** v.36, p. 201-206, 2000.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1998. 220p.

MENEZES, N.L.; FRANZIN, S.M.; ROVERSI, T.; NUNES, E.P. Seeds germination of Salvia splenden Sellow in temperature and light quality diferents. **REvista Brasileira de Sementes,** . v.26, p.32-37, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum,** v.15, p.473-497, 1962.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. Farmacognosia – da planta ao medicamento. **Editora da Universidade e Editora da USC**, p.821, 1999.

SKALA, E.; WYSOKINSKA, H. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants. ***In Vitro* Cellular and Development Biology-Plant**, v.40, p.596-602, 2004.

TEPE, B.; DAFERERA, D.; SAKMEN, A.; LAKMEN, M.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Mill (Lamiaceae). **Food Chemistry**, v.90, p. 333-340, 2005.

6 - CAPÍTULO II

Compostos fenólicos e atividade antioxidante em *Salvia officinalis* cultivada *in vitro*

Daniela Cristiane Zigiotto[1], Giuseppina Pace Pereira Lima[2]

[1] Universidade Estadual Paulista – UNESP, Mestranda em Ciências Biológicas do Departamento de Botânica, CP 510, CEP 18.618-000, Botucatu, SP.
[2]Universidade Estadual Paulista – UNESP, Profª. Dra. do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, CP 510, CEP 18.618-000, Botucatu, SP.
Tel: (14) 3811-6255 e-mail: gpplima@ibb.unesp.br

Resumo: Micropropagação de sálvia foi obtida através de microestacas, oriundas de plantas cultivadas em casa de vegetação, em meios contendo BAP e/ou IBA. Aos 30 e 60 dias foram analisados os teores de fenóis totais e flavonóides totais, além da atividade antioxidante (extrato metanólico), por DPPH. Os resultados mostram que as microestacas cultivadas em meio contendo BAP e/ou IBA, nas concentrações e combinações utilizadas, não induziu aumentos nos teores de flavonóides totais. Plantas cultivadas em meio contendo BAP mostraram os maiores teores de fenóis totais solúveis. A atividade antioxidante foi maior quando se usou no meio a combinação dos dois reguladores vegetais.

Palavras – chave: atividade antioxidante, flavonoides, micropropagação.

Phenolic compounds and antioxidant activity in *Salvia officinalis* cultivated *in vitro*

Abstract: Micropropagation of sage was taken through microcuts, derivated of cultivated seeds *in vitro*, in medium with BAP (Benzilaminopurine) and/or IBA (Indol butiric acid). In the 30 and 60 days the total phenol and flavonoids content and antioxidant activity have been analyzed by DPPH (metanolic extract). The results of biochemical analysis showed that cultivated explants in medium content BAP and IBA, in the concentration and arrangement used not induced increase in the levels of total flavonoids in plants cultivated *in vitro*. Seedless cultivated in medium with BAP showed the greater phenolic compounds content. The antioxidante activity was greater when the combination was used in medium with growth regulators.

Key words: antioxidant activity, flavonoids, micropropagation.

INTRODUÇÃO

Pesquisas realizadas nos últimos anos relatam que muitos vegetais apresentam, em sua constituição, compostos com ação antioxidante, dentre os quais destacam-se as especiarias, ingredientes utilizados no preparo de alimentos, na produção de fármacos, entre outros. O efeito antioxidante de diversas plantas foi comprovado e a sálvia foi considerada uma das mais eficazes (Melo et al., 2003).

A presença de compostos fenólicos em plantas medicinais vem sendo alvo de muitos estudos por apresentarem atividade antioxidante (Block et al., 1992). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários e protegem a planta contra danos oxidativos, infecção de patógenos, entre outros (Dixon et al., 1989). Fenólicos estão localizados no vacúolo como fenol-glicosídeos e são substratos pobres para enzimas oxidativas (Calderón et al., 1992). Entre os compostos fenólicos, encontra-se os flavonóides.

Os flavonóides também são compostos que têm sua estrutura baseada em 2-fenil-benzopirano ($C_6C_3C_6$), sendo representado por várias classes, de acordo com o grau de oxidação do anel central. São compostos hidrossolúveis presentes nos vacúolos das células das plantas e representam o maior grupo de compostos fenólicos vegetais. Mais de 3000 diferentes flavonóides foram descritos e são divididos em várias classes, incluindo as amplamente distribuídas antocianinas, as flavonas e os flavonóis (Raven, 2001). Diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas aos flavónoides. Estes benefícios são explicados pelo seu potencial antioxidante como quelante de metal ou removedores de radicais livres, como observado por Ross & Kasum em 2002.

Antioxidantes podem agir pelos seguintes mecanismos na peroxidação de lipídeos: diminuindo a concentração de oxigênio, prevenindo a cadeia de iniciação através do processo de remoção de radicais inicializadores, ligação catalítica com íons metálicos prevenindo a geração de radicais iniciantes e quebra de cadeia para diminuir a contínua retirada de hidrogênio por radicais ativos (Dorman et al., 2003), ou ainda diminuir a atividade de outras enzimas como IAA oxidase (Mathesius, 2001).

