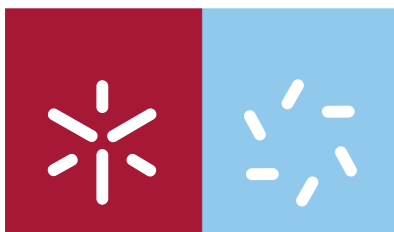


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Meirilane Gonçalves Coelho **Óleos essenciais para aromaterapia**

Meirilane Gonçalves Coelho

Óleos essenciais para aromaterapia



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Meirilane Gonçalves Coelho

Óleos essenciais para aromaterapia

Mestrado em Biotecnologia e Bio-empendedorismo
em Plantas Aromáticas e Medicinais.

Trabalho efectuado sob a orientação do
Professor Doutor Manuel Fernandes Ferreira

Este trabalho foi realizado nas instalações do CITAB,
Departamento de Biologia da Escola de Ciências da
Universidade do Minho

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ____, ____, _____

Assinatura: _____

Aos meus pais, pelo apoio incondicional durante toda esta trajetória.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Manuel Fernandes Ferreira pela orientação e confiança em mim depositada, bem como pelo apoio, disponibilidade e interesse manifestados para realização deste trabalho.

À Escola de Ciências, em especial, ao Departamento de Biologia e ao Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas - CITAB pela disponibilização das instalações e dos meios necessários à realização deste trabalho.

À Universidade do Minho e a cidade de Braga por todo o acolhimento.

Aos investigadores e técnicos do Departamento de Biologia pela ajuda e colaboração, principalmente, ao Doutor Gregory Franklin que auxiliou nas técnicas de transformação.

Aos colegas de laboratório pelo auxílio e por compartilharem comigo os seus conhecimentos.

Aos colegas André e Cris, que se disponibilizaram com tanto carinho na revisão e formatação deste trabalho.

Aos colegas de mestrado que me acolheram e sempre se mobilizaram a meu favor, nunca esquecerei a forma como me mostraram que aquilo que é humano vai além de qualquer fronteira.

À grande família de brasileiros e portugueses que tive aqui em todos os momentos de descontração e compreensão, pessoas muito especiais.

Aos meus familiares e amigos que mesmo à distância se fizeram presentes com suas palavras de incentivo e força.

Ao Frederico por ter compreendido a distância e ter me apoiado de forma tão terna nesta busca.

Aos meus pais que me ajudaram desde os primeiros passos e por sempre me incentivarem a lutar pelos meus objectivos, a eles todo o meu amor.

E, à Deus, único e onipotente, sem o qual não estaria aqui.

A todos, muito obrigada!

Resumo

O potencial terapêutico de óleos essenciais de *Salvia sclarea*, *Salvia officinalis* cv. 'purpurascens', *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) em doenças neurodegenerativas e de óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* (Geraniaceae) como ansiolítico, muitas vezes utilizados em Aromaterapia sugerem o papel relevante da regulamentação deste sector, designadamente quanto a critérios de controlo de qualidade. Tendo isto em mente, a investigação realizada no âmbito deste trabalho teve como principais objectivos: (i) conhecer a composição dos óleos essenciais destas espécies e (ii) desenvolver uma alternativa de produção de metabolitos secundários através da manipulação biotecnológica.

Relativamente a micropropagação, as espécies da família Lamiaceae foram as mais difíceis de estabelecer, dada as elevadas quantidades de compostos fenólicos que os explantes libertam para o meio. As melhores respostas foram dadas com a presença de uma citocinina no meio, 0,75 mg/L de ZEA para *R. officinalis*, 0,25 mg/L de BA para *S. officinalis* cv 'purpurascens' e 0,5 mg/L de ZEA, juntamente com 0,04 de GA₃ e 0,02 mg/L de NAA, para *S. sclarea*. Relativamente a *P. graveolens*, foram obtidos bons resultados (62%) em meio MS suplementado com 0,5 mg/L de BA e 0,1 mg/L de NAA. Esta espécie, posteriormente, também foi aclimatizada com uma taxa de 75% de sucesso. O número mais elevado de rebentos caulinares induzidos em culturas *in vitro* de *P. graveolens* foi de 2,3 e 2,0 por explante, constituídos por segmentos nodais e segmentos peciolares, respectivamente.

A composição dos óleos essenciais foi determinada para plantas *in vivo* e culturas *in vitro* destas por GC e GC-MS. O OE de folhas e flores de plantas *in vivo* de *S. sclarea* foi marcada pela presença de germacreno D e *E*-cariofileno (folhas) e acetato de linalilo e linalool (flores) ao passo que, nas folhas de plântulas *in vitro* houve a presença de um composto peculiar, o fitol representando 74% do óleo. *S. officinalis* mostrou um perfil do OE bem semelhante nas plantas *in vivo* e plântulas *in vitro* com a presença do β -pineno, α -tujona e cânfora. Os OE produzidos pelas flores, plantas *in vivo* e plantas *in vitro* de *R. officinalis* apresentavam um perfil químico semelhante, sendo maioritários o α -pineno, 1,8-cineole, verbenona e cânfora. Já no óleo de *P. graveolens* houve grandes diferenças do perfil químico, nas condições *in*

vivo era fortemente marcado pela isomentona (62%) e nas condições *in vitro* por α -guaieeno (27%) e 10-epi- γ -eudesmol (23%). Verificou-se que na composição destes óleos estavam presentes em quantidades relevantes constituintes tais como, 1,8 cineole, α - e β - pineno, α -tujona, linalool e acetato de linalilo que são citados por sua actividade neuroprotetora em doenças degenerativas e actividade ansiolítica.

À parte a infecção generalizada dos explantes de *P. graveolens* utilizados numa única tentativa de transformação genética de *P. graveolens*, mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, registaram-se sinais de indução de *hairy roots* a partir de um único explante dos que foram submetidos à transformação.

Palavras-chave: Actividade ansiolítica, aromaterapia, doenças neurodegenerativas, *hairy roots*, micropropagação, óleos essenciais, plantas aromáticas e medicinais (PAM), *Pelargonium graveolens*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Salvia sclarea*.

Abstract

The therapeutic potential of essential oils of *Salvia sclarea*, *Salvia officinalis* cv. 'purpurascens' and *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae), in neurodegenerative diseases, and that of essential oils of *Pelargonium graveolens* (Geraniaceae) as anxiolytic, repeatedly used in Aromaterapy, justify the importance given in regulating this sector, particularly, in what respects the criteria for quality control.

Concerning this, the general aims of the research developed with this work was: (i) to know the essential oils composition of the target species and (ii) to develop an alternative approach to the production of secondary metabolites by biotechnological manipulation. Relatively to the micropropagation the species belonging to the Lamiaceae family were the most difficult to establish, since they release large amounts of phenolic compounds to media. From the approaches performed, the best responses of the plant explants to the media conditions were given in the presence of a cytokinin in the medium, 0,75 mg/L of ZEA for *R. officinalis*, 0,25 mg/L of BA for *S. officinalis* cv. 'purpurascens', 0,5 mg/L of ZEA, more 0,04 of GA₃, and 0,02 mg/L of NAA for *S. sclarea*. Concerning *P. graveolens*, the highest-quality results (62% of regeneration from all explants used) were on the medium MS supplemented with 0,5 mg/L of BA and 0,1 mg/L of NAA. This species was subsequently acclimatized with a success rate of 75%. The highest number of shoots regenerated from each explants (2.3 and 2.0) were got from nodal and petiole segments, respectively.

The analysis of the essential oils (EO), were performed using GC and GC-MS. EO were isolated by hydrodistillation of leaves and flowers of *in vivo* plants of *S. sclarea* and *R. officinalis*, leaves of *in vivo* plants of *S. officinalis* cv. 'purpurascens' and *P. graveolens*, and leaves of *in vitro* plantlets of the four species. The EO of *S. sclarea* leaves was marked by the presence of germacrene D and *E*-caryophyllene and that of the respective flowers marked by linalyl acetate and linalool. In the EO of leaves of *S. sclarea in vitro* plants occurred the presence of a peculiar compound, the phytol, representing 74% of oil. *In vivo* e *in vitro* plants of *S. officinalis* showed EO profiles very similar, with the presence of β -pinene, α -thujone and camphor, as major compounds. Comparing the OE produced by flowers, *in vivo* and *in vitro* plants of *R. officinalis* a similar chemical profile could also be found,

showing as major compounds: α -pinene, 1,8-cineole, verbenone and camphor. The EO of *in vivo* plants of *P. graveolens* was strongly marked by isomenthone (62%), while the EO of *in vitro* plantlets was marked by α -guaiene (27%) and 10-epi- γ -eudesmol (23%). It was found that the composition of these oils contained relevant amounts of 1,8 cineole, α - and β -pinene, α -thujone, linalool and linalyl acetate, constituents that have recognized neuroprotective and anxiolytic activities.

Notwithstanding the generalized infection occurred to the explants of *P. graveolens* used in the genetic transformation approaches, using *Agrobacterium rhizogenes*, one only explant gave good signals of transformation through the *hairy root* phenotype that it showed.

Key words: Activity anxiolytic, aromatherapy, essential oils, *hairy roots*, medicinal and aromatic plants, micropropagation, neurodegenerative diseases, *Pelargonium graveolens*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Salvia sclarea*.

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vii
Índice	ix
Glossário- Abreviaturas/ Siglas	xii
Índice de Figuras	xiii
Índice de Quadros	xv
Índice de Tabelas	xvi
I- Introdução geral	
1- Plantas aromáticas e medicinais	01
2- Óleos essenciais	03
2.1- Biossíntese de compostos terpénicos	05
3- Família Lamiaceae	07
3.1- <i>Salvia</i> sp	08
3.1.1- <i>Salvia sclarea</i> L	09
3.1.2- <i>Salvia officinalis</i> L	09
3.1.3- Actividade biológica	10
3.2- <i>Rosmarinus</i> sp	12
3.2.1- <i>Rosmarinus officinalis</i> L	13
3.2.2- Actividade biológica	13
4- Família Geraniaceae	15
4.1- <i>Pelargonium</i> sp	15

4.1.1- <i>Pelargonium graveolens</i> L. Herit.....	16
4.1.2- Actividade biológica.....	17
5- Culturas <i>in vitro</i> de tecidos e órgãos vegetais.....	17
5.1- Tipologias de cultura <i>in vitro</i> de sistemas vegetais: Micropropagação..	19
5.2- Utilização de culturas <i>in vitro</i> para produção de metabolitos secundários.....	19
6- Transformação genética de plantas: aplicação da tecnologia do DNA recombinante à produção de <i>hairy roots</i>	21
7- Doenças mentais.....	25
7.1- Doenças neurodegenerativas.....	26
7.2- Depressão e stresse.....	27
7.3- Prevenção e tratamento.....	28
8- Terapias alternativas: Aromaterapia.....	29
9- Objectivos.....	32
II- Materiais e Métodos	
1- Material vegetal.....	34
2- Estabelecimento das culturas <i>in vitro</i>	34
2.1- Estudo do efeito do explante de <i>Pelargonium graveolens</i>	37
2.2- Aclimatização de <i>Pelargonium graveolens</i>	37
3- Indução de <i>hairy roots</i> de <i>Pelargonium graveolens</i>	37
4- Isolamento dos óleos essenciais e avaliação do rendimento.....	39
5- Identificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	40
6- Análise quantitativa.....	42

III- Resultados e Discussão	
1- Estabelecimento das culturas <i>in vitro</i>	43
2- Germinação de sementes de <i>Salvia sclarea</i>	51
3- Efeito do tipo de explante na micropropagação de <i>Pelargonium graveolens</i>	52
3.1- Micropropagação de <i>Pelargonium graveolens</i> através de raízes.....	54
4-Aclimatização de <i>Pelargonium graveolens</i>	56
5- Transformação mediada por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	57
6- Estudo da composição dos óleos essenciais produzidos por plantas <i>in vivo</i> e culturas <i>in vitro</i>	59
6.1- Isolamento dos óleos essenciais e determinação dos respectivos rendimentos.....	60
6.2- Óleos essenciais de <i>Salvia sclarea</i>	60
6.3- Óleos essenciais de <i>Salvia officinalis</i> cv "purpurascens".....	66
6.4- Óleos essenciais de <i>Rosmarinus officinalis</i>	70
6.5- Óleos essenciais de <i>Pelargonium graveolens</i>	73
6.6- Utilização dos óleos essenciais das espécies estudadas em aromaterapia.....	77
IV- Considerações finais e perspectivas futuras	80
V- Referências bibliográficas	83

Glossário- Abreviaturas/Siglas

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoacético
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
AchE	Acetilcolinaesterase
BA	6-benzilaminopurina ou benziladenina
BHT	Butylated hydroxytoluene
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO₆₀₀	Densidade óptica à 600 nanômetros
DXP	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
FID	Flame ionization detector
FPP	Farnesil difosfato
GA₃	Ácido giberélico
GABA	Ácido gama amino butírico
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
GGPP	Geranilgeranil difosfato
GPP	Geranil difosfato
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
IAA	Ácido indolacético
IK	Índice de Kovats
IPP	Isopentenil difosfato
Kin	Cinetina
MS	Meio Murashige & Skoog
NAA	Ácido α -naftaleno acético
NGF	Nerve growth factor
OE	Óleos essenciais
PAM	Plantas Aromáticas e Medicinais
PAR	“Photosynthetic Active Radiation”
pH	Potencial hidrogeniônico
Psi	Pound per square inch- unidade de pressão
ROS	Espécies reactivas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
T-ADN	Transferred DNA
T-ADN Ri	Root-inducing transferred-DNA
TR	Tempo de retenção
ZEA	Zeatina

Índice de Figuras

I- Introdução geral

Figura 2-1:	Molécula de Isopreno.....	05
Figura 3-1:	<i>Salvia sclarea</i> L.....	09
Figura 3-2:	<i>Salvia officinalis</i> L. cv "purpurascens".....	10
Figura 3-3:	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	13
Figura 4-1:	<i>Pelargonium graveolens</i> L. 'Hérit.....	17

III- Resultados e discussão

Figura 1-1:	Plântulas obtidas a partir de segmentos nodais de <i>S. sclarea</i> em meio ½ MS suplementado com 0,5 mg/L de ZEA, 0,04 mg/L de GA ₃ e 0,02 mg/L de NAA, 35 dias após a inoculação dos explantes.....	45
Figura 1-2:	Plântulas obtidas a partir de segmentos nodais de <i>S. officinalis</i> cv "purpurascens" em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de BA, 30 dias após a inoculação dos explantes....	46
Figura 1-3:	Plântulas obtidas a partir de segmentos nodais de <i>R. officinalis</i> em meio MS suplementado com 0,75 mg/L de ZEA, 28 dias após a inoculação dos explantes.....	47
Figura 1-4:	Plântulas obtidas a partir de explantes de <i>P. graveolens</i> em meio MS suplementado com 0,5 mg/L de BA e 0,1 mg/L de NAA, 45 dias após a inoculação dos explantes.....	47
Figura 1-5:	Cultura de tecidos vegetais: (a) segmento foliar de <i>S. sclarea</i> oxidado em meio MS suplementado com 1,00 mg/L de BA, (b) segmentos nodais de <i>R. officinalis</i> em meio MS suplementado com 0,50 mg/L de BA e (c) segmentos nodais de <i>S. officinalis</i> cv "purpurascens" em meio MS suplementado com 1,00 mg/L de ZEA.....	49
Figura 1-6:	Contaminação em explantes de <i>P. graveolens</i>	51
Figura 2-1:	Sementes de <i>S. sclarea</i> micropropagadas em meio ½ MS sólido, 30 dias depois da inoculação, mantidas na presença (a) e ausência (b) de luz.....	52
Figura 3-1:	Desenvolvimento de rebentos na cultura de raízes de <i>P. graveolens</i> , (a) observação com lupa binocular e (b) observação à vista desarmada.....	55
Figura 3-2:	Rebentos caulinares de <i>P. graveolens</i> em desenvolvimento a partir de meristemas adventícios induzidos em porções de raízes cultivadas em meio MS isento de fito-reguladores.....	55
Figura 4-1:	Plantas micropropagadas de <i>Pelargonium graveolens</i> em processo de aclimatização: (a) 1ª semana, (b) 2ª semana, (c) 3ª semana, (d) 4ª semana.....	56

Figura 5-1:	Explantes contaminados de <i>Pelargonium graveolens</i> submetidos ao protocolo de infecção por <i>A. rhizogenes</i>	57
Figura 5-2:	Explante de <i>Pelargonium graveolens</i> submetido a transformação por <i>A. rhizogenes</i> , com 1 ^{os} . indícios de formação de <i>hairy roots</i>	58
Figura 6-1:	Teores dos constituintes principais obtidos a partir do OE das folhas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> e das flores colhidas em Set/08 e Jul/09 de <i>Salvia sclarea</i>	65
Figura 6.2:	Teores dos constituintes principais obtidos a partir do OE das plantas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>S. officinalis</i> cv "purpurascens....."	69
Figura 6-3:	Teores dos constituintes principais obtidos a partir do OE das plântulas <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> e das flores de <i>Rosmarinus officinalis</i>	72

Índice de Quadros

I- Introdução geral

Quadro 7-1:	Algumas das doenças mentais que são preocupantes na sociedade actual.....	26
--------------------	---	----

Índice de Tabelas

II- Materiais e métodos

Tabela 2-1:	Condições iniciais ensaiadas nas culturas <i>in vitro</i> para todas as espécies estudadas.....	36
Tabela 4-1:	Material vegetal utilizado no estudo dos óleos essenciais.....	39

III- Resultados e Discussão

Tabela 1-1:	Resumo das respostas obtidas no estabelecimento de culturas <i>in vitro</i> de <i>Salvia sclarea</i> , <i>S. officinalis</i> cv "purpurascens", <i>Rosmarinus officinalis</i> , e <i>Pelargonium graveolens</i> , a partir de material vegetativo, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), em função das condições de cultura ensaiadas, 30 dias após o seu início.....	44
Tabela 1-2:	Suplementações hormonais que proporcionaram taxas de micropropagação mais elevadas das quatro espécies alvo deste trabalho, quatro semanas após a inoculação dos explantes.....	48
Tabela 3-1:	Comparação das respostas obtidas a partir de cada tipo de explante de <i>Pelargonium graveolens</i> em meio MS suplementado com 0,50 mg/L de BA e 0,10 mg/L de NAA.....	53
Tabela 6-1:	Composição dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de folhas de plantas <i>in vivo</i> e pântulas <i>in vitro</i> de <i>Salvia sclarea</i>	61
Tabela 6-2:	Composição dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de flores de <i>Salvia sclarea</i> colhidas em Setembro de 2008 e em Julho de 2009.....	63
Tabela 6-3:	Composição dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação da parte aérea de plantas <i>in vivo</i> e plântulas <i>in vitro</i> de <i>S. officinalis</i> cv "purpurascens".....	66
Tabela 6-4:	Composição dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação da parte aérea e das flores de plantas <i>in vivo</i> e da parte aérea das plântulas <i>in vitro</i> de <i>Rosmarinus officinalis</i>	70
Tabela 6-5:	Composição dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de folhas de plantas <i>in vivo</i> e de rebentos caulinares desenvolvidos <i>in vitro</i> de <i>Pelargonim graveolens</i>	73

I- Introdução geral

1- Plantas aromáticas e medicinais

A utilização de extractos vegetais e plantas aromáticas e medicinais para fins terapêuticos datam da pré-história. Os chineses foram os primeiros povos a tirar partido das plantas em medicina tradicional. Até o início da década de 90, século xx, aproximadamente 11000 medicamentos derivados das plantas foram desenvolvidos e usados na China ao longo de milhares de anos (Hamburger e Hostettmann, 1991).

Após séculos de uso empírico de preparações à base de ervas, no início do século XIX, foram isolados os primeiros princípios activos de plantas biologicamente activas. Este foi o começo de uma nova era na investigação e uso de plantas aromáticas e medicinais (PAM) (Hamburger e Hostettmann, 1991).

Das várias actividades biológicas atribuídas a plantas aromáticas e medicinais podem ser citadas acções: i) antibacteriana (Leal *et al*, 2003; Oluwatuyi *et al*, 2004), ii) antioxidante (Lima *et al*, 2005; Al-Sereiti *et al*, 1999), iii) antifúngica (Moreno *et al*, 2006), iv) antiviral (Cowan, 1999), v) anticarcinogénica (Leal *et al*, 2003; Estevéz *et al*, 2005), vi) colérica (Hoeﬂer *et al*, 1987), vii) hepatoprotetora (Lima *et al*, 2007; Hoeﬂer *et al*, 1987), viii) larvicida e/ou repelente (Baricevic e Bartol, 2000), e ix) de estímulo a actividade enzimática (Debersac *et al*, 2001). Muitas vezes, as plantas também são utilizadas para tratar problemas relacionados com o sistema nervoso como ansiedade, insónia, anorexia e outros (Ferreira *et al*, 2006).

Vários medicamentos à base de plantas têm sido adicionados nas farmacopeias internacionais na sequência de estudos no âmbito da etnofarmacologia e da medicina tradicional. Na sequência do aumento do conhecimento obtido pela investigação científica, novas directrizes de padronização, fabrico e controlo de qualidade, são implementadas a cada ano no intuito de melhorar os produtos que chegam ao mercado. Mesmo com as novas tecnologias que estão a revolucionar a descoberta dos novos medicamentos os cientistas e as multinacionais farmacêuticas não menosprezam os conhecimentos tradicionais que muitas vezes são utilizados

para orientar a investigação científica para o estudo de produtos naturais de plantas específicas (Patwardhan, 2009).

Na maior parte dos casos, os princípios activos são moléculas de baixo peso molecular, oriundas do metabolismo secundário das plantas, produzidas como resposta ao stress fisiológico, provocado por factores ambientais abióticos (mudança climática, por exemplo) e bióticos, neste caso, muitas vezes, como protecção contra predadores e agentes patogénicos (Bruno, 2008). Deste modo, a mesma espécie de planta pode apresentar diferentes substâncias em quantidade variável, de acordo com a região, condições climáticas e factores ambientais, em geral, um fenómeno conhecido por polimorfismo químico (Pengelly, 2004).

Alguns trabalhos de investigação recentes têm demonstrado a existência do efeito sinérgico entre metabólitos primários e metabólitos secundários das plantas, de modo que os compostos do metabolismo secundário, encontrados em menor concentração, actuariam como potenciadores dos primários. Este efeito sinérgico ocorre também entre as várias substâncias presentes num extracto vegetal, razão pela qual, alguns produtos derivados de extractos vegetais contêm misturas de diferentes princípios activos de diferentes plantas, para acentuar os efeitos desejados (Bruno, 2008).

Das 250 mil espécies de plantas superiores existentes na Terra mais de 80 mil apresentam características medicinais e, destas, até agora, apenas uma pequena percentagem foi investigada do ponto de vista fitoquímico e, menos ainda, quanto à sua actividade biológica e farmacológica. Embora a medicina tradicional esteja difundida por todo o mundo, sendo parte integrante da cultura de cada povo, infelizmente muito do conhecimento antigo e muitas plantas importantes começam a perder-se num grau preocupante. As florestas tropicais têm sido destruídas a uma velocidade de 50 hectares por minuto e, quem sabe, quantas potenciais drogas farmacêuticas têm sido perdidas desta forma (Joy *et al*, 2001).

Embora, durante muito tempo as plantas aromáticas e medicinais tenham sido preteridas face à aceitação do uso de produtos sintéticos, actualmente, as especulações em torno dos perigos que estes possam oferecer à saúde humana e ao ambiente, têm estado na origem de certa reabilitação da credibilidade dos medicamentos de base natural, designadamente de plantas. Mais de três quartos da

população mundial utiliza plantas ou extractos vegetais em cuidados da saúde. Cerca de 30% das espécies das plantas identificadas foram, em algum momento, utilizadas para fins medicinais (Joy *et al*, 2001). Na Europa ocidental, o uso de medicamentos à base de plantas ainda é encarado com algum cepticismo e muitas vezes associado a fins pouco ortodoxos (Joy *et al*, 2001). Em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, 25% dos medicamentos são à base de plantas, enquanto nos países em rápido desenvolvimento, como a China e a Índia, este número sobe para 80%, facto que pode ser justificado pela maior presença de povos que tradicionalmente preservam as respectivas culturas milenares (Patwardhan, 2009).

O uso de plantas com finalidades terapêuticas é ainda uma oportunidade para a subsistência e o desenvolvimento económico de populações de baixos rendimentos. As aplicações terapêuticas de extractos vegetais justificam a importância do isolamento, identificação e elucidação dos mecanismos de acção das respectivas moléculas activas (Joy *et al*, 2001).

2- Óleos essenciais

Óleos essenciais (OE) são misturas de constituintes voláteis à temperatura ambiente, originados, na maioria das vezes, do metabolismo secundário, sendo produzidos e armazenados em estruturas secretoras próprias formadas nas folhas, flores, ramos/caules ou raízes de diversas espécies (Kamatou *et al*, 2007). Em diversas famílias de plantas, designadamente, Lamiaceae e Verbenaceae, os OE são geralmente, secretados por tricomas glandulares, que possuem várias formas, estruturas e funções distribuindo-se maioritariamente na superfície das folhas (Kamatou *et al*, 2007). Sendo estruturas celulares especializadas, os tricomas, como órgãos de síntese e armazenamento de OE, protegem a planta da toxicidade própria de alguns dos respectivos constituintes, como é o caso dos monoterpenos que, em concentrações elevadas, são fitotóxicos. Os tricomas das Lamiaceae são de dois tipos morfológicamente distintos: peltados e capitados, que se distinguem pela sua estrutura e forma de secreção, facto comprovado por observações de microscopia óptica e electrónica (Hallahan, 2000).

Os OE possuem características lipófilas, solúveis em gorduras e álcoois, podendo, nalguns casos, ser facilmente oxidados por exposição à luz (Pengelly, 2004), são normalmente extraídos de plantas por processos específicos, sendo dotados de aroma forte quase sempre agradável (Santos, 2000; Craveiro *et al*, 1981). São utilizados em muitas indústrias para conferir aromas especiais a alguns dos seus produtos, constituindo nalguns casos também, matéria prima para a síntese de substâncias diversas, comercializadas pelas indústrias química e farmacêutica (Craveiro *et al*, 1981). Actualmente, o termo “óleo essencial” designa a fracção volátil extraída das plantas por arrastamento de vapor, constituída maioritariamente por monoterpenos e sesquiterpenos (Pereira, 1996).

Os OE foram considerados durante muito tempo como “desperdício fisiológico” ou produtos de desintoxicação, tal como se dizia, aliás, dos produtos do metabolismo secundário, em geral. Entretanto, com os avanços científicos, são atribuídas aos OE funções ecológicas, tais como, a inibição da germinação de sementes (alelopatia), protecção contra predadores e atracção de polinizadores (Santos, 2000; Barreiro, 2006).

Diversas actividades biológicas dos OE são reconhecidas, designadamente, actividade antimicrobiana, ao mesmo tempo em que se vem confirmando a sua baixa toxicidade em mamíferos e seu baixo impacto ambiental negativo. Por consequência, os OE vêm sendo cada vez mais utilizados em cuidados de saúde, nomeadamente em situações de resistência de microorganismos patogénicos a antibióticos de síntese química e na inibição do crescimento de microorganismos de contaminação alimentar e respectivas toxinas. As aplicações dos OE incluem processamento e preservação de alimentos, produtos farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais (Hayouni *et al*, 2008).

O teor médio de OE por planta é variável e frequentemente baixo (<1%). No entanto, alguns OE apresentam potente actividade biológica, na maior parte das vezes devida, não a um componente apenas, mas sim à acção combinada dos seus diversos constituintes. Em regra, a sua composição é muito complexa, sendo frequentemente a presença de mais de cinquenta constituintes, geralmente identificados, por técnicas cromatográficas e espectrais, como compostos terpénicos e/ou fenilpropanóides. A identificação dos constituintes dos óleos essenciais é

importante para a compreensão e previsão dos respectivos efeitos fisiológicos. Por exemplo, os OE ricos em hidrocarbonetos sesquiterpénicos exibem, frequentemente, efeito anti-inflamatório (Tappin *et al*, 2004) e, OE ricos em trans-cariofileno podem auxiliar na lipo-regulação (Yoo *et al*, 2005). Os constituintes terpénicos podem ser hidrocarbonetos (moléculas constituídas por átomos de carbono e átomos de hidrogénio, apenas) ou podem ser moléculas ternárias contendo átomos de oxigénio, para além de átomos de carbono e átomos de hidrogénio fazendo parte de grupos funcionais diversos, designadamente, álcoois, aldeídos, aldeídos cíclicos, cetonas, fenóis, éteres, éteres fenólicos, óxidos ou ésteres (Pengelly, 2004).

2.1- Biossíntese de compostos terpénicos

Os terpenos e os seus derivados são moléculas, em regra constituídas por unidades contendo cinco átomos de carbono derivadas do isopreno (Figura 2-1) representando o maior e mais amplamente distribuído grupo de metabolitos secundários, dos quais, mais de 4.000 foram já identificados. De acordo com a regra do isopreno, os terpenos podem ser considerados usualmente como produtos resultantes da ligação de várias unidades de isopreno (Fontes e Alçada, 2008).

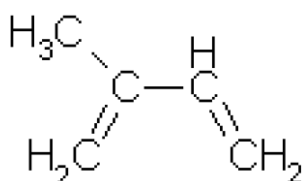


Figura 2-1: Molécula de Isopreno

Os terpenos mais simples são os hemi-terpenos, formados por apenas uma unidade de isopreno. Os monoterpenos são constituídos por 2 unidades de isopreno (C10), os sesquiterpenos por 3 (C15), os diterpenos, por 4 (C20), triterpenos, e tetraterpenos por 6 (C30) e 8 (C40) e os politerpenos ou poli-isoprenos por números mais elevados (Buchanan *et al*, 2000).

Os terpenóides podem sofrer transformações nas respectivas cadeias isoprénicas, resultando na formação de estruturas acíclicas ou cíclicas. As transformações podem advir de um grande número de reacções, tais como reduções, oxidações, ciclizações, rupturas de anel ou rearranjos, o que lhes permite formar uma grande diversidade estrutural de metabolitos, estrutural e biogenicamente relacionados (Buchanan *et al*, 2000).

Os óleos essenciais das Lamiaceae têm como principais grupos de constituintes os monoterpenóides (hidrocarbonetos monoterpénicos e monoterpenos oxigenados) e, em menor expressão os sesquiterpenóides (hidrocarbonetos sesquiterpénicos e sesquiterpenos oxigenados) (Hallahan, 2000). A única via biossintética isoprenóide, referida em publicações mais antigas era a via do acetato-mevalonato. Esta designação deve-se ao facto do mevalonato ser um intermediário na via, resultando da condensação de três moléculas de acetil-CoA (acetil-coenzima A), originando HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A), sendo depois convertido por uma reductase, em mevalonato, numa reacção irreversível. Segue-se a fosforilação e descarboxilação sequencial do mevalonato para gerar IPP (isopentenil difosfato), o monómero estrutural de todas as classes de terpenóides. O IPP condensa-se com uma molécula de DMAPP (dimetilalil difosfato) originando GPP (geranil difosfato), molécula precursora dos monoterpenóides. Por adição de uma segunda molécula de IPP ao GPP forma-se FPP (farnesil difosfato), molécula precursora dos sesquiterpenóides. A adição de uma terceira molécula de IPP ao FPP forma GGPP (geranilgeranil difosfato), molécula precursora dos diterpenóides, e assim sucessivamente. Algumas das moléculas formadas sofrem depois ciclização, através de sintetases, dando origem a diferentes classes de terpenóides (Chappell, 1995; Douglas e Croteau, 1995). Ulteriormente foi descoberta uma nova via biossintética dos terpenos, em bactérias e plantas, independente da via do mevalonato, que também origina IPP e DMAPP. Nesta via, o D-gliceraldeído-3-fosfato e o piruvato são convertidos em 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) num reacção de descarboxilação, intermediário este que dá o nome a essa via biossintética (via do DXP). Nesta via, a formação do IPP e DMAPP ocorrem após uma série de reacções de descarboxilação, rearranjos e outras reacções descritas na literatura (Buchanan *et al*, 2000).

Sabe-se agora, que em plantas superiores, os esteróis, ubiquinonas e os sequiterpenos são formados, predominantemente, pela via do mevalonato. Esta via ocorre no citoplasma e nas mitocôndrias. Já os terpenóides sintetizados nos plastídios, os hemiterpenos, os monoterpenos, os diterpenos e carotenóides, são formados essencialmente pela via DXP (Buchanan *et al*, 2000; Hallahan, 2000). A separação compartimental das duas vias biossintéticas não é absoluta, pois pode haver troca de intermediários entre os compartimentos celulares (Adam e Zaap, 1998; Buchanan *et al*, 2000).

3- Família Lamiaceae

A família Lamiaceae pertence à subclasse Asteridae e à ordem Lamiales (Cronquist, 1981), possui aproximadamente 7500 espécies e 300 gêneros, 48 dos quais possuem valor medicinal comprovado (Joy *et al*, 2001). Esta família está representada por diferentes espécies distribuídas por vários habitats e altitudes: de regiões do Ártico para o Himalaia, do sudeste da Ásia para o Havai, Austrália, África e nova Zelândia de norte a sul. É uma família típica de savana, que pode ser encontrada em áreas quentes de todo o mundo (Almeida e Albuquerque, 2002). Muitas das suas espécies são cultivadas em hortas e jardins, designadamente espécies dos gêneros *Ocimum* (alfavaca), *Lavandula* (alfazema), *Mentha* (hortelã-pimenta), *Origanum* (orégão), *Majorana* (manjerona), *Rosmarinus* (alecrim) e *Salvia* (salva). Todos compartilham uma importante característica desta família que é a presença de odor intenso conferido pela presença de óleos essenciais (Barreiro, 2006).

Em geral, as plantas desta família são herbáceas ou arbustivas, com folhas opostas e inteiras. As flores são pequenas ou grandes, reunidas em inflorescências, quase sempre axilares (Souza e Lorenzi, 2005). De acordo com Metcalfe e Chalk (1979) as espécies desta família são caracterizadas pela presença de numerosos tricomas glandulares e não glandulares, cobrindo a maior parte dos órgãos aéreos. Tricomas glandulares são definidos como apêndices epidérmicos que ocorrem em vários órgãos vegetais e são responsáveis pela síntese e armazenamento dos compostos terpênicos. A quantidade de óleo recuperada de uma folha está

correlacionada com o número de glândulas peltadas que possui dado que todo o óleo volátil está contido nos tricomas (Barreiro, 2006).

As espécies pertencentes a esta família são, também, conhecidas pelas suas propriedades antioxidantes, em especial espécies dos géneros, *Salvia* e *Rosmarinus* (Cuvelier *et al*, 1994).

3.1- *Salvia* sp.

O nome do género *Salvia* é derivado do latim “salvere”, que salva, em referência as propriedades curativas da planta, já utilizada, com fins medicinais, desde tempos remotos, pelos gregos, romanos e egípcios (Vienna *et al*, 2005)

Pertencente a família Lamiaceae, o género *Salvia* compreende cerca de 900 espécies ocorrentes em todo o mundo (Kamatou *et al*, 2007). As plantas deste género são maioritariamente de porte pequeno, com caule curto e lenhoso, com flores dispostas em inflorescências de coloração azul a violeta (Dweck, 2000).

A maioria das espécies de *Salvia* é utilizada em medicina tradicional para o tratamento de várias perturbações da saúde, designadamente, garganta inflamada, febre, desordens digestivas, desordens nervosas, tendo também aplicações em controlo ambiental, nomeadamente, como repelentes de insectos. Diversos tipos de propriedades farmacológicas têm sido referidas a espécies de *Salvia* incluindo, actividade anti-oxidante (Avato *et al*, 2005; Cuvelier *et al*, 1994), actividade anti-inflamatória, actividade antimicrobiana e actividade anti-plasmodial (Kamatou *et al*, 2007). Para alguns autores, os OE de *Salvia* possuem actividades antimicrobiana e anti-inflamatória associadas à elevada percentagem de sesquiterpenos presentes (Kamatou *et al*, 2007; Hayouni *et al*, 2008).

Espécies de *Salvia* são consideradas aromáticas, ricas em OE susceptíveis de ser utilizados em produtos alimentares, cosméticos, de perfumaria e farmacêuticos. A utilização de produtos de *Salvia* sp. em medicina tradicional, designadamente por inalação de OE, exige investigação científica detalhada da sua composição e dos efeitos dos seus componentes voláteis na saúde (Kamatou *et al*, 2007).

Diversas espécies deste género possuem valor e potencial económico consideráveis, pela utilização dada aos seus OE, como aromatizantes, assim como em perfumaria e cosmética (Hayouni *et al*, 2008).

3.1.1- *Salvia sclarea* L.

Salvia sclarea L. (Figura 3-1) é uma espécie menos cosmopolita que *Salvia officinalis* ocorrendo naturalmente, como endémica nalgumas regiões do Globo, designadamente, no norte da África e Irão (Dweck, 2000). A composição do seu óleo essencial difere do de outras espécies do mesmo género no que diz respeito à variedade dos seus componentes e a sua quantidade relativa. Os OE de *S. sclarea* podem conter, principalmente, álcoois monoterpénicos como linalool, geraniol, acetato de linalilo e acetato de geranilo, embora também possa conter α - e β -pineno, cânfora, felandreno e cineole como principais constituintes (Vienna *et al*, 2005).



Figura 3-1: *Salvia sclarea* L.

3.1.2- *Salvia officinalis* L.

Salvia officinalis L. é uma das espécies mais comuns e representativas dentro do género, muito difundida na Bacia do Mediterrâneo, Sudoeste da África e América Central e do Sul, onde é largamente cultivada para culinária e medicina popular (Avato *et al*, 2005). As plantas desta espécie que possuem como característica

morfológica folhas com coloração púrpura são incluídas numa variedade denominada *Salvia officinalis* cv "purpurascens" (Figura 3-2).

As propriedades curativas da salva são bem conhecidas havendo relatos de seu uso como tónico, estimulante, carminativo e anti-séptico. A investigação fitoquímica que tem sido realizada com *Salvia officinalis* tem conduzido ao esclarecimento de duas grandes classes de metabolitos secundários: terpenóides e compostos fenólicos (Avato *et al*, 2005). O elevado teor de OE que caracteriza esta espécie, quando comparada com outras espécies, é devido à actividade secretora de diferentes tipos de tricomas glandulares, presentes em elevada densidade nas folhas da planta. A aplicação de métodos biotecnológicos para a propagação desta espécie, como forma de produção de metabolitos de elevado valor é ainda limitada, para isso contribuindo o escasso conhecimento disponível, designadamente quanto à produção *in vitro* de compostos antioxidantes activos (Avato *et al*, 2005).



Figura 3-2: *Salvia officinalis* cv "purpurascens"

Só recentemente se têm realizado análises sistemáticas dos constituintes de extractos desta espécie, bem como de outras denominadas também, de forma comum como salva, a acompanhar o aumento crescente do uso de produtos etnobotânicos obtidos das mesmas, para o tratamento de diversas doenças (Makunga e van Staden, 2008).

3.1.3- Actividade biológica

Diversas actividades biológicas e farmacológicas de produtos de *Salvia* sp. têm sido objecto de investigação, desencadeada pelas utilizações etnobotânicas de que espécies deste género têm sido alvo.