Vários trabalhos têm demonstrado a atividade antioxidante de algumas plantas, utilizando diversos métodos. A atividade removedora de radicais de alguns compostos antioxidantes pode ser avaliada através da reação com DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate), que contém radical livre estável e tem sido muito usado para avaliar a capacidade de remoção de radicais através de reações com antioxidantes (Malencic et al., 2000; Zhao et al., 2005).

Para *Salvia officinalis* tem sido creditado diversos usos medicinais e compostos fenólicos têm sido identificados por apresentarem atividade antimicrobiana, assim como removedora de radicais livres (Makaki et al., 1995; Tepe et al., 2005).

Os compostos fenólicos presentes em sálvia têm sido identificados em diversos trabalhos e citam-se: ácido rosamarínico, ácido carnosínico, ácido salvianólico e seus derivados carnosol, rosmanol, epirosmanol, rosmadial e metil-carnosatos (Lu & Foo, 2001), entre outros.

Os metabólitos presentes em sálvia estão sendo identificados e foi verificado que os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos na espécie, contribuindo para a atividade antioxidante. Vários trabalhos descrevem os diferentes compostos (Kosar et al., 2005), porém, o estudo em plantas cultivadas *in vitro* é escasso. Além disso, plantas cultivadas dessa forma podem apresentar variações no conteúdo devido ao modo de cultivo. Por outro lado, a micropropagação é uma forma de aumentar a produção de plantas, independentes de interferências do meio. A propagação *in vitro* fornece plantas em qualquer época do ano e é uma importante ferramenta para estudos bioquímicos.

Apesar das dificuldades no ajuste e desenvolvimento de protocolos para cultura *in vitro,* estudos desta natureza são relevantes, podendo-se destacar a cultura da sálvia, pela sua importância econômica.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo a determinação os teores de fenóis totais e flavonóides totais, além da atividade antioxidante, em plantas de sálvia (*S. officinalis*) micropropagadas e plantas matrizes oriundas do campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação, do Departamento de Química e Bioquímica, do Instituto de Biociências (IB), UNESP, Botucatu-SP.

Para a realização do experimento utilizou-se plantas oriundas da germinação das sementes em substrato, constituído por mistura de areia branca fina, esterco de curral e grama seca (1:1:1).

Plântulas com aproximadamente 25 dias e 3 cm, contendo 2 pares de folhas (incluindo as cotiledonares) foram levadas para o laboratório de micropropagação. As plantas formadas, denominadas explantes, após assepsia por 3 minutos em álcool 70 % e em hipoclorito de sódio 20% (solução comercial, contendo 2% cloro ativo) por 30 minutos passaram por tríplice lavagem em água esterelizada (destilada e autoclavada). Após esse procedimento, foram retirados microestacas, de aproximadamente 1,0 cm, contendo um par de gemas (explantes) e inoculadas em meios de cultura, contendo sais minerais proposto por Murashige & Skoog (1962), acrescido de sacarose (3 %), ágar (6 %) e diferentes concentrações e combinações de 6-Benzilaminopurina (BAP) e Ácido Indol-butírico (IBA) (Tabela 1). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo cinco tratamentos com 50 repetições de uma amostra (planta) cada.

Tabela 1. Combinações de diferentes concentrações de BAP e IBA usadas para inoculação de explantes de sálvia.

TRATAMENTOS	CONCENTRAÇÕES (mg L^{-1})
Tratamento 1	Testemunha (MS)
Tratamento 2	1,0 BAP
Tratamento 3	1,0 BAP x 0,25 IBA
Tratamento 4	2,0 BAP
Tratamento 5	2,0 BAP x 0,25 IBA

Teor de flavonóides totais

Os flavonóides totais foram determinados pelo método colorimétrico descrito por Liu et al. (2002). Amostras de tecido fresco foram maceradas em metanol em temperatura ambiente e alíquotas colocadas em tubos de ensaio e diluídas com metanol e $NaNO_2$ 5%. $AlCl_3.6H_2O$ 10% foi adicionado e após 5 minutos, NaOH foi acrescido. A mistura foi bem homogeneizada e a absorbância lida imediatamente contra um branco, a 510 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis. O teor de flavonóides totais será determinado em comparação com uma curva de referência (quercetina).

Teor de fenóis totais

O teor de fenóis foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1965; Singleton et al., 1999). A curva de referência foi preparada com ácido tânico. Para análise nas plantas, 1 ml de extrato metanólico foi misturado com reagente de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio (75 g/L). A absorção foi lida após 30 minutos a 20 ^{o}C a 765 nm em espectrofotômetro UV-Vis.

Atividade antioxidante (DPPH)

Para avaliar a atividade antioxidante potencial de extratos de sálvia, foi medida através do método descrito por Gyamfi et al. (1999). Alíquotas dos extratos foram misturadas com tampão Tris-HCl (pH 7,4) e DPPH em metanol. Após 30 minutos o resultado da absorbância em 517 nm foi aplicado para determinação do CE_{50} ou IC_{50} (porcentagem de inibição).

Aos 30 e 60 dias da instalação do experimento *in vitro* foram realizadas coletas das plantas para serem submetidas às análises bioquímicas de flavonóides, fenóis e atividade antioxidante (DPPH), o mesmo procedimento foi realizado aos 60 dias. Essas análises também

foram realizadas em plantas *in vivo* (planta cultivada em casa de vegetação) como parâmetros de comparação.

Para cada análise bioquímica utilizou-se o delineamento inteiramente casualisado contendo três repetições com uma planta cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa computacional SIGMA STAT 2.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de flavonóides (Tabela 2) pode-se observar que entre os tratamentos da primeira coleta, assim como da segunda, ocorreu diferença significativa. Nota-se que o maior teor de flavonóides foi encontrado na testemunha, tanto aos 30, como aos 60 dias. Plantas cultivadas com BAP em combinação com IBA, independente da concentração usada, apresentaram teores de flavonóides totais semelhante ao da testemunha aos 30 dias, enquanto que aos 60 dias, essa semelhança não foi observada. Os resultados mostram ainda que aos 30 dias, as plantas cultivadas *in vitro* apresentam maiores teores de flavonóides que aos 60 dias. O uso dos reguladores vegetais BAP e IBA, nas concentrações e combinações utilizadas, não induziu aumentos nos teores de flavonóides totais em plantas cultivadas *in vitro.*

Os resultados mostram ainda um outro dado importante, que as plantas cultivadas *in vitro* tendem a apresentaram valores maiores de flavonóides totais em relação às plantas cultivadas no campo e que plantas cultivadas *in vitro*, em meio ausente de reguladres apresentaram o maior teor de flavonóides, tanto aos 30, como aos 60 dias. Resultados diferentes foram relatados por Santos-Gomes et al. (2002), os quais notaram que o uso de citocinina (BA ou KIN) não promoveu aumento de flavonóides em relação às plantas comerciais.

Tabela 2. Teor de flavonóides totais (µg quercetina. g^{-1} massa fresca) em *Sálvia officinalis* L. aos 30 e 60 dias, cultivadas *in vitro* e no campo.

Coletas (dias)	Planta campo	Testemunha (T1)	1,0 BAP (T2)	1,0 BAP x 0,25 IBA (T3)	2,0 BAP (T4)	2,0 BAP x 0,25 IBA (T5)	Média
30	9,31 Ba	28,30 Aa	14,88 Ba	18,62 ABa	9,22 Ba	19,92 ABa	16,71 a
60	9,31 Ba	21,19 Aa	5,76 Bb	6,48 Bb	5,37 Ba	2,93 Bb	8,51 b
Média	9,31 B	24,75 A	10,32 B	12,55 B	7,30 B	11,42 B	

Letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas iguais, não mostram diferença significativa ($p < 0,05$). C.V(%) = 34,71

Em relação ao teor de fenóis totais solúveis aos 30 dias de cultivo *in vitro,* pode-se observar que os maiores teores foram encontrados na planta do campo (cultivada em casa de vegetação) e no tratamento 5 contendo a maior concentração de BAP e IBA. Baixos níveis de fenóis totais foram encontrados nos tratamentos contendo a combinação de BAP e IBA aos 60 dias de cultivo *in vitro.*

Nota-se que tantos nos teores de flavonóides (Tabela 3), como nos teores de fenóis totais, os teores médios nas coletas foram maiores aos 30 dias, quando comparado com 60 dias. Santos-Gomes et al. (2003) também observaram que os teores de compostos fenólicos foram inversamente correlacionados com o crescimento das culturas e interpretaram os resultados como uma conseqüência da maior demanda de carbono e energia, além do fluxo metabólico favorecido para biossíntese do metabolismo primário, principalmente biomassa. Os autores também encontraram aumento nos compostos fenólicos em plantas cultivadas *in vitro*, comparadas com sálvia comercial, isto é, cultivada no campo. Esses resultados também podem ser verificados neste trabalho quanto ao teor de flavonóides, mas não com os de fenóis totais.

Tabela 3. Teor de fenóis totais solúveis (µg ácido tânico. g^{-1} massa fresca) em *Sálvia officinalis* L. aos 30 e 60 dias, cultivadas *in vitro* e no campo.

Coletas (dias)	Planta campo	Testemunha (T1)	1,0 BAP (T2)	1,0 BAP x 0,25 IBA (T3)	2,0 BAP (T4)	2,0 BAP x 0,25 IBA (T5)	Média
30	583,40 Aa	332,43 Bb	436,22 ABa	537,35 ABa	590,02 Aa	388,18 ABa	477,94 a
60	583,40 Aa	528,06 ABa	584,24 Aa	332,69 Bb	460,33 ABa	331,12 Ba	469,97 a
Média	583,38 A	430,25 AB	510,23 AB	435,04 AB	525,18 AB	359,65 B	

Letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas iguais, não mostram diferença significativa ($p < 0,05$). C.V(%) = 19,89