Os OE de salva são empregues em aromatizantes condimentares, carnes, licores e outros (Baricevic e Bartol, 2000). Além do uso como agente aromatizante o OE de salva também exhibe actividade antioxidante (Cuvelier *et al*, 1994), fungicida, bactericida (Baricevic e Bartol, 2000), anti-mutagénica e repelente de insectos (Baricevic e Bartol, 2000; Vujosevic e Blagojevic, 2004). A actividade anti-mutagénica foi atribuída a extractos aquosos (Pavela, 2004) e a actividade insecticida a extractos metanólicos (Samejima *et al*, 1995).

Tanto os extractos de folhas de *Salvia officinalis*, obtidos com n-hexano, como os extractos obtidos com clorofórmio mostraram notável actividade anti-inflamatória associada aos respectivos teores de ácido ursólico (Baricevic e Bartol, 2000; Baricevic *et al*, 2001). Compostos fenólicos de salva podem estar associados à actividade immuno-moduladora e anti-leshimanirose (Radtke *et al*, 2003). Os extractos obtidos através de solventes polares manifestaram efeito hipoglicemiante em ratos (Alarcon-Aguilar *et al*, 2002; Ninomiya *et al*, 2004), bem como actividades espasmolítica e hipotensiva em outros modelos animais (Todorov *et al*, 1984).

Estudos clínicos em pacientes humanos mostraram que salva possui actividade antiviral contra herpes (Saller *et al*, 2001) sendo também benéfica em situações de sintomas da menopausa (de Leo *et al*, 1998) e de faringite aguda (Hubbert *et al*, 2006).

As propriedades antioxidantes de salva são amplamente relatadas em estudos *in vitro*. Extractos alcoólicos de salva revelaram forte actividade antioxidante, aumentando a estabilidade dos produtos alimentares, o que permite perspectivar a sua aplicação na indústria alimentar (Miura *et al*, 2002). Com o crescente interesse pela aplicação de compostos de plantas na saúde humana, designadamente antioxidantes, têm sido publicados nos últimos 15 anos diversos artigos relativos à actividade antioxidante e farmacológica da salva. A actividade antioxidante de extractos de salva foi demonstrada, também, por aplicação de técnicas de ESR (Eletron Spin Resonance) (Masaki *et al*, 1995) e pela inibição da peroxidação

lipídica dos lipossomas, em ensaios de peroxidação lipídica enzimo-dependentes e enzimo-independentes (Masaki *et al*, 1995; Zupko *et al*, 2001).

Deversas referências antigas em livros da União Europeia sobre a actividade de *Salvia officinalis* no melhoramento da memória, têm levado alguns investigadores a realizar estudos com vista à avaliação da capacidade de extractos de salva na atenuação do declínio cognitivo, frequente em quadros de demência. A actividade anti-colinesterase de salva no tecido cerebral humano (post mortem), tem sido referida em diversos artigos, o que poderá explicar, pelo menos em parte, o efeito no melhoramento dos estados de memória (Perry *et al*, 2000). Por outro lado, alguns estudos de actividade biológica com extractos de espécies da família Lamiaceae, designadamente, *Salvia officinalis* e *Melissa officinalis* têm confirmado os respectivos efeitos na modulação do humor e do desempenho cognitivo (Akhondzadeh *et al*, 2003; Kennedy *et al*, 2006). Estudos randomizados, de tipo, duplo-cego e placebo-controlado, em que foram utilizados doentes com sintomas ligeiros a moderados da doença de *Alzheimer* permitiram a demonstração da acção benéfica de extractos de salva na melhoria das funções cognitivas (Akhondzadeh *et al*, 2003) bem como do humor e desempenho cognitivo dos pacientes (Kennedy *et al*, 2006). Num desenho experimental com ratos, foi demonstrado que o extracto etanólico de salva pode potenciar a memória de retenção ao interagir com os receptores colinérgicos, nicotínicos e muscarínicos, envolvidos no processo de retenção de memória (Eidi *et al*, 2006), o que vem reforçar a convicção de que *S. officinalis* pode ter aplicações no tratamento da doença de *Alzheimer* e de outras doenças neurodegenerativas, do stresse e da ansiedade. Esta convicção é reforçada pelos efeitos neuroprotetores contra a toxicidade de β - e (A β)-amilóide em células PC12, demonstrados pelo extracto hidro-alcólico de salva (Iuvone *et al*, 2006).

3.2- *Rosmarinus* sp.

O nome comum deste género é derivado do latim “*rós marinus*” que significa “orvalho do mar”, já que esta planta cresce amplamente nas proximidades da costa do mar Mediterrâneo. Durante muito tempo foi considerada uma planta símbolo da amizade e da fidelidade. De nome comum alecrim, já em tempos antigos, era uma

planta associada ao fortalecimento da memória e por isso era o emblema da fidelidade dos amantes (Grieve, 1996). Há muito cultivada em canteiros familiares é bem conhecida no uso culinário e pelas propriedades medicinais, atribuída em muitas publicações, aos respectivos óleos essenciais (Zaouali *et al*, 2005).

3.2.1- *Rosmarinus officinalis* L.

Rosmarinus officinalis L. (Figura 3-3), pertencente a família Lamiaceae, é uma planta esclerófita de folha persistente e bem adaptada a limitações do clima Mediterrâneo (Papageorgiou *et al*, 2008), as flores crescem em inflorescências nas axilas das folhas presentes na parte superior do ramo (Vienna *et al*, 2005). Explorada desde há tempos pela qualidade do seu OE é utilizada em medicina tradicional bem como na indústria farmacêutica, alimentar e cosmética, como matéria prima (Zaouali *et al*, 2005).

O OE do alecrim é obtido através da destilação da porção aérea da planta, incluindo caules, folhas e flores. A maioria dos óleos comerciais é extraída de caules e folhas da planta antes da floração (Vienna *et al*, 2005).



Figura 3-3: *Rosmarinus officinalis* L.

3.2.2- Actividade biológica

As propriedades terapêuticas de *Rosmarinus officinalis* são conhecidas desde há muito tempo, sendo uma espécie tradicionalmente utilizada como agente colérico e diurético (Hoeffler *et al*, 1987), anti-espasmódico, anti-séptico, anti-depressivo, anti-reumático, carminativo, digestivo e hipertensivo (Kabouche *et al*, 2005).

A composição química e a actividade antioxidante do óleo de alecrim têm sido referidas em diversas publicações. Embora haja diferenças dos perfis químicos

dos OE, o 1,8-cineole parece estar presente, em quantidade significativa, em diferentes populações de *R. officinalis* (Gachkar *et al*, 2007; Pintore *et al*, 2002). A caracterização do OE de plantas de *R. officinalis* desenvolvidas na Argentina, Portugal e Espanha revelou também teores significativos de verbenona, borneol ou mirceno (Lorenzo *et al*, 1999; Lawrence, 1997). De acordo com alguns autores, porém, os constituintes dos OE de *R. officinalis* não são os principais responsáveis pela sua notável actividade antioxidante (Celiktas *et al*, 2007, Gachkar *et al*, 2007). A actividade antioxidante de *R. officinalis* tem sido atribuída principalmente à presença de ácidos fenólicos, designadamente, ácido rosmarínico (Lamaison *et al*, 1990), de fenóis diterpénicos, designadamente, ácido carnosico, carnosol, rosmanol e epirosmanol (Haraguchi *et al*, 1995), de carotenóides e de α -tocoferol (Munné-Bosch *et al*, 1999). A correlação entre as actividades antioxidantes e o teor fenólico total dos extractos de alecrim foi constatada em ensaios de varrimento dos radicais livres (Moreno *et al*, 2006). Carnosol, rosmanol, e epirosmanol possuem actividade inibitória da peroxidação lipídica, sendo que o mecanismo antioxidante está relacionado com o sequestro de radicais livres em lipídios (Zeng *et al*, 2001). Segundo alguns autores, o rosmanol, presente no alecrim, possui propriedades antioxidantes mais eficazes que o BHT e o α -tocoferol (Leal *et al*, 2003).

O efeito hepatoprotector de extractos de alecrim, tem sido também demonstrado, designadamente, contra uma variedade de agentes hepatotóxicos, incluindo tetracloreto de carbono (CCl₄) (Fahim *et al*, 1999), tert-Butilhidroperóxido (t-BHP) (Joyeux *et al*, 1990), ciclofosfamida (Fahim *et al*, 1999) e azatioprina (Soletto *et al*, 2002).

Extractos etanólicos de *R. officinalis* obtidos a partir de rebentos jovens mostraram acentuada actividade colerética, mais activa que extractos da planta inteira (Hoeffler *et al*, 1987).

Embora o OE de populações de *R. officinalis* da região mediterrânea pareça estar bem estudado quanto a sua composição e actividade, têm sido referidas divergências de região para região, devido as diversidades ambientais (Vienna *et al*, 2005).

A actividade biológica de alguns componentes individuais do OE de alecrim, já tem sido especulada. Por exemplo, ao canfeno tem sido atribuída actividade anti-

microbiana, contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, ao α -pineno tem sido atribuída a actividade de inibição do crescimento de *Erwinia amylovora* e ao β -pineno actividade inibitória do crescimento de populações de diversas estirpes de bactérias (Scortichini e Rossi, 1991).

Extractos de alecrim aumentam a produção de NGF (“Nerve Growth Factor”) um factor vital para o desenvolvimento e manutenção funcional do tecido nervoso em células humanas do glioblastoma T98G, efeito esse que parece derivar da presença de ácido carnósico e o carnosol (Kosaka e Yokoi, 2003).

4- Família Geraniaceae

O nome desta família deriva do formato do estilete da flor, que lembra um bico longo de um pássaro. A família Geraniaceae distribui-se por 11 géneros e 700 espécies, maioritariamente de hábito herbáceo ou arbustivo, com fruto esquizocárpico apresentando um bico persistente. Os membros desta família distribuem-se, principalmente por regiões temperadas e tropicais. Os géneros *Geranium*, *Pelargonium* e *Erodium*, desta família, fazem parte da tribo Geraniae. A importância económica desta família inclui o cultivo de espécies para uso ornamental, designadamente dos géneros *Geranium* e *Pelargonium*, para forragem, designadamente do género *Alfilaria*, nos Estados Unidos, e produção de óleos essenciais, *Pelargonium* sp. (Simpson, 2006).

4.1- *Pelargonium* sp.

Espécies pertencentes ao género *Pelargonium* são, na maioria, originárias da África do Sul, onde as plantas são utilizadas para combater várias doenças provocadas por bactérias e fungos. A actividade antimicrobiana de extractos lipófilos de *Pelargonium* sp. tem sido referida, como importante, assim como a actividade anti-oxidante considerada de grande utilidade na indústria alimentar e na indústria dos cosméticos (Lis-Balchin e Deans, 1996).

Algumas espécies deste género são aromáticas, designadamente, *P. capitatum*, *P. graveolens* e *P. radens* sendo cultivadas para produção de óleos essenciais. O óleo essencial de *Pelargonium* sp. constitui um dos maiores

constituintes de aromas florais, usados em perfumes de elevada qualidade, designadamente nos perfumes masculinos Kouros da Yves Saint Laurent (1981), Polo Blue da Ralph Lauren (2003) e perfumes femininos Aromatics Elixir da Clinique (1975), Dioressence da Dior (1979), Paris da Yves Saint Laurent (1983), Paul Smith Women da Paul Smith (2000) (Demarne, 2002).

As principais regiões produtoras de espécies de *Pelargonium* com finalidade comercial são “Reunion Island”, Madagáscar, Egipto e China que as exportam para grandes consumidores de França e Estados Unidos (Demarne, 2002). Apesar de não ser uma planta nativa de Portugal é produzida em pequena escala no sul do país por causa de sua essência e qualidade do óleo que é exportado para a Inglaterra (Gomes *et al*, 2007). Pela beleza de suas flores, é também cultivada por todo o mundo, como planta ornamental (Bi *et al*, 1999).

4.1.1- *Pelargonium graveolens* L.´Hérit.

Conhecida popularmente como sardinheira é comercialmente produzida para as indústrias de perfumaria e cosmética por ser das espécies mais perfumadas neste género.

Pelargonium graveolens L.´Hérit. (Figura 4-1) é um arbusto erecto muito ramificado que pode atingir altura de 1,3 m. O caule é herbáceo e coberto por pêlos quando a planta é jovem, tornando-se lenhoso com o passar do tempo. Possui folhas fortemente recortadas e com textura aveludada devido a presença dos pêlos glandulares, sendo uma espécie de odor marcado pela presença de citronelol e geraniol. É muito utilizada em homeopatia chinesa para promover a expulsão de toxinas que inibem o equilíbrio do organismo (Peterson *et al*, 2006).



Figura 4-1: *Pelargonium graveolens* L. 'Hérit.

4.1.2- Actividade biológica

Espécies de *Pelargonium* são utilizadas em medicina popular para tratamento de feridas, febre, cólica e tratamentos anti-helmínticos (Lis-Balchin e Deans, 1996). Extractos metanólicos de espécies de *Pelargonium* possuem actividade antibacteriana e anti-oxidante (Lis-Balchin e Deans, 1996). O óleo de *P. graveolens* manifestou actividade anti-fúngica contra seis espécies de *Trichophyton* (Shin e Lim, 2004). Em aromaterapia os óleos essenciais de *Pelargonium* sp. são utilizados em situações anormais de menopausa, tensão nervosa e ansiedade (Rao, 2002).

O interesse académico pelas propriedades fitoterapêuticas de *Pelargonium*, ainda pouco conhecidas ou inexploradas, segue com o interesse popular e agro-industrial existente em torno de diversas espécies deste género (Lalli *et al*, 2008).

5- Culturas *in vitro* de tecidos e órgãos vegetais

As primeiras culturas *in vitro* de tecidos e órgãos vegetais bem sucedidas foram estabelecidas nos anos 30. Seguiu-se um período de aperfeiçoamento dos métodos e dos meios de cultura. Muitos detalhes foram intensivamente revistos, entre outros, por Street (1977) (Mulder-Krieger *et al.*, 1988). Desde então, gerou-se entre a comunidade científica grande expectativa em torno das potencialidades desta tecnologia considerando as vantagens que a mesma apresentava, designadamente: (a) independência de factores ambientais, como sejam o clima, factores geográficos e

sazonais; (b) capacidade de se ajustar a produção às necessidades do mercado; (c) necessidades de espaço reduzidas, libertando os terrenos para outros fins; (d) multiplicação mais rápida; (e) possibilidade de regeneração e de multiplicação em que as técnicas tradicionais se mostram insuficientes; (f) possibilidade de perpetuar genótipos de eleição; (g) possibilidade de regeneração e multiplicação de plantas que apresentem novas características; (h) possibilidade de constituir um sistema de fácil experimentação e manuseamento, sendo possível controlá-lo do ponto de vista nutricional (meio de cultura, reguladores de crescimento, pH, entre outros) e ambiental (luz, agitação, entre outros); (i) relativa independência da interferência política; (j) maior facilidade de recolha e processamento do produto; (k) possibilidade de obter, em alguns casos, um elevado rendimento de produção, um aumento de qualidade e alargar as perspectivas de obtenção de novos derivados (George, 1993).

A cultura *in vitro* generalizou-se a um grande número de espécies a partir do momento em que, teoricamente, se considerou que todas as culturas são totipotentes, isto é, têm a capacidade de regenerar as plantas completas. Na prática, porém, têm-se constatado com vários problemas de natureza técnica, como, por exemplo: dificuldades de disponibilidade e selecção de inóculos primários morfológicamente competentes, dificuldades de descontaminação do material, necrose por fenolização, hiperhidricidade, crescimento anormal dos órgãos, dificuldades de definição da composição do meio de cultura mais adequado, dificuldades de enraizamento e de aclimação e dificuldades na manutenção da estabilidade genética (George, 1993). Mesmo assim, com todas as suas limitações, as culturas *in vitro* de espécies vegetais, têm vindo a ser exploradas em áreas como a micropropagação, produção de metabolitos secundários e melhoramento do conhecimento das vias biossintéticas envolvidas quer no metabolismo primário, quer no metabolismo secundário.

5.1- Tipologias de cultura *in vitro* de sistemas vegetais: Micropropagação

As culturas *in vitro* de sistemas vegetais podem desenvolver-se de forma organizada, envolvendo formação e/ou manutenção de estruturas definidas, como por exemplo a formação de plântulas ou a manutenção de raízes isoladas em cultura, ou podem crescer de forma, pelo menos aparentemente, desorganizada, neste caso dando origem a uma massa celular denominada *callus*.

A formação de tecidos não-organizados, apesar de ser raro na natureza, é muito frequente em cultura *in vitro*. Tipicamente, estes tecidos consistem numa massa amorfa de células parenquimatosas e possuem um número limitado de tipos celulares especializados ou diferenciados. Os tecidos ou células indiferenciados podem ser propagados em meio de cultura por períodos muito longos. Os tecidos não-organizados induzidos *in vitro* em meio sólido - cultura de *callus* - podem dar origem a culturas de células em meio líquido - culturas de células em suspensão (Cunha, 2001).

A intensa investigação científica na área das culturas *in vitro* de plantas ampliou os métodos pelos quais as plantas podem ser propagadas vegetativamente. O propósito da micropropagação é produzir, em grande quantidade, plântulas idênticas geneticamente, fisiologicamente uniformes, com desenvolvimento normal e isentas de agentes patogénicos, que possam ser aclimatizadas num reduzido período de tempo e a baixos custos (Kitto, 1997; Kozai *et al.*, 1997). O estabelecimento da micropropagação comercial com vista à aplicação industrial só se tornou uma realidade a partir dos anos 70 (Kitto, 1997). Contudo, o uso comercial da micropropagação é ainda limitado devido aos custos relativamente elevados da sua produção, uma vez que requer muita mão-de-obra. Além disso a taxa de crescimento *in vitro* é por vezes lenta, por vezes havendo reduzida taxa de sobrevivência entre as plântulas aclimatizadas (Kozai *et al.*, 1997).

5.2- Utilização de culturas *in vitro* para produção de metabolitos secundários

A evidência de que as culturas *in vitro* de plantas eram capazes de produzir metabolitos secundários é relativamente recente na história das técnicas *in vitro*.

Considerou-se durante muito tempo que células indiferenciadas, como culturas de *calli* e de células em suspensão, não eram capazes de produzir compostos secundários, tal como as células diferenciadas ou órgãos especializados. Alguns autores, porém, demonstraram experimentalmente que esta teoria estava errada, pois observaram que algumas culturas de células não diferenciadas produziam metabolitos secundários, como é o caso de culturas de células em suspensão *Morinda citrifolia* que produzem antraquinonas com rendimento de 2,5g/l de meio de cultura (Bourgaud *et al.*, 2001). Esta constatação abriu as portas a uma ampla comunidade de técnicos em culturas *in vitro* os quais passaram a estudar intensivamente a possibilidade de utilizar culturas vegetais para a produção de compostos secundários de interesse industrial, designadamente, produtos de interesse farmacológico e corantes. As tentativas de demonstração da aplicabilidade à escala industrial, de tais processos de produção começaram quase que em simultâneo com a obtenção de conhecimento básico quer em termos de culturas *in vitro* vegetais, quer de compostos de metabolismo secundário. Porém, a produção à escala industrial, de metabolitos de elevado interesse económico, por esta via, têm-se revelado problemática, principalmente pelos seguintes motivos: (a) ausência de estruturas especializadas para a produção e acumulação destes compostos nas culturas de células *in vitro* (Mulder-Krieger *et al.*, 1988); (b) nas cultura *in vitro* há a tendência para as células acumularem os produtos, em vez de os excretarem para o meio de cultura (Barz e Ellis, 1981); (c) acumulação de compostos que são tóxicos para as células sob a forma glicolisada, não sendo detectados (Mulder-Krieger *et al.*, 1988); (d) regulação distinta das vias biossintéticas *in vivo* e *in vitro* (Charlwood *et al.*, 1988).