O uso da citocinina BAP na produção de brotos também pode ter influenciado os parâmetros analisados. Trabalhos relatam que o tipo e a concentração de citocinina interferem no teor de compostos fenólicos. Santos-Gomes et al. (2002) observaram que o menor teor de compostos fenólicos foi encontrado em brotações de sálvia cultivadas em meio contendo 1,5 mg L^{-1} de BA, comparada com KIN em três concentrações diferentes (1,5; 2,0 e 4,0 mg L^{-1}). Os autores atribuem esse efeito ao alto potencial morfogênico das células em presença de BA, pois promoveu maior produção de brotações. Neste trabalho, o uso de BAP, uma citocinina com ação semelhante ao BA, mostrou bons resultados em relação aos fenóis totais, principalmente na maior concentração (2 mg L^{-1}) e produziu bom número de brotações (2,99). Em contrapartida, com o uso da menor concentração de BAP (1 mg L^{-1}), as plantas produziram teor de fenóis totais semelhante estatisticamente ao tratamento contendo 2 mg L^{-1} de BAP, porém induziram maior número de

brotações (4,10), sendo que o uso desta citocinina isolada no meio de cultura, não promoveu a formação de raízes, encontrado nos tratamentos contendo IBA (média de uma raiz por planta).

O uso de IBA no meio de cultura não induziu, como esperado, a formação de raízes (média de 1 raiz por planta cultivada em meio contendo IBA), entretanto, um efeito favorável sobre o teor de flavonóides foi observado. Plantas cultivadas em meio contendo IBA mostraram maiores concentrações de flavonóides, porém não diferiram significativamente dos demais tratamentos. Em relação aos teores de fenóis totais, o uso de IBA no meio também não promoveu aumentos desses compostos.

Geralmente, os compostos fenólicos aumentam a ação da auxina no enraizamento através da inibição do IAA-oxidase e conseqüentemente, a destruição do IAA (ácido indol-acético) (Padney & Pathak, 1981). Pelos níveis de compostos fenólicos observados neste trabalho, esperava-se enraizamento, que não ocorreu. De acordo com Trobec et al. (2005), alguns compostos fenólicos (monofenóis e m-difenóis) podem agir inibindo o enraizamento por estimular a oxidação do IAA ou promover a descarboxilação, enquanto alguns deles não mostram efeito regulador no conteúdo de IAA em tecidos vegetais.

Por outro lado, o teor de fenóis totais e flavonóides observado neste trabalho em plantas cultivadas *in vitro,* podem ser vantajosos, já que a sua produção pode ser controlada em laboratório, dada à facilidade deste controle e acredita-se que esta pode ser uma boa alternativa para produção de compostos antioxidantes.

A atividade antioxidante (Tabela 4) foi determinada nos microestacas de sálvia cultivada *in vitro,* aos 30 e 60 dias, além da planta matriz. Não ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) para coletas e nem para a interação entre coletas e tratamentos. Nota-se que plantas cultivadas em meio contendo a combinação de BAP e IBA mostraram as maiores atividades antioxidantes realizadas em extrato metanólico via DPPH, em comparação com os demais tratamentos e ainda, ocorre uma tendência das plantas cultivadas via micropropagação apresentarem maior atividade antioxidante.

Tabela 4. Atividade antioxidante (porcentagem) em *Sálvia officinalis* L. aos 30 e 60 dias, cultivadas *in vitro* e no campo.

Coletas (dias)	Planta campo	Testemunha (T1)	1,0 BAP (T2)	1,0 BAP x 0,25 IBA (T3)	2,0 BAP (T4)	2,0 BAP x 0,25 IBA (T5)	Médias
30	85.46 a	111.37 a	104.39 a	112.09 a	108.76 a	129.81 a	108.65 a
60	85.46 a	106.23 a	79.82 a	141.88 a	131.45 a	135.24 a	113.35 a
Médias	85.46 B	108.80 AB	92.11 AB	126.99 AB	120.11 AB	132.52 A	

Letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas iguais, não mostram diferença significativa ($p < 0,05$). CV = 21.80%

A atividade antioxidante pode ser tomada como uma propriedade da célula em remover radicais livres formados por processos oxidantes, formando as ROS (espécies reativas de oxigênio), que são moléculas quimicamente reativas derivadas de oxigênio e há evidências que o acúmulo de ROS nos sistemas biológicos causa danos oxidativos para o tecido, afetando a integridade e função das células (Zhao et al., 2005). Antioxidantes são compostos que inibem ou atrasam a oxidaçào de outras moléculas pela inibição da iniciação ou propagação da cadeia de reação de oxidação e diversas moléculas podem ser consideradas antioxidantes, como a vitamina C, carotenóides, fenóis e flavonóides (Larson, 1988; Tepe et al., 2007).

Assim, neste trabalho a atividade antioxidante encontrada pode ser devida aos compostos analisados, mas principalmente aos fenóis totais, já que diversos autores descrevem como o ácido rosmarínico (composto fenólico) como o principal agente antioxidante encontrado em sálvia (Santos-Gomes et al., 2002; Tepe et al., 2007) e a interelação entre atividade antioxidante de extratos vegetais e conteúdo de fenóis tem sido previamente relatada (Maillard & Berset, 1995).