O conhecimento teórico que se tem conseguido é ainda insuficiente, em grande parte dos casos, para se ultrapassar os constrangimentos associados à expressão das vias do metabolismo secundário em culturas de células e tecidos. Consequentemente é necessário que haja investigação básica intensiva no que diz respeito à regulação do metabolismo primário e secundário de culturas *in vitro* de células vegetais.

Diversos processos têm sido utilizados para promover ou influenciar a expressão da produção e/ou acumulação dos metabolitos secundários em sistemas *in vitro*, designadamente: (a) indução de diferenciação morfológica em culturas de

tecidos; (b) criação de locais de acumulação artificiais para compostos voláteis; (c) alteração da composição dos meios de cultura; (d) variação das condições físicas às quais as culturas estão sujeitas, designadamente luz, temperatura e meio gasoso; (e) imobilização das células em suspensão; (f) elicitação; (g) cultura em sistema de duas fases; (h) bioconversão, utilizando precursores de baixo custo; (i) *hairy roots*.

No início da década de 90 surgiu uma nova disciplina designada Engenharia Metabólica, a qual se pode definir como sendo um aperfeiçoamento das actividades celulares, através da manipulação das funções enzimática, de transporte e reguladora das células, utilizando a tecnologia de DNA recombinante (Bourgau *et al.*, 2001). O aperfeiçoamento da produção industrial de metabolitos secundários de origem vegetal provavelmente terá que passar pela combinação das tecnologias de culturas de células, tecidos e órgãos vegetais com a engenharia metabólica (Bourgau *et al.*, 2001). No caso dos óleos essenciais, dada a sua produção e acumulação em estruturas secretoras especializadas, na maior parte das vezes externas, como é o caso das espécies da família Lamiaceae, só faz sentido encarar a produção de óleos essenciais em sistemas *in vitro* se os mesmos permitirem a diferenciação de tricomas secretores o que, invariavelmente ocorre em plantas ou em rebentos caulinares com um grau de diferenciação adequado.

6- Transformação genética de plantas: aplicação da tecnologia do DNA recombinante à produção de *hairy roots*

Ao longo da História têm sido criadas formas de melhorar as plantas de interesse com o desenvolvimento de novas combinações genéticas. A essência da modificação genética está em manipular directamente os componentes do genoma pelo emprego de técnicas de melhoramento que incluem: i) introdução de resistência a doenças, pragas, herbicidas e stresse ambiental, ii) aumento da produtividade, iii) optimização dos atributos específicos de qualidade, como conservação durante o armazenamento, sabor, cor e conteúdo nutritivo, e iv) produção de vacinas e outros medicamentos (Conner *et al.*, 2003).

Em geral, os metabolitos secundários de interesse económico são quase sempre produzidos em quantidades insuficientes pelas plantas face às necessidades.

Segundo alguns autores, a produção de tais metabolitos poderá ser manipulada, por interferência nos genes responsáveis pela sua regulação metabólica, ou por cultura celular programada (Sato, 1999).

Das técnicas que têm sido empregues na transformação genética, destacam-se as que utilizam *Agrobacterium* sp. como vector de transferência de DNA contendo sequências de nucleótidos de genes específicos, vector este muito estudado e cuja utilização não requer equipamentos muito específicos, além de apresentarem custo reduzido. Diversas estirpes de *Agrobacterium* sp. são capazes de transferir parte do seu plasmídeo para o genoma das células da planta hospedeira, onde é integrado de forma estável. A parte transferida do plasmídeo é chamada de T-DNA (do inglês “Transferred DNA”). A transferência e a integração do T-DNA são determinadas por, pelo menos, três grupos de sequências de nucleótidos do genoma da bactéria envolvendo, designadamente: i) diversos genes localizados no cromossoma bacteriano, ii) o conjunto de genes de virulência (os genes *vir*) localizados no plasmídeo e, iii) as sequências flanqueadoras “borders” que se localizam nas extremidades esquerda e direita do T-DNA (Andrade *et al*, 2003). O mecanismo de transferência do T-DNA para a célula vegetal está praticamente elucidado. Quando um tecido da planta sofre um corte, um exsudado composto de fenóis e açúcares é secretado para protecção e início da reparação do tecido danificado. As bactérias de *Agrobacterium* sp. próximas reconhecem alguns desses compostos que activam a expressão de alguns genes cromossomais (Douglas *et al*, 1982; Tzfira *et al*, 2000) designadamente, *chvA* e *chvB* que codificam para enzimas envolvidas na síntese de exopolissacarídeos que ligam a bactéria às células vegetais próximas da zona danificada e *chvE* que codifica para uma proteína de transporte da glucose/galactose que actuam como co-indutores dos genes *vir* localizados no plasmídeo (Chawla, 2002). Os compostos fenólicos presentes no exsudado também activam os genes *vir* localizados na região de virulência do plasmídeo através da estimulação da proteína *virA*, uma quinase localizada na membrana da agrobactéria (Barros *et al*, 2004). A região *vir* consiste de um regulão constituído por cerca de 40 kb, agrupando os operões A, B, C, D, E, F, G, H, que com excepção de A, F, G, são policistrónicos (Chawla, 2002).

Uma das vantagens na utilização de um sistema de culturas transgênicas *in vitro*, transformadas com *Agrobacterium* sp., está na produção de metabolitos secundários, por órgãos transformados que poderão apresentar, praticamente, o mesmo perfil de biossíntese em relação aos órgãos não transformados mas com taxas de produção mais elevadas, por efeito de taxas de proliferação celular mais rápidas (Sato, 1999). Alguns factores podem afectar drasticamente a infecção por *Agrobacterium* sp., designadamente: i) o meio de cultura, por ex., por efeito de diferenças de pH e da concentração dos constituintes, ii) níveis de produção de compostos fenólicos (sinalizadores químicos) pela planta hospedeiro e, iii) factores ambientais, designadamente a taxa de radiação luminosa, em que, por vezes, a deficiência luminosa proporciona taxas de infecção mais elevadas por parte das bactérias (Barros *et al*, 2004).

Com a aplicação das tecnologias de DNA recombinante e de cultura de tecidos vegetais têm sido criadas plantas transgênicas de diversas espécies. Para o efeito, tiveram que ser introduzidas modificações no T-DNA, de forma a que os genes responsáveis pela síntese das fitohormonas (*onc* genes) e os genes das opinas fossem retirados e substituídos por outros. Dos genes introduzidos, normalmente fazem parte os genes que conferem a célula transformada uma característica passível de selecção. O tecido alvo da transformação (explante da planta a transformar) é colocado em contacto com uma estirpe de *Agrobacterium* sp. contendo um plasmídeo transformado ao nível do T-DNA. Após o período de contacto, necessário para a transferência do T-DNA para as células vegetais, eliminam-se as bactérias e o explante é sub-cultivado em meio de cultura adequado, suplementado com um agente de selecção (geralmente um antibiótico ou droga com efeito herbicida), de forma a permitir a regeneração, apenas a partir das células transformadas, ou seja, das células que incorporaram o T-DNA onde consta o gene responsável pela resistência ao agente de selecção. Para além do gene de selecção, o T-DNA contém o(s) gene(s) responsável(eis) pela característica que se pretende expressar na cultura ou planta transgênica. Deste modo, a planta transgênica regenerada contém no seu genoma uma ou mais cópias do T-DNA que serão transmitidas para as futuras gerações (Barros *et al*, 2004).

Agrobacterium rhizogenes é uma bactéria patogénica do solo portadora do plasmídeo Ri capaz de infectar plantas e induzir a proliferação de raízes (Alpizar *et al.*, 2008). A presença de numerosas raízes muito finas, com aspecto de cabeleira (*hairy roots*), após a infecção por estirpes selvagens de *A. rhizogenes* pode ser explicada pela expressão de vários oncogenes, responsáveis pela síntese de auxina e citocinina que impõem à célula um balanço hormonal apropriado à indução de raízes adventícias que caracterizam o fenótipo *hairy root* (Tepfer, 1990). Há cerca de vinte anos foram isolados e caracterizados os oncogenes do T-DNA do plasmídeo da estirpe A4-RI de *A. Rhizogenes* sendo-lhes atribuídas as designações de ***rolA*, *rolB* and *rolC*** aos quais se atribui o fenótipo *hairy root* produzido a partir das células vegetais transformadas por integração desses genes de (Cardarelli *et al.*, 1987; Spena *et al.*, 1987; Giri *et al.*, 2000; Bulgakov, 2008). Segundo alguns autores, os genes *rol* podem afectar quer o metabolismo das fitohormonas endógenas (auxina e citocinina) quer a sensibilidade das células transformadas a esses fitoreguladores (Meyer *et al.*, 2000).

As *hairy roots* têm um bom desenvolvimento e capacidade de regeneração mesmo quando removidas da planta, e cultivadas *in vitro*, multiplicando-se de forma estável em meio de cultura desprovido de fitoreguladores. Em situações em que os metabolitos secundários são produzidos por tecidos da raiz, as *hairy roots* poderão constituir boas alternativas de produção desses compostos (Alpizar *et al.*, 2008). Por outro lado, há evidências de que os genes *rol* são activadores potenciais do metabolismo secundário em células transformadas de Solanaceae, Araliaceae, Rubiaceae, Vitaceae and Rosaceae families (Bulgakov, 2008). Por exemplo, *hairy roots* de *Nicotiana tabacum* produzidas por efeito dos genes *rolABC* ou apenas com o gene *rolC* manifestaram taxas de crescimento e de produção de nicotina mais elevadas que as de raízes de plantas não-transformadas (Palazón *et al.*, 1998). Embora, não seja de excluir a influência hipotética de outros genes do T-DNA no metabolismo secundário das células transformadas, a hipótese de serem os genes *rol* a terem papel determinante no aumento de biossíntese de metabolitos secundários, em geral, é assumida por alguns autores (Bulgakov, 2008).

A regeneração de plantas transgênicas *in vitro* a partir de *hairy roots* já tem sido descrita por alguns autores (Oksman-Caldentey *et al.*, 1991; Handa, 1992;

Christey, 2001; Vinterhalter *et al*, 2006). O respectivo fenótipo caracteriza-se por uma baixa dominância apical, com entrenós pouco desenvolvidos, folhas largas e enrugadas, raízes adventícias com maior ou menor profusão, morfologia floral alterada, e reduzida produção de pólen e sementes, sendo tais regenerantes transgênicas designadas por plantas de fenótipo *hairy root* (Tepfer, 1984; Christey, 2001). Por outro lado, têm sido descritos alguns casos de formação de rebentos caulinares laterais com fenótipo normal, a partir de plântulas de fenótipo *hairy root* sem que haja perda do Ri T-DNA e sem que tenha havido alguma fase intermédia de *callus* (Tepfer, 1984).

Alguns autores têm descrito aumentos de produção de óleos essenciais ou de alguns dos seus constituintes em plantas transgênicas regeneradas de *hairy roots* demonstrando que os transgenes do T-DNA de Ri plasmídios têm, nesses casos, efeito benéfico, como foi constatado em *Pelargonium limoneum* (Pellegrineschi *et al*, 1994; (Pellegrineschi *et al*, 1997). Deste modo, a utilização de genes *rol*, para além de outros genes que codificam para enzimas das vias metabólicas dos constituintes dos óleos essenciais, abre novas perspectivas de melhoramento de plantas medicinais, aromáticas e/ou ornamentais (Casanova *et al*, 2005).

7- Doenças mentais

Em 1990, a Organização Mundial da Saúde fez um levantamento dos custos das doenças que mais assolam o mundo e os resultados foram publicados no livro *The Global Burden of Disease*. Ao contrário do que muitas pessoas pensariam, as doenças mentais estão entre as mais onerosas com custos, superiores aos do cancro e das doenças cardíacas. Os dados deste levantamento têm levado muitos centros de investigação científica a centrar os seus esforços no estudo, prevenção e/ou o tratamento de doenças mentais, facto justificado pela forma onerosa com que as mesmas atingem a sociedade (Andreasen, 2003). Algumas das doenças mentais que atingem a sociedade actual e que poderão vir a ser tratadas e/ou prevenidas pela aromaterapia, encontram-se referidas no Quadro 7-1.

Quadro 7-1: Algumas das doenças mentais que são preocupantes na sociedade actual

<i>Doenças</i>	<i>Descrição</i>	<i>Principais sintomas</i>
Doença de <i>Alzheimer</i>	Acumulação da proteína amilóide que actua como sedimento cerebral, destruindo a capacidade dos neurónios de comunicarem uns com os outros.	Declínio cognitivo numa fase tardia da vida.
Doença vascular cerebral	Vasos sanguíneos que alimentam o cérebro ficam obliterados por coágulos, impedindo o fornecimento de sangue a uma região cerebral específica, córtex motor e sensorial.	Sintomas motores como paralisia e por vezes, dificuldades no discurso.
Doença de Huntington	É devida a uma única mutação genética dominante e transmite-se segundo padrões mendelianos clássicos.	Afecta o desenvolvimento e a integridade funcional do cérebro.
Doença de Parkinson	Muito semelhante a DA, ocorre pela perda de células nervosas da substância negra.	Problemas motores que incluem tremor e expressão facial relativamente vazia e imóvel.
Perturbações de humor	Desequilíbrio na produção de cortisol	Diferentes sintomas na forma de se exprimir do indivíduo
Stresse	Respostas físicas e mentais causadas por determinados estímulos externos e internos.	Sintomas ligados à ansiedade e depressão.
Depressão	Directamente ligada ao emocional pode ser reflexo genético, da alimentação ou ao estilo de vida de um indivíduo	Falta de interesse e ânimo pelas actividades gerais, tristeza acentuada.

Fonte: Andreasen, 2003

7.1- Doenças neurodegenerativas

Doenças neurodegenerativas são doenças que surgem e progridem com o envelhecimento sendo relativamente pouco comuns nas pessoas com menos de 65 anos de idade. Cerca de 5% das pessoas com mais de 65 anos têm demência grave, enquanto 10% têm problemas mais ligeiros. Por volta dos 80 anos os números sobem para 20% nas demências graves e aos 90 anos atingem 30%. Parece óbvio que com o aumento da esperança de vida aumente o número de pessoas afectadas por doenças neurodegenerativas, podendo tornar-se um problema de grande gravidade no futuro, caso nada seja feito para atenuar. As pessoas com doenças neurodegenerativas perdem gradualmente suas capacidades mentais, ainda que os seus corpos não padeçam de outras doenças e se mantenham relativamente resistentes (Andreasen, 2003).

A alteração da produção de energia, a disfunção da produção de neurotransmissores, acidose láctica e espécies reactivas de oxigénio (ROS) têm sido referidas como causas principais das deteriorações neurológicas (Butterworth, 1982;

Hazell *et al*, 1998; Pannunzio *et al*, 2000). Outro factor que poderá afectar a viabilidade neuronal é a morte de células da glia, principalmente os neurónios que têm como neurotransmissores o ácido gama-aminobutírico (GABA) ou o Glutamato. Dado que as células da glia desempenham uma acção fundamental na captação destes neurotransmissores (Butterworth, 1982), a sua degenerescência, fará com que tais neurotransmissores se acumulem no espaço extracelular conduzindo à morte neuronal (Antkiewicz-Michaluk *et al*, 2006).

O traço marcante em todos os tipos de demência é o défice de memória e da cognição, que é acompanhado por um declínio da capacidade da pessoa se relacionar e fazer trabalhos funcionais. Para além dos problemas de memória e cognição, as pessoas com demência também tem uma variedade de sintomas “não cognitivos”, tais como pensamentos delirantes e desconfiança infundada, alucinações, agitação ou depressão. O défice cognitivo pode ser descrito pelos seguintes sintomas: i) amnésia, perda da capacidade de recordar informações ou experiências, ii) agnosia, incapacidade de reconhecer e identificar objectos, iii) apraxia, perda do conhecimento de como realizar tarefas e, iv) afasia, perda da capacidade de falar. Com excepção da amnésia os outros sintomas ocorrem nos últimos estádios da doença (Andreasen, 2003).

Como as doenças neurodegenerativas se desenvolvem com o avanço da idade, de modo geral, é difícil diferenciar o quadro de doença para os sintomas normais do envelhecimento, dado que, com o envelhecimento, também ocorre perda generalizada de tecido cerebral (Andreasen, 2003).

7.2- Depressão e stresse

A depressão é uma perturbação do humor que afecta o indivíduo a nível emocional e a forma como percebe o mundo, sendo os sintomas mais expressivos o humor deprimido e a perda do interesse na maioria das actividades (Moniz, 2007; Andreasen, 2003). Uma das causas que podem levar à depressão é o stresse que inclui situações em que uma pessoa fica sob pressão e incapaz de reagir. Como exemplos, podemos citar o período dos exames, os prazos a cumprir, as

preocupações económicas, os problemas no trabalho entre tantos outros, ou seja, sobreviver no século XXI é “stressante” (Andreasen, 2003).

O stresse é sentido mentalmente, mas também afecta o indivíduo fisicamente. Quando as experiências de stresse da vida diária são registadas no córtex cerebral e no sistema límbico como emocionalmente perturbadoras, estas partes do cérebro enviam um alerta a outras partes do corpo de forma a prepará-lo, designadamente às glândulas supra-renais que produzem uma hormona essencial à vida, o cortisol, importante no equilíbrio do sistema imune e do bem-estar geral. Qualquer disfunção na produção do cortisol pode gerar uma perturbação do humor (Andreasen, 2003). Humor depressivo, anedonia, perturbação do sono, fadiga ou perda de energia, sentimentos de desvalorização ou culpa, dificuldades de concentração, dificuldades de tomar decisões, ausência de esperança e pensamentos sobre a morte, são motivos mais do que suficientes para causar um profundo mal-estar, uma ruptura séria no funcionamento do indivíduo e com a sua qualidade de vida, designadamente nos planos profissional, social e familiar (Moniz, 2007).

7.3- Prevenção e tratamento

Os neurocientistas e laboratórios farmacêuticos têm vindo a estudar activamente os mecanismos de degenerescência das células nervosas bem como as formas de prevenção, mitigação e reparação da doença cuja incidência vem aumentando com o aumento da idade e/ou por efeito dos níveis de stresse. A despistagem genética tem contribuído para a identificação, diagnóstico e previsão de doenças mentais, total ou parcialmente hereditárias, contribuído para a adopção de medidas preventivas específicas por parte das pessoas portadoras dos genes relacionados com a doença. A investigação tem também sido orientada para a compreensão da acção de tais genes no aparecimento e desenvolvimento das doenças neurodegenerativas. Vários genes implicados na doença de *Alzheimer* têm sido identificados, mas os seus efeitos específicos e a sua utilidade para a concepção de formas de tratamento e/ou de prevenção encontram-se ainda numa fase controversa e exploratória. Numa fase mais adiantada do conhecimento, neste

domínio, talvez venha a ser possível a concepção de novas substâncias terapêuticas e/ou outras formas de intervenção (Andreasen, 2003).

Até lá, pode ser útil manter bons hábitos de higiene e forma física. O cérebro é a fábrica mais importante do nosso corpo, que consome grande parte da energia que se despende diariamente. Daí ser necessário um bom regime alimentar, cuidados de saúde e exercícios regulares. Estes passos são importantes para redução dos riscos de uma doença mental (Andreasen, 2003).

8- Terapias alternativas: Aromaterapia

O crescente interesse pelas terapias alternativas, incluindo a fitoterapia, coloca na ordem do dia a preocupação com o controlo de qualidade dos produtos naturais, utilizados neste domínio, assim como a formação científica e técnica dos profissionais que prestam tais serviços. De acordo com alguns autores, a formação e informação neste domínio deveriam incluir todas as formas de prevenção e tratamento terapêutico, mesmo aquelas que, não advindo de centros de estudo, se baseiam em conhecimentos culturais empíricos e utilizações etnobotânicas, em geral (Buckle, 1999). A fitoterapia constitui uma das terapias alternativas mais comuns, baseando-se em plantas ou partes das mesmas com propósitos medicinais (Thorgrimsen *et al*, 2007).

A aromaterapia constitui um ramo (ou especialização) da fitoterapia que consiste na utilização de óleos essenciais obtidos de plantas aromáticas e medicinais no auxílio do tratamento e prevenção de problemas de saúde e melhoria da qualidade de vida, em geral. A aromaterapia baseia-se em actividades biológicas de constituintes dos OE responsáveis pelas propriedades aromáticas, incluindo o sabor e o odor, das plantas (Thorgrimsen *et al*, 2007). Como os constituintes dos OE são de baixa massa molecular e maioritariamente lipófilos, facilmente atravessam a barreira hemato-encefálica, um dos grandes desafios de muitos fármacos neuro-activos (Savelev *et al*, 2004; Elmann *et al*, 2008). A estrutura química dos constituintes dos OE é relativamente complexa e diversificada, o que lhes confere diferentes características. Por exemplo, os óleos do gerânio e de salva são conhecidos por seu efeito estimulante e os óleos de bergamota e lavanda são conhecidos pelo seu efeito

calmante (Thorgrimsen *et al*, 2007). De modo geral, a aromaterapia tem tido como finalidades a indução de estados de relaxamento e repouso, o alívio da dor e a redução de sintomas de ansiedade e de depressão (Thorgrimsen *et al*, 2007). Os OE na aromaterapia possuem duas trajectórias de acção no corpo, correlacionadas com duas formas diferentes de aplicação: a) *inalação directa* – via principal em que os constituintes dos OE penetram através das fossas nasais (podendo chegar ao pulmão) sendo percebidos pelos receptores dos odores localizados nas células das mucosas nasais e, as moléculas absorvidas atingem o sistema límbico do cérebro, exercendo efeito sobre as emoções; b) *aplicação tópica* – via de absorção feita pela pele quando ocorre a aplicação de misturas de óleos aromatizados (massagens), atingindo a corrente sanguínea e os tecidos e órgãos em geral, designadamente o cérebro (Price, 2002).

Os efeitos resultantes da aplicação dos OE, qualquer que seja a sua via de administração, constituem uma resposta global à actividade biológica de um elevado número de constituintes, química e estruturalmente diversos, presentes em diferentes concentrações nas misturas aplicadas. Em tais circunstâncias, a abordagem científica experimental, baseada no conceito de causa efeito e com controlo de variáveis é muito difícil, sendo mesmo impraticável quando se pretende determinar o efeito individual de cada composto dessas misturas, ou seja, a actividade do OE é o efeito sinérgico de vários componentes. Os especialistas em aromaterapia defendem ainda, em geral, que os efeitos desta técnica terapêutica resultam de um efeito sinérgico dos óleos essenciais com o corpo humano o que lhe confere um carácter holístico. Neste contexto, torna-se difícil provar a eficácia da aromaterapia pelas metodologias que habitualmente são postas em prática na determinação da eficácia dos fármacos de síntese, hemi-síntese ou fármacos constituídos por compostos únicos isolados de extractos naturais. Há, porém, evidências, maioritariamente resultantes de investigação clínica, da actividade benéfica de OE administrados por técnicas de aromaterapia, no melhoramento dos estados de humor e da função cognitiva (Edris, 2007) e na diminuição da dor, ansiedade, depressão e doença de *Alzheimer* (Rho *et al*, 2006; van der Watt e Janca, 2008). Massagens com OE da camomila e da lavanda auxiliaram no alívio dos sintomas do vírus da imunodeficiência adquirida em crianças hospitalizadas em Nova Jersey (Styles, 1997). A camomila também foi já

considerada por sua acção analgésica em pacientes com cancro que fizeram uso do seu OE através da aromaterapia (Buckle, 1999). A aromaterapia tem vindo a ser cada vez mais praticada, aliás, como medicina complementar e alternativa, fazendo parte dos cuidados paliativos de pacientes que padecem de doenças graves como o cancro, como está patente na página do “U.S. National Cancer Institute” (www.cancer.gov/cancertopics/pdq/cam/aromatherapy)

Dada a falta de regulamentação quer no que respeita ao exercício da técnica, quer no que respeita à composição das misturas dos óleos essenciais e preparações, em geral, manipulados pelos aromaterapeutas, a aromaterapia tem defrontado com dificuldades diversas para se impor como actividade técnica e cientificamente reconhecida, tanto mais que nas farmacopeias actuais a informação é escassa ou inexistente. Obviamente a aromaterapia carece de investigação nas suas diversas vertentes, incluindo os fundamentos e metodologias que lhe são subjacentes, a composição das misturas galénicas preparadas para o efeito e a identificação e validação das espécies botânicas e seus constituintes activos (Joy *et al*, 2001).

Tal como acontece com os medicamentos, em geral, a regulamentação e as boas práticas da aromaterapia deverão envolver a normalização das misturas e preparações utilizadas, garantidas por recurso a meios de controlo de qualidade. Este desiderato é actualmente possível, dada a sofisticação das técnicas analíticas de produtos naturais e das respectivas condições de produção. A normalização dos OE passa também pelo emprego de técnicas adequadas e estandardizadas para o seu isolamento e conservação, identificação rigorosa dos genótipos de origem e desenvolvimento das plantas sob condições controladas.

No contexto actual, a aromaterapia perspectiva-se como uma excelente área de actividade para pessoas qualificadas para o exercício deste tipo de medicina paliativa, complementar ou alternativa numa base científica e tecnológica condizente com os conceitos das sociedades de informação contemporânea. Há, porém, muito trabalho a realizar para regulamentar a actividade e a tornar credível para a maior parte das populações que mantêm cepticismo, quanto à eficácia da aromaterapia, e desconfiança, quanto à competência dos profissionais que a praticam e aos produtos, designadamente os OE que são utilizados (Mackereth, 1995).

9- Objectivos

Os óleos essenciais de *Salvia sclarea*, *Salvia officinalis* cv "purpurascens", *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) conotados com os seus efeitos anti-envelhecimento e os óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* (Geraniaceae) conotados com efeitos ansiolíticos, constituem matéria prima de utilização directa ou indirecta em preparações aromaterapêuticas.

Dada a crescente procura da aromaterapia como forma de medicina paliativa, alternativa e/ou complementar e reconhecendo-se a escassa ou inexistente regulamentação do sector, designadamente no que respeita a critérios de controlo de qualidade, pretendeu-se como objectivos gerais deste trabalho:

- i) dar algum contributo para o conhecimento da composição dos óleos essenciais destas espécies com vista à definição de marcadores químicos passíveis de ser utilizados no controlo de qualidade deste tipo de produtos;
- ii) dar algum contributo para a manipulação biotecnológica destas espécies, na perspectiva do desenvolvimento de uma alternativa de produção de metabolitos secundários de elevado valor acrescentado, incluindo constituintes de óleos essenciais, com vista à sua normalização.

Tendo como horizonte os objectivos gerais acima definidos, procurou-se atingir os seguintes objectivos específicos:

- i.a) - determinação da composição dos óleos essenciais de órgãos vegetativos e de órgãos florais de plantas *in vivo* de *Salvia sclarea*, *Salvia officinalis* cv "purpurascens", *Rosmarinus officinalis* e *Pelargonium graveolens*;
- i.b) - determinação da composição dos óleos essenciais produzidos por culturas *in vitro* das espécies referidas em i.a.;
- ii.a) - definição de protocolos de micropropagação para *Salvia sclarea*, *Salvia officinalis* cv "purpurascens", *Rosmarinus officinalis* e *Pelargonium graveolens*;
- ii.b) - definição de uma estratégia de transformação genética aplicada a culturas descritas em ii.a);
- ii.c) – determinação do perfil de composição de óleos essenciais produzidos por culturas *in vitro* das espécies referidas em ii.a).

Com a definição dos objectivos específicos acima referidos apontou-se, neste trabalho para o desenvolvimento e demonstração de competências em domínios da fitoquímica, bioquímica e biotecnologia de Plantas Aromáticas e Mediciniais, designadamente:

- domínio de técnicas de isolamento de óleos essenciais
- domínio de técnicas analíticas de cromatografia gasosa de alta resolução;
- domínio de técnicas de identificação de constituintes de óleos essenciais com recurso a bases de dados com livrarias de espectros de massa e índices de retenção;
- domínio de técnicas de quantificação e de doseamento absoluto de constituintes de óleos essenciais;
- domínio de técnicas de assepsia aplicadas a culturas *in vitro* de espécies de plantas aromáticas e medicinais;
- domínio de técnicas de micropropagação;
- domínio de técnicas de transformação genética mediada por *Agrobacterium* sp.
- domínio de técnicas de isolamento e análise, à escala micro, de óleos essenciais produzidos por cultura *in vitro* das plantas aromáticas e medicinais, objecto de estudo.

II- Materiais e Métodos

1- Material vegetal

Plantas de *Salvia sclarea* e de *Rosmarinus officinalis*, estas imaturas, mantidas em placas alveolares, foram fornecidas pela empresa Ervital Plantas Aromáticas e Medicinais Lda, situada no Concelho de Castro Daire, 40° 54' N, 7° 56' O, Distrito de Viseu e trazidas para a Universidade do Minho em Setembro de 2008. Na Universidade do Minho, as plantas imaturas de *Rosmarinus officinalis* foram transplantadas para vasos maiores, diâmetro 20 cm, contendo substrato orgânico.

As plantas de *Pelargonium graveolens* e de *Salvia officinalis* cv "purpurascens" foram fornecidas envasadas pela empresa Cantinho das Aromáticas, Viveiros Lda situada no município de Vila Nova de Gaia, 41° 8' N, 8° 37' O, Distrito do Porto e trazidas para a Universidade do Minho em Outubro de 2008 e em Janeiro de 2009, respectivamente.

As plantas foram mantidas envasadas no Departamento de Biologia, Laboratório de Biologia Vegetal e, utilizadas sempre que necessário, durante o período experimental. Adicionalmente, em consequência da micropropagação, foram estabelecidas, multiplicadas e mantidas em assepsia, plântulas *in vitro*, algumas das quais foram também utilizadas noutras vertentes do plano de trabalhos desta dissertação.

2-Estabelecimento das culturas *in vitro*

As experiências foram realizadas no laboratório de Biologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade do Minho. As culturas de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia sclarea* e *Salvia officinalis* cv "purpurascens", foram estabelecidas a partir de material vegetativo retirado de plantas envasadas. As culturas de *Pelargonium graveolens* foram retomadas a partir de culturas *in vitro* já estabelecidas por outros investigadores do laboratório.

Os explantes primários utilizados no estabelecimento das culturas *in vitro* foram os seguintes: i) *R. officinalis*, segmentos foliares e nodais; ii) *S. sclarea*,

sementes, segmentos foliares e nodais; iii) *S. officinalis* cv "purpurascens", segmentos foliares e nodais (Tabela 2-1). Estes explantes foram submetidos a um tratamento de desinfecção superficial de acordo com a seguinte metodologia: 5 minutos em álcool etílico 70% seguido de 25 minutos em hipoclorito de sódio 0,45%. De seguida fez-se a lavagem do material com água estéril por 5 minutos (3 vezes). No caso de *R. officinalis* os explantes foram previamente submetidos à um banho de 45 minutos em água corrente de torneira com a intenção de retirar o máximo de compostos fenólicos como forma de obviar à oxidação dos explantes no meio de cultura.

Sementes de *S. sclarea* retiradas dos frutos secos integrantes do material seco com infrutescências proveniente da Ervital foram utilizadas também para iniciar as culturas *in vitro* desta espécie. Estas foram colocadas em *Eppendorf*, estéril e submetidas a hipoclorito de sódio 0,45% por 20 minutos, seguido de 3 lavagens com água estéril por 5 minutos cada, álcool etílico 70% por 5 minutos, mais 3 lavagens em água estéril por 5 minutos cada, deixadas em água estéril por mais 30 minutos, novamente hipoclorito de sódio 0,45% por 20 minutos e 4 lavagens em água estéril por 5 minutos. Todos os passos com tempos superiores aos 5 minutos foram executados no agitador orbital, 100 rpm. As sementes foram inoculadas em placas de Petri com meio MS, sendo algumas submetidas à presença e outras à ausência de luz. A avaliação do efeito da luz na germinação dessas sementes foi efectuada após 30 dias.

Todos os meios de cultura foram ajustados a um pH entre 5,7 e 5,8 e autoclavados a 121° C e 1 atm durante 20 minutos. As culturas foram estabelecidas nas condições descritas na Tabela 2-1. O manuseamento das culturas foi realizado em ambiente asséptico, proporcionado pela câmara de fluxo laminar vertical esterilizada por radiação ultravioleta durante 25 a 40 minutos. Todo o material de vidro e metal envolvido nestas operações foi rigorosamente esterilizado a seco numa estufa a 180° C. Após a adição dos explantes, os frascos (tapados e selados) foram colocados numa sala de cultura à 24-25° C, com fotoperíodo de 16 horas, conforme as condições referidas na Tabela 2-1, seguido de 8 horas no escuro. Entre Janeiro e Maio de 2009 as culturas sobreviventes de um incêndio ocorrido na sala de culturas foram mantidas nas condições ambientais do Laboratório de Biologia Vegetal da Universidade do Minho.

Tabela 2-1: Condições iniciais ensaiadas nas culturas *in vitro* para todas as espécies estudadas.

Intensidade da luz PAR ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)*	Meio de cultura	Suplementação (mg/L)	Material vegetal
<i>Salvia sclarea</i>			
Escuro	MS	KIN (0,50) 2,4-D (0,25)	Seg. foliares
70-95	MS	KIN (0,50) 2,4-D (0,25)	Seg. foliares
		BA (5,00) IAA (0,25)	Seg. foliares
		BA (1,00) IAA (0,50)	Seg. foliares
		BA (1,00)	Seg. foliares
		-	Seg. foliares
35-60	½MS	ZEA (0,50) GA ₃ (0,04) NAA (0,02)	Seg. nodais
		-	Sementes
Escuro	½MS	-	Sementes
<i>Salvia officinalis</i> cv "purpurascens"			
35-60	MS	ZEA (1,00)	Seg. foliares
		BA (0,25)	Seg. nodais
		BA (0,50)	Seg. nodais
		BA (0,75)	Seg. nodais
<i>Rosmarinus officinalis</i>			
35-70	MS	ZEA(1,00)	Seg. nodais
		ZEA (1,00) + carvão activo	Seg. nodais
70-95	MS	NAA (3,00)	Seg. nodais e foliares
		BA (0,50)	Seg. nodais
35-60	MS	BA (1,00) NAA (0,10)	Seg. nodais
		ZEA (0,75)	Seg. nodais
<i>Pelargonium graveolens</i>**			
70-125	MS	NAA (0,10) BA (0,50)	Seg. nodais Seg. foliares Seg. inter-nodais Seg. peciolares Raízes

* Valores de intensidade luminosa correspondentes as condições iniciais a que eram mantidas as culturas *in vitro*, entre Outubro e Dezembro de 2008. De Janeiro a Maio de 2009 as culturas foram mantidas em condições ambientais no Laboratório de Biologia Vegetal da UM.

** O material vegetal utilizado para esta espécie foi proveniente de culturas *in vitro* já estabelecidas e mantidas no departamento de Biologia da Universidade do Minho desde Dezembro de 2008.

A partir de Junho de 2009 as culturas regressaram a sala de culturas onde foram mantidas à uma temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e sob fotoperíodo de 16h luz com intensidade de $45\text{-}80 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, exceto para *S. sclarea* que foi mantida a $35\text{-}65 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, seguido de 8h de obscuridade.

2.1- Estudo do efeito do explante de *Pelargonium graveolens*

Para conhecer a resposta dos diferentes tipos de explantes obtidos a partir de plântulas de *P. graveolens* mantidas *in vitro*, utilizaram-se segmentos nodais, segmentos inter-nodais, segmentos foliares, segmentos peciolares em meio MS suplementado com benziladenina (BA) 0,50 mg/L e ácido α -naftaleno acético (NAA) 0,10 mg/L. Após 8 semanas foram registados os resultados obtidos.

Para além dos segmentos de órgãos aéreos, foram também cultivadas porções de raízes de *P. graveolens* em meio MS, também suplementado com 0,10 mg/L de NAA e 0,50 mg/L de BA, com o objectivo de acompanhar o seu desenvolvimento, em confronto com o desenvolvimento de *hairy roots* induzidas por transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes* tal como descrito na secção 2.3.

2.2-Aclimatização de *Pelargonium graveolens*

As plântulas de *P. graveolens* obtidas em meio MS suplementado com 0,10 mg/L de NAA e 0,50 mg/L de BA foram transplantadas para vasos com substrato, à base de turfa amarela previamente enxarcado e autoclavado a 121° C e 1 atm durante 20 minutos. Para manter alta taxa de humidade relativa, os vasos foram cobertos com plástico transparente, no qual, após uma semana, eram abertos furos de forma gradual. Estas plantas ficaram acondicionadas em bancada e foram expostas a luz ambiente no interior do laboratório de Biologia Vegetal. Houve acompanhamento semanal das respostas dadas pelas plantas até a 4ª semana.

3- Indução de *hairy roots* de *Pelargonium graveolens*

Para a tentativa da produção de *hairy roots* foram utilizadas bactérias de tipo *Agrobacterium rhizogenes* wt (white type) cultivadas em meio LB. Deste meio foi transferida e subsequentemente plaqueada uma colónia da *Agrobacterium* plaqueada em meio LB sólido. Para o efeito, retirou-se uma colónia de *Agrobacterium* plaqueada em LB sólido, até então mantida em frigorífico a 4° C, para inoculação em cerca de 10 mL de meio líquido LB autoclavado, contido em balão volumétrico.

Este, foi mantido sob agitação de 200 rpm, a 28° C, por 72 horas, até atingir uma concentração celular de aproximadamente 5×10^8 células/mL. Cerca de 25 mL deste meio foi, de seguida, transferido para um tubo estéril do tipo Falcon que foi levado a centrifugar por 20 minutos a 5000 rpm e 4° C (Centrífuga 5804 R). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 75 mL de água estéril até sua homogeneização em meio líquido de forma a suspensão apresentar uma DO_{600} de 0,50 para posterior infecção dos explantes vegetais.

Para transformação genética utilizaram-se segmentos peciolares de *Pelargonium graveolens* cultivado *in vitro* em meio MS suplementado com 0,10 mg/L de NAA e 0,50 mg/L de BA. Produziram-se pequenas incisões nestes explantes com um bisturi estéril e, passados três dias, os mesmos foram postos em contacto com meio líquido de *A. rhizogenes* no interior de uma placa estéril sob agitação manual durante 10 minutos, para promover a infecção, no intuito de se obter os transformantes. Os segmentos peciolares foram de seguida, transferidos para placas de Petri contendo 10 mL de meio MS sem nenhuma suplementação hormonal. As placas foram levadas para a sala de culturas e acondicionadas em prateleira com baixo nível de luminosidade ($35-40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) à 24-25° C. Passados cinco dias fez-se a lavagem dos explantes com água estéril desionizada, três vezes durante 5 minutos, seguido da sua transferência para novas placas com meio MS suplementado com 500mg/L do antibiótico Ticarcillin. Para avaliação, foi também preparada uma placa controlo submetida ao mesmo procedimento, excepto o contacto com *A. rhizogenes*. Todos os procedimentos decorreram no interior da câmara de fluxo laminar em condições assépticas. Paralelamente, foram preparados frascos de cultura com raízes de *Pelargonium graveolens* para observação do respectivo desenvolvimento e comparação com as que presumivelmente seriam obtidas dos explantes submetidos ao protocolo de transformação.