De acordo com Lamaison et al. (1990), algumas espécies do gênero *Salvia* mostraram significante atividade antioxidante em extratos hidroalcólicos com DPPH, tais como *S. lavandulifolia* (IC_{50} 80 μg mL^{-1}), *S. officinalis* (IC_{50} 41 μg mL^{-1}), *S. sclarea* (IC_{50} 45 μg mL^{-1}) e *S. triloba* (IC_{50} 50 μg mL^{-1}). Malencinc et al. (2000) verificou que *S. reflexa* apresentou índice superior (IC_{50} 106,20 μg mL^{-1}). Neste trabalho nota-se que o IC_{50} encontrado foi muito próximo ou superior ao descrito na literatura, dependendo dos tratamentos utilizados.

O uso da combinação de 2 mg L^{-1} de BAP e 0,25 mg L^{-1} de IBA, induziu valores de IC_{50} em torno de 132 μg mL^{-1} de extrato, resultado superior ao encontrado na literatura, enquanto que nos demais tratamentos as plantas mostraram valores próximos aos citados na literatura, senão algumas vezes superior, sugerindo que possivelmente, as plantas produzidas via micropropagação possam apresentar níveis superiores de compostos antioxidantes, tais como fenóis, como descrito por Santos-Gomes et al. (2003).

Os resultados mostram que as plantas de sálvia cultivadas *in vitro* mantêm a habilidade de produzir fenóis totais e flavonóides totais, conseqüentemente, sua atividade antioxidante. Assim, a cultura de tecidos de *Sálvia officinalis* é um bom sistema para estudar compostos antioxidantes, tais como compostos fenólicos.

CONCLUSÃO

Microestacas cultivadas em meio contendo BAP e/ou IBA, nas concentrações e combinações utilizadas, não induziu aumentos nos teores de flavonóides totais em plantas

cultivadas *in vitro.* Na combinação dos dois reguladores ocorre maior atividade antioxidante. Plantas cultivadas em meio contendo BAP contem maiores teores de fenóis totais solúveis.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BLOCK, G.; PETERSON, B.; SUBAR, A. Fruits, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition and Cancer**, v.18, p.1–29, 1992.

CALDERÓN, A.A.; GARCIA FLORENCIANO, E.; MUÑOZ, R.; ROS BARCELÓ, A. Gamy grapevine peroxidase: Its role in vascular anthocyanidin degradation. **Vitis,** v.31, p.139-147, 1992.

DIXON, N.M.; KELL, D.B. The inhibition by CO_2 of the growth and metabolism of microorganisms, **Journal of Applied Bacteriology**, v.7, p.109-136, 1989.

DORMAN, H.J.D.; KOSAR, M.; KAHLOS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties of aqueous extracts from Mentha species, hybrids, varieties and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v.51, p.4563–4569, 2003.

FOLIN, O.; CIOCALTEU V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.27, p.627-650, 1927.

GYAMFI, M. A.; YONAMINE, M.; & ANIYA, Y. Free radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: Thonningia sanguinea on experimentally-induced liver injuries. **General Pharmacology,** v.32, p.661–667,1999.

KOSAR, M.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v.91, p.525-533, 2005.

LAMAISON, J.L.; PETITJEAN-FREYTET, C.; CARNAT, A. Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic derivative contents and antioxidant activity of medicinal Apiaceae, Borraginaceae and Lamiaceae. **Annal Pharm Franc**.v.48, p. 103-108, 1990.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**. v.27, p.969-978, 1988.

LIU, M.; LI, X.Q.; WEBER C.; LI, C.Y.; BROWN, J.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.2926-2930, 2002.

LU, Y.; FOO, L.Y. Salvianolic acid L. a potent antioxidant from *Salvia officinalis*. **Tetrahedron Lettus**, v.42, p.8223-8225, 2001.

LU, Y.; FOO, L.Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis).* **Food Chemistry,** v.75, p.197-202, 2001.

MAILLARD, M.N., BERSET, C. Evolution of antioxidant activity during kilning role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v.43, p. 1789-1793, 1995.

MAKAKI, H.; SAKAKI, S.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. **Biological Pharmacological Bulletin,** v.18, p.162-166, 1995

MALENCINC, Dj.; GASIC, O.; POPOVIC, M.; BOZA, P. Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* Hornem. **Phytotherapy Research**, v.14, p.546-548, 2000.

MATHESIUS, U. Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. **Journal of Experimental Botany.** v.52, p.419-426, 2001.

MELO, E.A., MANCINI FILHO, J., GUERRA, N.B. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v.23, p.195-199, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum,** v.15, p.473-497, 1962.

PADNEY, D., PATHAK, R.K., Effect of rootstocks, IBA and phenolic compounds on the rooting of apple cuttings. **Propagation of Horticulture**. v.13, p.10-105, 1981.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal,** 6º ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001, p.906.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. **Annual Revues of Nutrition**, v.22, p.19-34, 2002.

SANTOS-GOMES, P.C.; SEABRA, R.M.; ANDRADE, P.B; FERNANDES-FERREIRA, M.. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.), **Plant Science**. v.162, p.981-987, 2002.

SANTOS-GOMES, P.C.; SEABRA, R.M; ANDRADE, P.B; FERNANDES-FERREIRA, M. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.1025-1032, 2003.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMANUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Cicalteu reagent. **Methods in Enzimology,** v.299, p.152-178,1999.

TEPE, B.; DAFERERA, D.; SAKMEN, A.; LAKMEN, M.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Mill (Lamiaceae). **Food Chemistry**, v.90, p.333-340, 2005.

TEPE, B., EMINAGAOGLU, O.H., AKPULAT, A., AYDIN, E., Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. **Food Chemistry**, v.100, p.985-989, 2007.

TROBEC, M., ŠTAMPAR, F., VEBERIČ, R., OSTERC, G. Fluctuations of different endogenous phenolic compounds and cinnamic acid in the first days of the rooting process of cherry rootstock 'Gisela 5' leafy cuttings. **Journal of Plant Physiology,** v.162, p.589-597, 2005.

ZHAO, G-R.; XIANG, Z.J.; YUAN, Y-J.; GUO, Z-X. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. **Food Chemistry**, v.99, p.767-774, 2005.

7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados, pode-se observar que alguns dos objetivos foram alcançados. É necessário ressaltar que para alcançar os objetivos foi preciso adaptar algumas das metodologia utilizadas, como por exemplo, o próprio protocolo da planta (*Salvia officinalis*), e as metodologias de Fenóis Totais e DPPH as quais exigiam material seco.

Como um dos objetivos era a germinação *in vitro* e esta não ocorreu, utilizou-se outras fontes de explantes (microestacas), onde obteve-se baixa taxa de sobrevivência para produção massal, mas que foi eficiente para a finalidade de testar combinações de concentrações de reguladores vegetais no meio de cultivo, promovendo assim a multiplicação.

Através das análises bioquímicas foi possível comprovar que em sálvia *in vitro* ocorre aumento nos teores de flavonóides e teores de fenóis totais assim como na atividade antioxidante se comparadas com plantas cultivadas em casa de vegetação.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, J.; BERK, B.C. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular diseases. **Trends in Cardiovascular Medicine,** v.8, p.59-64, 1998.

ARIKAT, N.A.; JANAD, F.M.; KARAM, N.S.; SHIBLI, R.A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v.100, p.193-202, 2004.

ARNALDOS, T.L.; MUÑOZ, R.; FERRER, M.A.; CALDERÓN, A.A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananassa,* cv. *Chandler*) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v.113, p.315-322, 2001.

AVATO, P.; FORTUNATO, I.M.; RUTA, C.; D'ELIA, R. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. **Plant Science**, v.169, p.29-36, 2005.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** Viçosa: Imprensa da Universidade Federal de Viçosa, 1986. 326 p.

BLOCK, G.; PETERSON, B.; & SUBAR, A. Fruits, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition and Cancer**, v.18, p.1–29, 1992.

BORGES, A.L.; ALVES, EJ; SILVA, SO; SOUZA, L.S. **O cultivo da banana**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CMPMF, 1997. 109p. (Circular técnica, 27).

BOSA N.; CALVETE, E.O.; NIENOW, A.A.; SUZIN,M. Rooting and aclimatization of micropropagated *Gypsophila paniculata* plants. **Horticultura Brasileira**, v.21, p.207-210, 2003.

BRUNETON, J. Pharmacognosy Phytochemistry. **Medicinal Plants** (second ed.). Paris: Lavoisier Plublishing, 1999.

CALDERÓN, A.A.; GARCIA FLORENCIANO, E.; MUÑOZ, R.; ROS BARCELÓ, A. Gamy grapevine preoxidase: Its role in vacular anthocyanidin degradation. **Vitis**. v.31, p.139-147, 1992.

CAPÓ, Y. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. In: CAPÓ, Y.; KOSKY, R.; GONZALES, E.; PERES, P. (Eds.). **Propagacion y mejora genetica de plantas por biotecnologia**. Santa Clara: s.n., 1998. p. 80-102.

CAPTAN, E.; OTUKI, M.F.; VIANA. A.M. *In vitro* culture of *Phyllanthus stipulatus* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, p.25-34, 2001.

COSTA, A.F. **Farmacognosia.** 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994, 1031 p.

COUTO, M.; WAGNER JUNIOR, A.; QUEZADA, A.C. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'Barrier' em diferentes concentrações de acido indol-3-butirico (AIB) e do meio Murashige & Skoog (MS). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, p.367-370, 2003.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of florewening plants.** The New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p.

CUENCA, S.; AMO-MARCO, J.B *In vitro* propagation of two spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.36, p.225-229, 2000.

CUVELIER, M.E.; RICHARD, H.; BERSET, C., Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary**. Journal of the American Oil Chemists' Society.** v.73, p.645-652, 1996.