4- Isolamento dos óleos essenciais e avaliação do rendimento

O estudo dos óleos essenciais das quatro espécies alvo deste trabalho foi iniciado, submetendo o material descrito na Tabela 4-1 a hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger.

Tabela 4-1: Material vegetal utilizado no estudo dos óleos essenciais

<i>Tipo de cultura</i>	<i>Espécie Vegetal</i>	<i>Material utilizado</i>	<i>Época da amostragem</i>	<i>Peso fresco do material hidrodestilado (g)</i>
<i>In vivo</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	Folhas frescas	Junho 2009	10,25
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Folhas frescas	Setembro 2008	10,00
		Flores frescas	Fevereiro 2009	0,21
	<i>Salvia officinalis</i> cv "purpurascens"	Folhas frescas	Janeiro 2009	1,91
	<i>Salvia sclarea</i>	Folhas frescas	Outubro 2008	9,42
		Flores frescas	Setembro 2008	1,92
Flores secas		Julho 2009*	19,63	
<i>In vitro</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	Rebentos	Junho 2009	8,25
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rebentos	Julho 2009	6,88
	<i>Salvia officinalis</i> cv "purpurascens"	Rebentos	Julho 2009	8,58
	<i>Salvia sclarea</i>	Rebentos	Abril 2009	0,42

*Material desenvolvido na Ervital Plantas Aromáticas e Medicinais Ltda, enviado ao Laboratório de Biologia Vegetal da Universidade do Minho em Julho de 2009.

Antes de iniciar o isolamento dos OE, procedeu-se sempre à determinação do peso fresco de cada amostra (Tabela 4-1). Porém, não foi possível usar quantidades equivalentes de material, principalmente, no caso das culturas *in vitro* devido à variação da sua disponibilidade. Uma pequena amostra do material vegetal da mesma tipologia da que foi sujeita à hidrodestilação foi colocada em estufa à 50° C durante cerca de sete dias, para se determinar o respectivo peso seco. A hidrodestilação decorreu durante aproximadamente 1 hora, após a adição lenta de n-hexano (solvente) contendo 5- α -colestano. A quantidade de colestano adicionada foi equivalente a 0,5 mg/mL na hidrodestilação de *P. graveolens in vivo* e *in vitro*, *R. officinalis in vitro*, *S. sclarea in vitro* e *S. officinalis* cv "purpurascens" *in vitro* e 1,0 mg/mL na hidrodestilação dos demais materiais. A introdução de quantidades conhecidas deste composto possibilitou a sua utilização como padrão interno, tornando possível uma aproximação à quantificação absoluta dos compostos

analisados no óleo. O pequeno volume de hexano acrescentado permite aumentar a eficiência da hidrodestilação retendo os compostos arrastados pelo vapor de água.

O período de tempo aplicado na hidrodestilação foi considerado suficiente para isolar o OE das espécies estudadas. Após a hidrodestilação, o óleo obtido foi devidamente separado da fase aquosa, recolhido para um vial, identificado, armazenado a -20° C e posteriormente analisado em termos qualitativos e quantitativos. Os rendimentos da hidrodestilação foram determinados em percentagem de peso seco (p/p).

5- Identificação dos constituintes dos óleos essenciais

A análise de misturas complexas como é o caso dos OE constitui actualmente uma tarefa bem mais fácil graças à evolução das técnicas de cromatografia.

Neste trabalho, a análise dos óleos foi efectuada por cromatografia gasosa (GC-FID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). A identificação dos compostos existentes nos óleos foi realizada com recurso a uma base de dados de espectros de massa em software Xcalibur, e por comparação dos Índices de Retenção de Kovats (IK) com os de amostras descritas em literatura e os de compostos de referência que constam das bibliotecas existentes na base de dados ligada ao *software* do GC-MS do laboratório.

As análises por GC-FID decorreram num cromatógrafo Perkin Elmer, Autosystem XL com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar de sílica fundida com 30 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, sendo a fase estacionária do tipo DB5 (5% fenil metil polisiloxano). Como gás de arrastamento, utilizou-se o hidrogénio (H_2) a uma pressão aproximada de 12,5 Psi. As temperaturas do injector e do detector eram de 300° C sendo o injector do tipo split/spliless com repartição de fluxo na razão de 1:13. A temperatura da coluna foi programada de 60 à 285° C com o aumento de temperatura igual a 3° C/min. Os volumes de óleo injectado variaram entre 0,5-0,7 μ L. Cada amostra foi injectada pelo menos três vezes nestas condições. Também foram realizadas co-injecções de uma série de n-alcenos (C8-C34) com as amostras. O uso desta série homóloga de hidrocarbonetos constitui um dos métodos mais usados na identificação de compostos de OE dado

que permite determinar para cada composto os respectivos Índices de Retenção de Kovats (IK). A determinação do IK para determinado composto constitui um parâmetro importante para a sua identificação, com base na comparação com dados bibliográficos, padrões conhecidos, ou misturas complexas já injectadas. Este critério de identificação é bastante fiável e reproduzível num dado tipo de coluna. O IK calcula-se do seguinte modo:

$$IK = 100n + \frac{t'R(x) - t'R(n)}{t'R(n+1) - t'R(n)}$$

Em que: $t'R(x)$, $t'R(n)$ e $t'R(n+1)$ são os tempos de retenção ajustados entre a substância x e os alcanos anteriores e posteriores com n e $n+1$ carbonos.

Infelizmente este método de identificação não é inequívoco e dificilmente nos permite identificar todos os compostos. A informação adquirida deste modo foi considerada insuficiente para descobrir a identidade de muitos compostos com características semelhantes. Por esta razão, efectuou-se outro tipo de análise dos OE por GC-MS. Para tal utilizou-se um cromatógrafo Thermo Trace GC Ultra acoplado a um detector de massa Thermo-Finnigan Polaris Q ITD equipado com uma coluna TR-5. As temperaturas do injector, da interface e da câmara de ionização foram de 300° C, 260° C e 220° C respectivamente. O gás de arrastamento usado foi o hélio (He) com uma taxa de fluxo constante de 1,5 mL/min. A repartição do fluxo foi equivalente a 1:30 e a corrente de ionização aplicada igual a 1500 mV. A temperatura do forno foi programada de 60 à 285° C numa rampa de 3° C/ minuto e o volume das amostras injectadas foi de 0,2 µL e 0,5 µL, para as espécies *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. Nestas condições, os iões de fragmentação, formados após o impacto dos electrões com as moléculas, permitiram obter espectros de massa característicos que foram comparados com os espectros de referência existentes na base de dados disponíveis (ITDS). Cruzaram-se os dados obtidos pelas análises por GC e GC-MS para obter identificação inequívoca dos constituintes das amostras dos OE em questão. Para a identificação dos compostos apoiou-se nas cinco bibliotecas de espectros existentes na base de dados do software Excalibur instalado nos

computadores do Laboratório, designadamente nas bibliotecas NIST e WILEY. Algumas dúvidas foram resolvidas com recursos a padrões.

6- Análise quantitativa

A relação existente entre compostos maioritários, compostos minoritários e compostos residuais dos OE é determinante, contribuindo para o odor que lhe é característico. Além da caracterização qualitativa dos óleos, a quantificação dos seus componentes pode revelar-se de extrema importância quando se pretende distinguir diferentes óleos quanto a origem e qualidade. Por outro lado, a determinação dos teores de OE produzidos em diferentes condições pode ajudar a esclarecer alguns aspectos da sua produção, acumulação e metabolismo dos respectivos constituintes.

Paralelamente, à identificação dos compostos por GC e GC-MS e uma vez realizada a correspondência dos compostos identificados com os respectivos picos nos cromatogramas, efectuou-se uma aproximação à sua quantificação relativa e absoluta. A quantificação relativa consistiu na determinação da percentagem real da área de cada pico traduzida por valores numéricos abstractos correspondentes as diferenças de potencial induzida pelos iões gerados no detector FID a partir de cada composto. Pelo conhecimento da quantidade de colestano adicionado, extrapolou-se a quantidade de cada composto (em mg) por intermédio da razão entre as áreas dos picos do composto e do colestano.

$$\text{Quant.composto(mg)} = \frac{\Delta \text{ composto}}{\Delta \text{colestano}} \times \text{quant.colestano}$$

As quantidades de cada composto serão apresentadas em µg/g de peso seco, pois para cada amostra foi usada uma quantidade de material distinta. Calcularam-se as médias das quantidades obtidas de três injeções de cada amostra como forma de minimizar o erro associado ao método cromatográfico.

III- Resultados e Discussão

1- Estabelecimento das culturas *in vitro*

Partindo de segmentos foliares de *Salvia sclarea*, foram obtidas culturas de *calli* em 30% dos explantes cultivados em meio MS suplementado com 5,00 mg/L de benziladenina (BA) e 0,25 mg/L de ácido indolacético (IAA). Parte dos explantes restantes deste tipo necrosaram por fenolização e outra parte revelou contaminação microbiana. Nas restantes cinco condições ensaiadas com este tipo de explante não foram obtidas culturas, por efeitos de contaminação microbiana, fenolização ou falta de reacção às condições de cultura. A inoculação de segmentos nodais, como explantes primários, em meio MS a 50% da sua concentração (1/2MS) suplementado com 0,50 mg/L de zeatina (ZEA), 0,04 mg/L de ácido giberélico (GA₃) e 0,02 mg/L de ácido α -naftaleno acético (NAA) permitiu o estabelecimento de culturas de rebentos caulinares em 25% dos mesmos, tendo os restantes necrosado por fenolização (Tabela 1-1).

Das três condições ensaiadas para o estabelecimento de culturas de *S. officinalis* cv "purpurascens", a partir de segmentos nodais, em meio MS suplementado com benziladenina (BA), foram obtidos rebentos caulinares, apenas sob o efeito da concentração de 0,25 mg/L de BA, a mais baixa concentração ensaiada, num total de 72% dos explantes inoculados. Os restantes necrosaram ou desenvolveram contaminação microbiana. Nos outros dois ensaios efectuados com segmentos nodais, assim como no único ensaio efectuado com segmentos foliares deste cultivar de *S. officinalis*, não foram obtidos quaisquer tipos de cultura, fosse por efeitos de fenolização, contaminação microbiana ou falta de reacção às condições de cultura (Tabela 1-1).

Das seis condições ensaiadas para o estabelecimento de culturas *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* a partir de segmentos nodais, como único tipo de explantes primários utilizados, foram obtidos *calli*, apenas em 9% dos mesmos, sob o efeito de NAA (3,00 mg/L), como único fitoregulador, tendo os restantes inóculos submetidos a esta suplementação necrosado por fenolização ou contaminação microbiana. Nas três condições em que o meio MS foi suplementado com zeatina

(ZEA), como único fitorregulador, houve desenvolvimento de rebentos caulinares, ao passo que em presença de benziladenina (BA), suplementada ou não com a auxina ácido α -naftaleno acético (NAA), não se desenvolveu qualquer tipo de cultura (Tabela 1-1).

A obtenção de rebentos caulinares de *Pelargonium graveolens* ocorreu quer a partir de segmentos nodais, quer por regeneração, a partir de meristemas adventícios induzidos em segmentos foliares ou em segmentos internodais ou peciolares obtidos de plântulas *in vitro*, previamente estabelecidas a partir de segmentos nodais de plantas *in vivo* envasadas (Tabela 1-1).

Tabela 1-1: Resumo das respostas obtidas no estabelecimento de culturas *in vitro* de *Salvia sclarea*, *S. officinalis* cv "purpurascens", *Rosmarinus officinalis*, e *Pelargonium graveolens*, a partir de material vegetativo, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), em função das condições de cultura ensaiadas, 30 dias após o seu início.

Intensidade da luz PAR ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Meio base e Suplementação (mg/L)	Tipo de Explante primário	Tipo de cultura (%)	oxidação (%)	Contaminação (%)
<i>Salvia sclarea</i>					
Escuro	KIN (0,50) 2,4-D (0,25)	Seg. foliares	0	25	75
70-95	KIN (0,50) 2,4-D (0,25)	Seg. foliares	0	100	0
	BA (5,00) IAA (0,25)	Seg. foliares	callus (30)	50	20
	BA (1,00) IAA (0,50)	Seg. foliares	-	36	45
	BA (1,00)	Seg. foliares	-	55	27
	MS sem fitorreg	Seg. foliares	0	78	22
35-60/35-65**	1/2MS ZEA (0,50) GA ₃ (0,04) NAA (0,02)	Seg. nodais	Rebentos caulin.(25)	75	0
<i>Salvia officinalis</i> cv "purpurascens"					
35-60/45-80**	ZEA (1,00)	Seg. foliares	0	73	27
	BA (0,25)	Seg. nodais	Rebentos caulin.(72)	20	8
	BA (0,50)	Seg. nodais	-	25	25
	BA (0,75)	Seg. nodais	-	12	50
<i>Rosmarinus officinalis</i>					
35-70	ZEA (1,00)	Seg. nodais	Rebentos caulin.(33)	62	5
	ZEA (1,00) carvão activo	Seg. nodais	Rebentos caulin.(6)	66	28
70-95	NAA (3,00)	Seg. nodais	Rebentos caulin.(9)	67	24
	BA (0,50)	Seg. nodais	0	100	0
45-80	BA (1,00) NAA (0,10)	Seg. nodais	0	67	33
	ZEA (0,75)	Seg. nodais	Rebentos caulin.(68)	30	2
<i>Pelargonium graveolens</i>*					

45-80	NAA (0,10) BA (0,50)	Seg. nodais	Rebentos caulín.(62)	0	38
		Seg. foliares	Rebentos caulín.(62)	0	38
		Seg. inter-nodais	Rebentos caulín.(86)	0	14
		Seg. peciolo	Rebentos caulín.(46)	0	54

*Para a espécie *P. graveolens* não foram introduzidas mais variáveis, houve somente subcultivo de uma cultura já pré-estabelecida.

**A intensidade luminosa foi alterada quando a sala de culturas ficou pronta para desenvolvimento das experiências.

Ao utilizar segmentos nodais de *Salvia* e *Rosmarinus*, explantes com gemas axilares, as respostas foram mais favoráveis no que respeita ao estabelecimento de culturas de rebentos caulinares em coerência com a opinião de quem defende que este tipo de explante é dos mais adequados à micropropagação clonal de plantas (Rosal, 2004).

Os melhores resultados, em termos de micropropagação de *S. sclarea*, obtidos a partir de segmentos nodais em meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com ZEA (0,50 mg/L), GA₃ (0,04 mg/L) e NAA (0,02 mg/L), estão em linha com os resultados registados na micropropagação de *S. fruticosa*, em que foram obtidos rebentos caulinares em 100% dos segmentos nodais, cultivados em condições idênticas, com exceção da citocinina, que neste caso foi BA (Arikat *et al*, 2004). A Figura 1-1 mostra imagens da cultura de rebentos de *S. sclarea*, 35 dias após a inoculação dos segmentos nodais

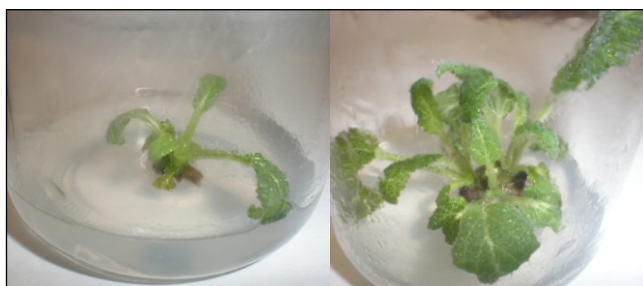


Figura 1-1: Plântulas obtidas a partir de segmentos nodais de *S. sclarea* em meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 0,5 mg/L de ZEA, 0,04 mg/L de GA₃ e 0,02 mg/L de NAA, 35 dias após a inoculação dos explantes.

A suplementação do meio MS com BA tem estado associada com bons resultados na micropropagação de *Salvia officinalis*, a partir de segmentos nodais, designadamente quando utilizada em concentrações de 1,00 mg/L (Zigiotto, 2007; Lima *et al.*, 2008; Avato *et al.*, 2005). Porém, *S. officinalis* cv "purpurascens", parece

ser mais sensível a esta citocinina visto que, em concentrações de 0,50 e 1,00 mg/L não houve resposta dos explantes às condições de cultura, tendo o desenvolvimento de rebentos caulinares ocorrido, apenas quando BA foi utilizada na concentração de 0,25 mg/L (Figura 1-2).

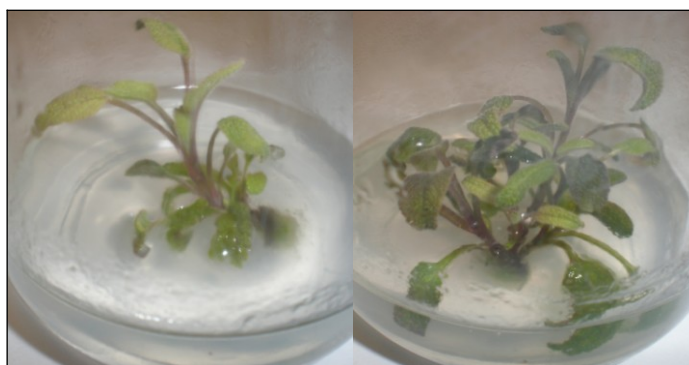


Figura 1-2: Plântulas obtidas a partir de segmentos nodais de *S. officinalis* cv "purpurascens" em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de BA, 30 dias após a inoculação dos explantes.

Embora a micropropagação de *R. officinalis* esteja descrita na literatura (Caruso *et al*, 2000; Misra e Chaturvedi, 1984; Kuhlmann e Röhl, 2006), no presente estudo, este processo revelou-se muito difícil, já que a maior parte dos explantes necrosavam por fenolização e, nos casos em que a fenolização era menos intensa, o desenvolvimento meristemático das gemas axilares dos segmentos nodais era muito lento. A adição de carvão activado ao meio de cultura, com o objectivo de minimizar os efeitos tóxicos dos fenóis libertos pelo explante, mediante a sua adsorção, não surtiu os efeitos desejados, revelando-se até contraproducente (Tabela 1-1). Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com 0,75 mg/L de zeatina (Figura 1-3).

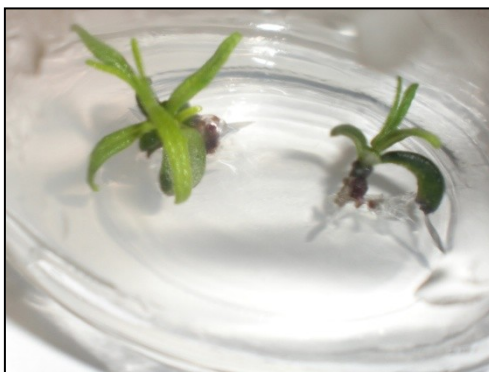


Figura 1-3: Plântulas obtidas a partir de segmentos nodais de *R. officinalis* em meio MS suplementado com 0,75 mg/L de ZEA, 28 dias após a inoculação dos explantes.

Os resultados mais favoráveis à regeneração de *P. graveolens*, por via adventícia, ocorreu a partir de segmentos internodais (Tabela 1-1). Nestas culturas foi utilizado o meio MS suplementado com 0,50 mg/L de BA e 0,10 mg/L de NAA (Figura 1-4), condições estas descritas na literatura como sendo das mais favoráveis à micropropagação desta espécie (Saxena *et al.*, 2000; Hassanein e Dorion, 2005). As frequências regenerativas descritas por estes autores foram de 80% e 66-76%, respectivamente, valores não muito afastados do resultado obtido neste trabalho a partir de segmentos internodais (86%). A Figura 1-4 mostra as culturas de plântulas *P. graveolens* obtidas nestas condições, 45 dias após a inoculação dos explantes.



Figura 1-4: Plântulas obtidas a partir de explantes de *P. graveolens* em meio MS suplementado com 0,5 mg/L de BA e 0,1 mg/L de NAA, 45 dias após a inoculação dos explantes.

A utilização de hormonas vegetais da classe das citocininas é muito comum na maioria dos trabalhos de micropropagação, uma vez que promovem a formação de rebentos caulinares com elevadas taxas de multiplicação (Hu e Wang, 1983). Este facto foi também constatado no presente estudo, onde as taxas de micropropagação mais elevadas ocorreram aquando da utilização de BA em culturas de *S. officinalis* cv "purpurascens", *S. sclarea* e *P. graveolens* e de ZEA em culturas de *R. officinalis* (Tabela 1-2).

Com o meio seleccionado, as plântulas obtidas foram utilizadas para um estudo comparativo dos OE de plantas oriundas de culturas *in vivo* e *in vitro*. Os melhores resultados de micropropagação, obtidos após cerca de 4 semanas, para cada espécie do presente estudo, podem ser vistos na Tabela 1-2.

Tabela 1-2: Suplementações hormonais que proporcionaram taxas de micropropagação mais elevadas das quatro espécies alvo deste trabalho, quatro semanas após a inoculação dos explantes.

<i>Espécie Vegetal</i>	<i>Suplementação (mg/L)</i>	<i>% plântulas</i>	<i>% oxidação</i>	<i>% contaminação</i>
<i>Salvia sclarea</i>	1/2MS			
	ZEA (0,50)	25,0	75,0	0
	GA ₃ (0,04)			
	NAA (0,02)			
<i>Salvia officinalis</i> cv "purpurascens"	MS	72,0	19,7	8,3
	BA (0,25)			
<i>Rosmarinus officinalis</i>	MS	67,4	30,4	2,2
	ZEA (0,75)			
<i>Pelargonium graveolens</i> *	MS	61,9	0	38,1
	NAA (0,10)			
	BA (0,50)			

*Material subcultivado de culturas já pré-estabelecidas.

De acordo com as Tabelas 1-1 e 1-2 é possível inferir que a contaminação microbiana constituiu o único factor de dificuldade na micropropagação de *Pelargonium graveolens*. Esta dificuldade poderá ser devida à profusão de pêlos epidérmicos, presentes na superfície foliar, onde se poderão alojar maiores quantidades de microorganismos. No caso das três espécies de Lamiaceae aqui

estudadas (*S. sclarea*, *S. officinalis* cv "purpurascens" e *R. officinalis*) os maiores problemas estão na oxidação induzida pelos fenóis libertos pelos explantes para o meio de cultura que podem comprometer a sua micropropagação. Das três espécies de Lamiaceae, a mais eficazmente estabelecida foi *S. officinalis* cv "purpurascens", com taxas de proliferação de 72% dos explantes, e a menos eficazmente estabelecida foi *S. sclarea* com apenas 25% dos explantes a manifestarem proliferação de plantas. Porém, dado o baixo número de repetições efectuadas, não é possível concluir que a micropropagação deste espécie tenha sido um insucesso.

A Figura 1-5 ilustra algumas das experiências em que não se obteve desenvolvimento satisfatório dos explantes.



Figura 1-5: Cultura de tecidos vegetais: (a) segmento foliar de *S. sclarea* oxidado em meio MS suplementado com 1,00 mg/L de BA, (b) segmentos nodais de *R. officinalis* em meio MS suplementado com 0,50 mg/L de BA e (c) segmentos nodais de *S. officinalis* cv "purpurascens" em meio MS suplementado com 1,00 mg/L de ZEA.

A necrose por oxidação dos explantes e culturas, ocorre como consequência da libertação de compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina, pelo tecido danificado ou senescente, que produz elevado teor destes componentes (George e Sherington, 1984). Esses compostos fenólicos são oxidados por enzimas polifenol oxidases, produzindo substâncias tóxicas e inibindo o crescimento dos explantes, para além de escurecer o meio de cultura (Zigiotto, 2007). A elevada capacidade de produção de compostos fenólicos de diversas espécies da família Lamiaceae, designadamente dos géneros *Salvia* e *Rosmarinus* é bem conhecida (Zgórka e Głowniak, 2001; Santos-Gomes *et al*, 2002; Santos-Gomes *et al*, 2003).

A fenolização dos explantes foi mais intensa nas culturas submetidas a intensidades de luz mais elevadas. Por exemplo, sob intensidades de luz PAR de 70-90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ocorreu oxidação de todos os explantes de *R. officinalis* cultivados em

meio MS suplementado com 0,50 mg/L de BA (Tabela 1-1). Estes resultados mostram que as condições ambientais, designadamente a intensidade da luz, influenciam as taxas de fenolização e de organogénese *in vitro*. Normalmente, as salas de ambiente controlado para culturas *in vitro* são mantidas à temperatura ambiente em torno de 25° C e, nalguns casos, os protocolos de regeneração passam pelo estabelecimento das culturas em condições de obscuridade, sobretudo para evitar a oxidação dos explantes nessa fase. O aumento da produção de compostos fenólicos por efeito da luz deve-se ao facto de algumas das enzimas-chave da respectiva via metabólica resultarem da expressão de genes cujos promotores são activados ou estimulados pela luz, como é o caso do gene que codifica para a fenilalanina amonia liase. A luz afecta a morfogénese através de um processo mediado por fotoreceptores como o fitocromo (Peres, 2002).

Uma das possibilidades técnicas para reduzir os problemas com a oxidação é a lavagem em água corrente dos explantes, antes da sua desinfecção, de modo a auxiliar a lixiviação dos compostos fenólicos (Zigiotto, 2007). Esta técnica foi aplicada no caso de *R. officinalis*, a espécie mais afectada pelo processo de oxidação. As porções vegetais antes de serem micropropagadas eram sempre colocadas em água corrente por um período de 45 minutos.

A contaminação microbiana dos explantes e respectivos meios de cultura, responsável por parte das dificuldades no estabelecimento das culturas é muitas vezes causada pela presença de fungos e bactérias endógenas (Zigiotto, 2007). Tais microorganismos podem permanecer latentes no interior das células e/ou espaços intercelulares dos tecidos ou vasos condutores ficando protegidos dos agentes químicos utilizados nas técnicas de desinfecção dos explantes e manifestando-se frequentemente nas primeiras semanas de cultivo (Zigiotto, 2007). Na Figura 1-6 é possível observar um exemplo desse tipo de contaminação verificada em inóculos de *P. graveolens* em meio MS suplementado com 0,50 mg/L de BA e 0,10 mg/L de NAA.

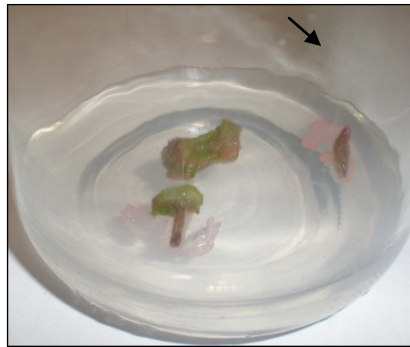


Figura 1-6: Contaminação em explantes de *P. graveolens*.

Na maior parte das vezes, as técnicas de assepsia têm como objectivo otimizar as condições de cultura para a micropropagação de espécies vegetais de interesse comercial, em larga escala e a baixo custo. No entanto, mesmo adoptando as boas práticas e princípios básicos das técnicas de cultura *in vitro* e testando empiricamente diversos parâmetros, muitas vezes não se consegue obter a organogénese *in vitro* (Peres, 2002). Em virtude das respostas dadas pelas espécies e pelos problemas técnicos enfrentados no decorrer deste trabalho, esta fase experimental foi a mais difícil de ultrapassar.

2- Germinação de sementes de *Salvia sclarea*

O estudo da germinação de sementes *in vitro* tem como objectivo a produção de explantes juvenis e assépticos, disponíveis para o estabelecimento de protocolos de diversos sistemas de cultura *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais. Este método é uma alternativa quando o estabelecimento de culturas a partir de material vegetativo apresenta problemas de oxidação e contaminação, difíceis de ultrapassar pelos métodos convencionais (Rosal, 2004).

Na avaliação da germinação de sementes de *S. sclarea*, 30 dias após sua inoculação em meio $\frac{1}{2}$ MS, não se observou nenhum sinal de reacção das mesmas em qualquer das condições testadas (presença e ausência de luz), nem, tão pouco, contaminações microbianas (Figura 2-1). Estes resultados podem ser devidos a inviabilidade ou dormência das sementes.

O estabelecimento de culturas de *Salvia* sp. a partir de plântulas obtidas por germinação de sementes em assépsia tem sido descrita por alguns autores (Santos-Gomes *et al*, 2002; Mišić *et al*, 2006 e Makunga e van Staden, 2008). O desconhecimento das razões que levam ao insucesso como o verificado neste caso, tornam difícil o manuseamento das plantas e causam prejuízos (Menezes *et al*, 2004). A pequena quantidade de material disponível não permitiu que se fizessem repetições com novas condições e uma segunda tentativa de germinação das sementes *in vitro*, utilizando os mesmos procedimentos foi igualmente infrutífera.

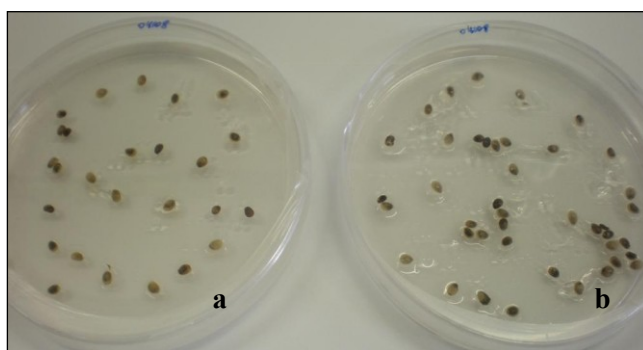


Figura 2-1: Sementes de *S. sclarea* micropropagadas em meio ½ MS sólido, 30 dias depois da inoculação, mantidas na presença (a) e ausência (b) de luz.

3- Efeito do tipo de explante na micropropagação de *Pelargonium graveolens*

Nesta fase da experiência, procurou-se conhecer as respostas dadas por diferentes tipos de explantes (segmentos foliares, segmentos nodais, segmentos internodais, segmentos peciolares) de *P. graveolens* quando colocados nas mesmas condições de cultura. Os resultados obtidos após 8 semanas de crescimento em meio sólido estão descritos na Tabela 3-1.

Tabela 3-1: Comparação das respostas obtidas a partir de cada tipo de explante de *Pelargonium graveolens* em meio MS suplementado com 0,50 mg/L de BA e 0,10 mg/L de NAA.

<i>Tipo de explante</i>	<i>Número médio de rebentos caulinares por explante</i>	<i>Plântulas (%)</i>	<i>Oxidação (%)</i>	<i>Contaminação (%)</i>
Segmentos foliares	1,55	43	19	38
Segmentos internodais	1,17	86	14	0
Segmentos nodais	2,30	57	4	38
Segmentos peciolares	2,00	13	33	54

Como se pode constatar, as respostas quanto ao tipo de segmento utilizado foram variáveis. Os segmentos nodais foram os que proporcionaram maior número de plântulas (86%), mas o número médio de rebentos caulinares formados por explante foi mais elevada nos segmentos nodais e peciolares, 2,3 e 2,0, respectivamente. A taxa de sucesso na regeneração de plântulas, a partir de segmentos peciolares foi, porém, muito baixa (13%). A partir de discos foliares de *P. capitatum* foram obtidas taxas de 11,4 rebentos caulinares por explante (Hassanein e Dorion, 2005) ao passo que a partir de segmentos peciolares e segmentos foliares de *P. x hortorum* foram obtidas taxas de 57 e 43 rebentos caulinares por explante, respectivamente (Agarwal e Ranu, 2000). Os resultados obtidos por estes autores são concordantes com os obtidos neste trabalho com *P. graveolens* no que respeita à tendência de os segmentos peciolares proporcionarem taxas de indução de novos rebentos caulinares superiores aos segmentos foliares (Tabela 3-1). De acordo com alguns autores, a informação disponível sobre a organogênese e regeneração de *Pelargonium*, utilizando explantes maduros, é ainda escassa o que justifica a necessidade de se realizar mais estudos *in vitro* nos quais sejam manipuladas variáveis em número mais elevado do as que têm sido referidas na literatura (Hassanein e Dorion, 2005).

No decorrer das experiências com *P. graveolens* foi possível também registrar a formação de estruturas radiculares nos rebentos caulinares desenvolvidos, o que permitiu encarar a possibilidade de realização da aclimatização das respectivas plântulas obtidas *in vitro* por regeneração adventícia.

3.1- Micropropagação de *Pelargonium graveolens* através de raízes

Nas primeiras semanas que se seguiram à inoculação de porções de raízes, foram observadas algumas oxidações por fenolização e contaminações microbianas em alguns dos frascos. Noutros frascos verificou-se alguma morfogénese a partir de algumas regiões das raízes inoculadas semelhante a primórdios caulinares. A rapidez com que tal organogénese se desenvolveu cerca de 2 e 3 semanas, levou ao prosseguimento da experiência a fim se esclarecer se se tratava de organogénese ou de embriogénese somática. De forma concisa, a embriogénese somática é definida pela formação de embriões a partir de tecidos somáticos que culminam na formação de uma planta inteira a partir de uma única célula (Zimmerman, 1993) e a organogénese é o processo pelo qual, tecidos vegetais são induzidos à diferenciação a partir de uma ou mais células (Burrit e Leung, 1996; Peres, 2002). Quando células meristemáticas se formam directamente a partir de células do explante primário e desses meristemas adventícios se desenvolvem rebentos caulinares sem que haja qualquer fase intermédia de desenvolvimento desorganizado (*callus*), o processo é chamado organogénese directa (Peres, 2002). Havendo formação de rebentos caulinares a partir de meristemas induzidos em *calli*, o processo é denominado organogénese indirecta (Peres, 2002). Como a organogénese pode envolver a regeneração de gemas a partir de grupos de células meristemáticas, há casos em que é difícil determinar se o processo de regeneração está ligado à organogénese ou embriogénese (Peres, 2002).

Observações efectuadas com recurso a um microscópio óptico e a uma lupa binocular estereoscópica (Figura 3-1) não foram concludentes quanto à identificação dos diferentes estádios de embriogénese somática descritos na literatura: i) pró-embrião, ii) globular, iii) cordiforme, iv) torpedo, v) cotiledonar e vi) plântula. Como a embriogénese somática envolve a formação de plantas completas a partir de uma única célula, as tentativas de confirmação de embriogénese somática levaram a que se cultivasse tais agregados em tubos de cultura com meio MS isento de qualquer suplementação hormonal.

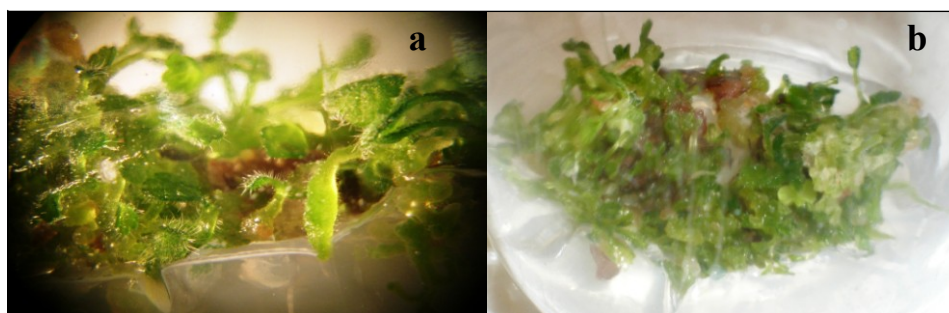


Figura 3-1: Desenvolvimento de rebentos na cultura de raízes de *P. graveolens*, (a) observação com lupa binocular e (b) observação à vista desarmada.

Como resposta, foram obtidos rebentos caulinares sem rizogênese aparente, pelo que se concluiu que a morfogênese observada a partir das porções de raízes inoculadas no meio de cultura não se devia a indução de embriogênese somática (estruturas com dois meristemas, caulinar e radicular) mas antes à indução de meristemas adventícios únicos, cujo desenvolvimento unipolar caracteriza o processo organogênico (Figura 3-2).



Figura 3-2: Rebentos caulinares de *P. graveolens* em desenvolvimento a partir de meristemas adventícios induzidos em porções de raízes cultivadas em meio MS isento de fito-reguladores.

4- Aclimatização de *Pelargonium graveolens*

Após o estabelecimento de *P. graveolens* em meio de cultura *in vitro* como plântulas completas, a etapa subsequente e final de micropropagação para fins comerciais consiste da aclimatização das plantas. A Figura 4-1 mostra as etapas do processo de aclimatização durante as primeiras semanas.

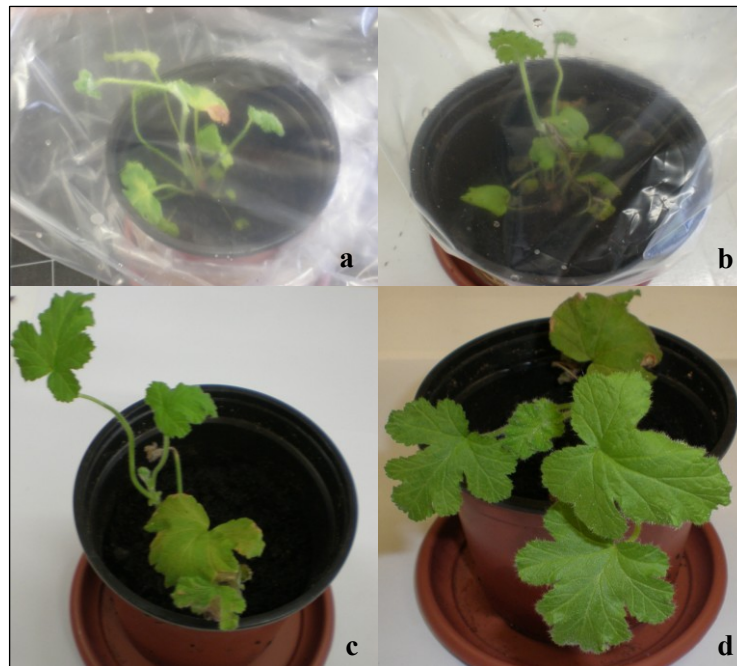


Figura 4-1: Plantas micropropagadas de *Pelargonium graveolens* em processo de aclimatização: (a) 1ª semana, (b) 2ª semana, (c) 3ª semana, (d) 4ª semana.

Esta espécie respondeu muito bem ao processo de transferência das plântulas *in vitro* para condições *ex vitro* e respectiva aclimatização em vaso, nas condições ambientais do Laboratório de Biologia e Biotecnologia Vegetal da UM em que os vasos foram mantidos, com uma taxa de sucesso da ordem dos 75%. Durante o processo de aclimatização, nas duas primeiras semanas, para que fossem mantidas condições de máxima humidade, os vasos ficaram envoltos por plástico transparente, simulando estufins individuais para protecção da planta. No decorrer deste período eram feitos furos no plástico de forma a permitir gradualmente, maior circulação de ar e menor taxa de humidade na atmosfera envolvente da parte aérea da planta. No final da segunda semana, os plásticos foram removidos por completo e as plantas

sujeitas as condições ambientais do Laboratório de Biologia Vegetal. *Pelargonium graveolens* teve um rápido estabelecimento *in vitro* e foi a única espécie entre as estudadas em que houve rizogênese e aclimatização no curto espaço de tempo que durou a realização deste trabalho, à semelhança aliás, do que já tinha sido conseguido por outros autores (Hassanein and Dorion, 2005).