DIXON, N.M.; KELL, D.B. The inhibition by CO_2 of the growth and metabolism of microorganisms, **Journal of Applied Bacteriology**, v.7, p.109-136, 1989.

DORMAN, H.J.D.; KOSAR, M.; KAHLOS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties of aqueous extracts from Mentha species, hybrids, varieties and cultivars**. Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v.51, p.4563–4569, 2003.

ERIG, A.C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G.R.L. 6-Benzylamino purine and indol butyric acid on the *in vitro* multiplication of blackberry (*Rubus idaeus*), cv. Tupy. **Ciência Rural**. v.32, p.765-770, 2002.

EVANS, W.C. **Farmacognosia**. México: Interamericana, 1991. 812p.

FARNSWORTH, N.R.; SOEJARTO, D.D. Global importance of medicinal plants. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (Eds). **Conservation of medicinal plants.** Cambridge: Cambridge University Press, p.25-51, 1991.

FOLIN, O. & CIOCALTEU V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.27, p.627-650, 1927.

FRÁGUAS, C.B.; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F.; CAZETTA, J.O. Micropropagation of fig (*Fícus carica*) 'Roxo de Valinhos' plants. In vitro Cellular and developmental Biology-Plant, v.40, n.5, p.471-474, 2004.

GEORGE, E.F.; **Plant propagation by tissue culture**, 2º Ed Exegetic Limited, 1993, 574p.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture, handbook and diretory of commercial laboratories. Everley:Exegetics, 1984. 709p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH, 1998. p.183-260.

GUERRA, M.P. Embriogenese somática em *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). 1989. 202 p. Tese (Doutorado em Botanica), Universidade Estadual Paulista, Sao Paulo.

GULCIN, I.; UGUZ. M.Y.L.; OKTAY, M.; BEYDEMIR,S.; KUFREYIOGLU, O.I. Evoluation of the antioxidant and antimicrobial actives of clay sage (S*alvia sclarea* L.). **Turkish Journal of Agriculture and Foresty,** v.28, p.25-33, 2004.

GYAMFY, M. A.; YONAMINE, M.; & ANIYA, Y. Free radicalscavenging action of medicinal herbs from Ghana: Thonningia sanguinea on experimentally-induced liver injuries. **General Pharmacology,** v.32, p.661–667,1999.

HARLEY, R.M.; **Summary statistics for Brazil: Labiatae.** Versão 22 de Janeiro de 1994. 9p. Mimiografado.

HASEGAWA, P.M. Factores affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. **Journal of the Americam Society for Horticultural Science,** v.105, p.216-220, 1980.

HEDGE, I.C. A global survey of the biogeography of the Labiatae. In: HARLEY, R.M.; REYNOLDS, T. (Eds). **Advances in Labiatae Science.** London: Royal Botanic Gardens Kew, p.7-17, 1992.

HERTWIG, I.F.V. **Plantas aromáticas e medicinais**. 2.ed. São Paulo: Cone, 1991. 414p.

HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the wold.** New York: Oxford University Press. 1993. 620p.

HOHMANN, J.; ZUPKO, I.; REDEI, D.; CSANYI, M.; FALKAY, G.; MATHE, I.; JANICSAK, G. Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. **Planta Médica**, v.65, p.576–578. 1999.

HU, Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y.; ed. **Handbook of plant cell culture:** techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan, p.117-227, 1983.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993. 777p.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. Sunderland: Sinauer Associates, 1999. 464p.

KINTZIOS, S.E.; Medicinal and aromatic plants – industrial profiles, Sage, The genus Salvia. **Harwood Academic Publishers**, The Netherlands. v.14, 2000.

KOSAR, M.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v.91, p.525-533, 2005.

KOUBOURIS, G.; VASILAKAKIS, M. Improvement of *in vitro* propagation of apricot cultivar 'Bebecou'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.85, p.173-180, 2006.

LAMAISON, J.L.; PETITJEAN-FREYTET, C.; CARNAT, A. Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic derivative contents and antioxidant activity of medicinal Apiaceae, Borraginaceae and Lamiaceae. **Annal Pharm Franc,**v.48, p.103-108, 1990.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**. v.27, p.969-978, 1988.

LEIFERT, C.; MORRIS, C.E.; WAITES, W.M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants; reasons for contamination problems *in vitro*. **Critical Reviews in Plant Science**, v.13, n.2, p.139-183, 1994.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALER, D.P. The effect of cytokinins on vitrification ain melon and carnation. **Annals of Botany,** v.62, p.271-276, 1988.

LIU, M.; CHILCOTT, C.E.; REICH, R.C.; HELLMANN, G.M. Regeneration of *Salvia sclarea* via organogenesis. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v.36, p.201-206, 2000.

LIU, M.; LI, X.Q.; WEBER C.; LI, C.Y.; BROWN, J.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. **Journal of Agriculture and Food**, v.50, p.2926-2930, 2002.

LU, Y.; FOO, L.Y. Salvianolic acid L. a potent antioxidant from *Salvia officinalis*. **Tetrahedron Lettus**, v.42, p.8223-8225, 2001.

MAILLARD, M.N., BERSET, C. Evolution of antioxidant activity during kilning role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v.43, p. 1789-1793, 1995.

MASAKI, H.; SAKAKI, S.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts, **Biological Pharmacological Bulletim,** v.18, p.162-166, 1995

MALENCINC, Dj.; GASIC, O.; POPOVIC, M.; BOZA, P. Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* Hornem. **Phytotherapy Research**, v.14, p.546-548, 2000.

MANOLOVA, N.; SERKEDJIEVA, J.; IVANOVA, V. Anti-influenza activity of the plant preparation 'Broncho Pam' .**Fitoterapia**, v.56, p.223-226, 1995.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1998. 220p.

MATHESIUS, U. Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. **Journal of Experimental Botany,** v.52, p.419-426, 2001.

MATSINGOU, T.C.; PETRAKIS, N.; KAPSOKEFALOU, M.; SALIFOGLOU, A. Antioxidant activity of organic extracts from aqueous infusions of sage. **Journal of Agriculture and Food Chemistry,** v.50, p.6696-6701, 2003.

MELO, E.A., MANCINI FILHO, J., GUERRA, N.B. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v.23, p. 195-199, 2003.

MENEZES, N.L.; FRANZIN, S.M.; ROVERSI, T.; NUNES, E.P. Seeds germination of Salvia splenden Sellow in temperature and light quality diferents. **Revista Brasileira de Sementes.** v.26, p.32-37, 2004.

MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; WILLIAMS, E.G. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning In: BHOJWANI, S.S. (ed). Developments in Crop Science, 19, **Plant Tissue Culture: Applications & limitations,** Amsterdam-Oxford-Tokyo: Elsevier, p.67-101, 1990.

MILIAUSKAS G.; VENSKUTONIS P.R.; VAN BEEK T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v.85, p.231-237, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum,** v.15, p.473-497, 1962.

NEWALL, C.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. Sage. In: NEWALL, C.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. (Eds). **Herbal medicines: a guide for health-care professionals**. London: The Pharmaceutical Press, p.347-372, 1996.

PADNEY, D., PATHAK, R.K., Effect of rootstocks, IBA and phenolic compounds on the rooting of apple cuttings. **Propagation of Horticulture**. v.13, p.10-105, 1981.

PASQUAL, M.; ANDO, A. Micropropagação da laranja Valência através da cultura de tecido de gemas axilares *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v.2, p. 723-726, 1989.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal,** 6º ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S. A., 2001, p.906.

ROSS, J.A. & KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. **Annual Revieus of Nutrition**, v.22, p.19-34, 2002.

SANTOS-GOMES, P.C.; FERNANDES-FERREIRA, M. Organ and seasondependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated in two different sites, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.49, p.2908- 2916, 2001.

SANTOS-GOMES, P.C.; SEABRA, R.M.; ANDRADE, P.B; FERNANDES-FERREIRA, M.. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.), **Plant Science**. v.162, p.981-987, 2002.

SANTOS-GOMES, P.C.; SEABRA, R.M; ANDRADE, P.B; FERNANDES-FERREIRA, M. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.1025-1032, 2003.

SCKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A.R. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food chemistry,** v.89, p.191-198, 2005.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMANUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Cicalteu reagent. **Methods in Enzimology,** v.299, p.152-178,1999.

SKALA, EWA.; WYSOKINSKA, HALINA. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants. **In Vitro Cellular and Development a Biology-Plant**, v.40, p.596-602, 2004.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. Farmacognosia – da planta ao medicamento. **Editora da Universidade e Editora da USC**, Florianópolis/SC, p.821, 1999.

TEKEL'OVA, D. *Salvia officinalis* L. Part 1. **Cesk Farm**, v.42, p.111-116, 1993.

TEPE, B.; DAFERERA, D.; SAKMEN, A.; LAKMEN, M.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Mill (Lamiaceae). **Food Cheminstry**, v.90, p. 333-340, 2005.

TEPE, B., EMINAGAOGLU, O.H., AKPULAT, A., AYDIN, E., Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. **Food Chemistry**, v. 100, p. 985-989, 2007.

THORPE, T.A. Morphogenesis and Regeneration. In: VASIL I.K.; THORPE T.A. (ed). **Plant Cell and Tissue Culture.** Kluwer Academic Dordrecht Publishers, p.17-36, 1994.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília, v.1, p.183-242. 1998.

TROBEC, M., ŠTAMPAR, F., VEBERIČ, R., OSTERC, G. Fluctuations of different endogenous phenolic compounds and cinnamic acid in the first days of the rooting process of cherry rootstock 'Gisela 5' leafy cuttings. **Journal of Plant Physiology,** v.162, p.589-597, 2005.

ZAERR, J.B.; MAPES, M.O. Action of growth regulators. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J., ed. **Tissue culture in forestry.** 2.ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff, p.231-255, 1985.

ZHAO, G-R.; XIANG, Z.J.; YUAN, Y-J.; GUO, Z-X. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. **Food Chemistry**, v.99, p.767-774, 2005.