5 - Transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes*

No ensaio efectuado para o estabelecimento de um protocolo de transformação de *P. graveolens* não se observou resposta a não ser a fenolização progressiva e, posteriormente, a contaminação dos segmentos peciolares utilizados como explantes, para este efeito (Figura 5-1). Quando os explantes foram transferidos para as placas de Petri com meio MS contendo o antibiótico “Ticarcillin” ainda não havia sinais nem de desenvolvimento de raízes, nem de degeneração dos explantes. Passadas cerca de duas semanas apareceram contaminações dos explantes. As contaminações eram originadas nos próprios explantes e não no meio, pois as bactérias apareciam inicialmente na superfíceis dos segmentos peciolares.



Figura 5-1: Explantes contaminados de *Pelargonium graveolens* submetidos ao protocolo de infecção por *A. rhizogenes*.

Contudo, um único explante mostrou indícios de formação de um primórdio radicular (Figura 5-2), este foi o primeiro sinal de desenvolvimento de *hairy roots*.

Deste resultado se infere que as condições deste ensaio preliminar carecem de aperfeiçoamento para que ocorra a activação dos genes de virulência, por um lado, e para eliminar do explante infectado o vector de transformação (*Agrobacterium rhizogenes*) após a sua utilização para a transferência do T-DNA. Este único indício constitui porém, um bom indicador de que é possível a transformação genética por esta via, restando para o efeito otimizar as condições de transformação. Essa optimização passa por testar outros tipos de explantes, estirpe de *Agrobacterium* utilizada como vector, os tempos de co-cultura, a eventual adição de constituintes fenólicos, tipo siringona, acetossiringona ou compostos análogos, conhecidos pelo seu papel na indução dos genes de virulencia, titulação da bactéria, tipo, concentração e tempo de tratamento com antibiótico utilizado na eliminação de *Agrobacterium* após a sua utilização como vector de transformação.



Figura 5-2: Explante de *Pelargonium graveolens* submetido a transformação por *A. rhizogenes*, com 1^{os} indícios de formação de *hairy roots*.

A transformação genética mediada por *Agrobacterium* sp. constitui um processo integrado que envolve uma escolha criteriosa de muitas variáveis, as quais têm de ser definidas individualmente para cada sistema vegetal (Amoah *et al*, 2001). Algumas publicações têm descrito apenas aspectos metodológicos de transferência de genes envolvendo *Agrobacterium*, como vector da transformação, ressaltando porém, que o processo pode ser difícil e moroso (Oriniakova *et al*, 1999). De acordo com Dahleen e colaboradores (2001) um dado protocolo de transformação mediado por *Agrobacterium* sp. pode, em algumas experiências, resultar vários transformantes e noutras falhar completamente, dada a variabilidade no que respeita à susceptibilidade das plantas à infecção por este tipo de vector.

A variabilidade no que respeita à susceptibilidade à infecção por *Agrobacterium* sp. ocorreu também com *Humulus lupulus* L. cuja taxa de

transformação se revelou nalguns trabalhos, aquém do esperado (Castro, 2004). Os protocolos de transformação mediada por *Agrobacterium* sp. estão entre os mais simples e baratos, requerendo paciência e cuidados de manipulação durante todo o processo. Devido ao tempo limitado para a execução deste trabalho, não foi possível realizar novas experiências ou repetições para obtenção de transformantes sendo, porém, perceptível que é possível transformar esta espécie por esta via, tal como aliás tem sido referido por outros autores (Bi *et al*, 1999 e Saxena *et al*, 2007).

6- Estudo da composição dos óleos essenciais produzidos por plantas *in vivo* e culturas *in vitro*

Neste domínio foram atingidos importantes objectivos, designadamente: (i) - caracterização dos óleos essenciais (OE) produzidos pelas quatro espécies de plantas aromáticas e medicinais (PAM), alvo deste trabalho, dando contributo para a definição de marcadores químicos para controlo de qualidade dos OE destas espécies; ii) - determinação do perfil dos OE produzidos por culturas *in vitro* das quatro espécies, daqui resultando dados inéditos, uma vez que não se encontrou nada descrito na literatura sobre produção de OE em culturas *in vitro* de algumas. Com este trabalho foram também adquiridas competências no domínio das técnicas de isolamento e técnicas analíticas de metabolitos secundários, designadamente constituintes dos óleos essenciais, assim como da sua produção biotecnológica por culturas *in vitro* com monitorização analítica da produção à escala micro e nano. Tais competências são importantes em qualquer instituição que se dedique à aromaterapia ou à produção de OE para aromaterapia, ou outras aplicações em que o controlo de qualidade deste tipo de matéria prima, ou produto, seja uma exigência. Nesta perspectiva, as competências desenvolvidas não têm apenas a haver com o domínio das técnicas analíticas dos óleos essenciais, mas também com conhecimento de quatro dos óleos essenciais mais frequentemente utilizados em aromaterapia, pelas suas propriedades ansiolíticas e preventivas e/ou curativas de doenças neurodegenerativas.

6.1) Isolamento dos óleos essenciais e determinação dos respectivos rendimentos

A quantidade de biomassa disponível dos órgãos cujos óleos essenciais foram estudados (folhas e flores e de plantas *in vivo* e folhas de plântulas *in vitro*) era insuficiente para a determinação, por leitura directa da quantidade de óleo isolado no aparelho de tipo Clevenger utilizado no seu isolamento. Por esse motivo, não é possível apresentar neste trabalho os respectivos rendimentos expressos em volume de OE por unidade de biomassa. Porém, dado que foi utilizado um volume conhecido e constante de uma solução de 5- α -colestano, na concentração de 1,0 mg/ml, em hexano, para captura dos constituintes dos OE, é possível uma aproximação aos teores absolutos de cada um dos componentes na biomassa, recorrendo a técnicas de análise quantitativa por GC-FID e, fazendo o somatório, inferir o teor do OE na biomassa, expresso em unidades de massa de OE por unidade de biomassa processada. Esta metodologia foi aplicada às quatro espécies de PAM abrangidas por este trabalho.

6-2- Óleos essenciais de *Salvia sclarea*

As composições dos OE de folhas de plantas *in vivo* e de folhas de plântulas *in vitro* encontram-se descritas na Tabela 6-1. A composição dos OE de flores colhidas em Setembro de 2008 e Julho de 2009 estão descritas na Tabela 6-2.

A análise quantitativa do OE de folhas de plantas *in vivo* e culturas *in vitro* de *S. sclarea* revelou teores específicos, expressos em massa de OE por unidade de biomassa seca, da ordem de 0,46 mg/g em folhas de plantas *in vivo* e 0,97 mg/g em folhas de plântulas *in vitro*, ou seja, cerca de 0,05% e 0,10% (w/w) respectivamente. O grupo de compostos prevalecente nas folhas de plantas *in vivo* foram os sesquiterpenos representando cerca de 90% do OE ao passo que nas plântulas *in vitro* este grupo representava cerca de 22% do OE, pelo facto de um único composto, o fitol, diterpeno oxigenado, representar por si só, 74% do OE nas folhas destas culturas (Tabela 6-1). Este composto ocorre naturalmente como cadeia hidrocarbonada esterificada com o grupo carboxila do quarto anel pirrólico do grupo heme da clorofila (Buchanan *et al*, 2000; Vavilin e Vermaas, 2007) e a sua acumulação nas folhas das culturas *in vitro* pode reflectir a degradação fotoinduzida

deste tipo de pigmentos fotossintéticos dada a elevada intensidade luminosa a que estavam sujeitas na sala de ambiente controlado onde se desenvolveram (Tabela 2.1 na seção II).

Os constituintes maioritários presentes no OE de folhas de plantas *in vivo* de *S. sclarea* foram, por ordem decrescente, o germacreno D (51%), *E*-cariofileno (12%), γ -gurjuneno (10%), α -copaeno (6%) e δ -elemeno (3%). Nas folhas de plântulas *in vitro* os dois sesquiterpenos maioritários foram o germacreno D (15%) e *E*-cariofileno (3%). A predominância do germacreno D face a outros constituintes dos OE das folhas desta espécie tinha já sido observada por outros autores (Carrubba *et al.*, 2002).

Tabela 6-1: Composição dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de folhas de plantas *in vivo* e plântulas *in vitro* de *Salvia sclarea*.

Compostos	IK GC*	IK GC MS*	Folhas de plantas in vivo		Folhas de plântulas in vitro (0,50 mg/L ZEA + 0,04 mg/L GA ₃ + 0,02 mg/L NAA)	
			Quantidade $\mu\text{g/g}$ peso seco	(%)**	Quantidade $\mu\text{g/g}$ peso seco	(%)**
			mircenol	992	992	0,5 \pm 0,05
<i>E</i> - β -ocimeno	1052	1049	1,1 \pm 0,26	0,3	-	-
γ -terpineno	1060	1062	4,6 \pm 1,35	1,0	-	-
ni	1266	1205	1,3	0,2	-	-
ni	1272	1294	1,0	0,2	-	-
ni	1325	1329	1,1 \pm 0,25	0,3	6,2 \pm 0,17	0,6
δ -elemeno	1335	1339	14,3 \pm 3,14	3,1	7,0 \pm 0,32	0,7
α -cubebeno	1348	1351	1,1 \pm 0,24	0,2	-	-
α -copaeno	1372	1377	27,4 \pm 5,54	6,0	3,8 \pm 0,04	0,4
β -cubebeno	1386	1390	4,7 \pm 1,60	1,3	-	-
β -elemeno	1388	1392	8,1 \pm 1,95	1,7	-	-
<i>E</i> -cariofileno	1412	1419	57,3 \pm 11,95	12,5	32,6 \pm 0,05	3,4
Germacreno D isom #1	1423	1430	4,3 \pm 0,94	0,9	3,6 \pm 1,28	0,4
ni	1439	1445	1,6 \pm 0,36	0,4	-	-
ni	1447	1454	4,1 \pm 0,85	0,9	-	-
Germacreno D	1475	1481	233,0 \pm 48,31	50,7	146,9 \pm 0,74	15,2

ni	1490	1496	47,0 ± 9,43	10,3	-	-
γ-cadineno	1510	1515	1,2 ± 0,20	0,3	-	-
δ-cadineno	1519	1524	12,0 ± 2,3	2,6	13,5 ± 0,69	1,4
espatulenol	1571	1578	5,7 ± 1,12	1,2	-	-
óxido de cariofileno	1575	1583	3,8 ± 1,0	0,8	-	-
ni	1650	1656	3,5 ± 0,73	0,8	-	-
ni	1780	1783	-	-	3,6 ± 0,83	0,4
ni	1866	1870	1,0 ± 0,06	0,2	-	-
ni	1870	1881	5,2 ± 1,22	1,1	8,6 ± 5,72	0,9
ni	1949	1960	7,2 ± 1,31	1,6	- -	-
ni	1960	1964	8,5 ± 1,07	2,0	24,2 ± 5,72	2,5
fitol	2108	2112	-	-	715,3 ± 3,06	74,1
Total			460,3 ± 95,2	100,0	965,2 ± 13,34	100,0
% identificação				93,2		96,1
Compostos agrupados						
Monoterpenos hidrocarbonetos			6,1 ± 1,36	1,4	-	-
Sesquiterpenos hidrocarbonetos			411,5 ± 85,85	89,9	213,5 ± 3,29	22,1
Sesquiterpenos oxigenados			9,5 ± 2,12	2,1	-	-
Diterpeno			-	-	715,3 ± 3,06	74,1
Outros			33,2 ± 5,9	6,5	36,4 ± 6,99	3,8

ni - composto não identificado

*Índices de Kóvats determinados em relação à série de *n* alcanos

**Percentagem relativa do composto no total da amostra

A relativa simplicidade de composição do OE de folhas de plântulas *in vitro*, pode ser explicado pela pequena quantidade de material disponível para a hidrodestilação (0,42g de plântulas em peso fresco), conforme descrito na Tabela 4-1, seção II. Em tais situações, alguns compostos podem ficar abaixo do limiar de detecção e outros podem não ser identificados pelo facto de as diferenças de sinal/ruído serem muito pequenas, o que dificulta a interpretação dos espectros de massa.

As flores de *S. sclarea* apresentam teores de OE bem mais elevados que os das folhas embora muito diferentes nas 2 amostragens efectuadas nos dois anos consecutivos e em meses não coincidentes: 7,7 mg/g de biomassa seca, em Setembro de 2008, e 2,2 mg/g de biomassa seca, em Julho de 2009, correspondendo a rendimentos de cerca de 0,8% e 0,2% (w/w) respectivamente (Tabela 6-2). O OE

das flores de *S. sclarea* é caracterizado pela presença de teores elevados de monoterpenil ésteres, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos. Os constituintes maioritários de cada um destes grupos foram o acetato de linalilo (28,8-45,3%), linalool (13,9-17,2%) e germacreno D (13,9-11,4%), em Set/08 e Jul/09, respectivamente (Tabela 6-2). Estes resultados estão em concordância com resultados publicados por outros autores relativamente aos óleos essenciais desta espécie (Carrubba *et al*, 2002; Pitarokili *et al*, 2002; Lorenzo *et al*, 2004 e Fraternali *et al*, 2005).

O esclareol é um diterpeno típico desta espécie (Carrubba *et al*, 2002), cuja acumulação em Setembro de 2008 era muito mais abundante do que em Julho de 2009, relação esta inversa à do acetato de linalilo e linalool (Tabela 6-2 e Figura 6-1). O facto de os teores de linalool e seu éster, acetato de linalilo, presentes nos OE das flores, serem mais elevados em Julho do que em Setembro pode estar correlacionado com o seu papel como mensageiro químico envolvido na atracção de insectos polinizadores (Harrewiijn *et al*, 2001; Tollsten e Øvstedal, 2008). O germacreno D constitui o principal sesquiterpeno nas folhas desta espécie, porém, muito mais representado nas flores (1,08 mg/g de peso seco) que nas folhas (0,2 mg/g de peso seco) (Figura 6-3).

Tabela 6-2: Composição dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de flores de *Salvia sclarea* colhidas em Setembro de 2008 e em Julho de 2009.

Compostos	IK GC*	IK GC MS*	Flores Set/2008		Flores Jul/2009	
			Quantidade µg/g peso seco	(%)**	Quantidade µg/g peso seco	(%)**
mircenol	992	992	104,2 ± 18,53	1,3	66,7 ± 9,53	3,0
α-terpineno	1017	1019	1,2 ± 0,23	tr	-	-
limoneno	1030	1032	20,9 ± 3,89	0,3	9,6 ± 1,22	0,4
Z-β-ocimeno	1039	1040	50,6 ± 8,89	0,6	19,6 ± 2,78	0,9
E-β-ocimeno	1050	1051	100,9 ± 17,20	1,3	40,2 ± 6,05	1,8
γ-terpineno	1065	1062	1,4 ± 0,28	tr	-	-
terpinoleno	1088	1090	22,6 ± 3,95	0,3	7,2 ± 1,06	0,3
linalool	1105	1101	1086,7 ± 176,12	13,9	385,2 ± 62,31	17,2
allo-ocimeno	1130	1131	4,4 ± 0,76	0,1	2,3 ± 0,38	0,1
borneol	1166	1170	1,1 ± 0,15	tr	-	-
4-terpineol	1178	1180	2,8 ± 0,62	tr	-	-

α -terpineol	1190	1192	284,8 \pm 47,41	3,6	96,4 \pm 15,25	4,3
formato de linalilo	1217	1218	28,3 \pm 4,85	0,4	10,1 \pm 1,66	0,5
Nerol ?	1232	1231	47,7 \pm 6,87	0,6	18,7 \pm 2,70	0,7
acetato de linalilol	1260	1259	2242,7 \pm 356,35	28,8	1012,3 \pm 162,49	45,3
ni	1304	1303	6,1 \pm 1,26	0,1	-	-
δ -elemeno	1335	1339	22,7 \pm 3,60	0,3	12,7 \pm 2,12	0,6
α -cubebeno	1348	1351	4,7 \pm 0,77	0,1	-	-
α -copaeno	1368	1377	106,7 \pm 17,90	1,4	36,3 \pm 5,56	1,6
acetato de geranilo	1372	1386	128,1 \pm 21,20	1,6	36,1 \pm 5,68	1,6
β -cubebeno	1380	1390	261,8 \pm 43,3	3,4	83,6 \pm 12,49	3,8
β -elemeno	1386	1392	3,6 \pm 0,65	tr	-	-
α -gurjuneno	1412	1420	78,1 \pm 12,77	1,0	33,7 \pm 5,1	1,5
<i>E</i> -cariofileno	1423	1430	20,8 \pm 3,63	0,3	8,8 \pm 1,1	0,4
β -humuleno	1439	1446	8,1 \pm 1,44	0,1	4,6 \pm 1,0	0,2
α -humuleno	1455	1455	10,6 \pm 1,88	0,1	1,6 \pm 0,6	0,1
<i>allo</i> -aromadendreno	1459	1465	3,0 \pm 0,70	tr	1,4 \pm 0,4	0,1
germacreno-D	1475	1482	1080,7 \pm 173,88	13,9	254,5 \pm 38,5	11,4
ni	1479	1486	4,8 \pm 0,31	0,1	- -	-
γ -muuroleno	1482	1488	1,7 \pm 0,16	tr	- -	-
δ -selineno	1490	1495	97,6 \pm 16,34	1,3	31,3 \pm 4,6	1,4
α -farneseno	1508	1509	16,8 \pm 2,55	0,2	- -	-
(<i>Z</i>)- γ -bisaboleno	1515	1514	1,5 \pm 0,16	tr	- -	-
δ -cadineno	1519	1525	51,1 \pm 8,56	0,7	12,7 \pm 1,9	0,6
ni	1546	1551	10,6 \pm 1,77	0,1	-	-
espatulenol	1571	1578	18,8 \pm 3,11	0,2	9,1 \pm 1,0	0,4
óxido de cariofileno	1586	1583	4,4 \pm 0,63	0,1	-	-
viridiflorol	1594	1591	10,2 \pm 1,66	0,1	-	-
ni	1633	1640	13,0 \pm 2,10	0,2	-	-
epi- α -cadinol	1637	1643	9,1 \pm 1,39	0,1	-	-
β -eudesmol	1643	1651	53,2 \pm 8,16	0,7	3,6 \pm 0,6	0,2
α -eudesmol	1646	1655	24,2 \pm 3,91	0,3	0,7 \pm 0,3	tr
α -bisabolol	1679	1687	6,5 \pm 0,96	0,1	-	-
ni	1713	1708	61,9 \pm 9,94	0,8	-	-
ni	1869	1881	-	-	6,3 \pm 0,9	0,3

ni	1949	1946	16,4 ± 2,24	0,2	2,7 ± 0,3	0,1
ni	1959	1958	14,0 ± 1,98	0,2	-	-
ni	1965	1971	44,1 ± 6,83	0,6	-	-
ni	1978	1991	49,8 ± 8,82	0,6	-	-
manool	2057	2057	88,1 ± 12,27	1,1	-	-
esclareol	2210	2220	1294,7 ± 133,18	17,1	21,5 ± 1,8	1,0
Total			7659,2 ± 1161,5	100,0	2229,7 ± 349,5	100,0
% identificação				97,2		99,6

Compostos agrupados

Monoterpenos hidrocarbonetos	306,3 ± 53,73	3,9	145,6 ± 21,02	6,6
Monoterpenos oxigenados	1375,4 ± 224,3	17,59	481,6 ± 77,56	21,5
Monoterpenil ésteres	2404,4 ± 378,33	30,82	1058,5 ± 169,83	47,4
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	1786,8 ± 290,72	22,89	481,2 ± 73,37	21,6
Sesquiterpenos oxigenados	148,4 ± 23,44	1,91	13,4 ± 1,9	0,61
Diterpenos oxigenados	1382,8 ± 145,45	18,28	21,5 ± 1,8	1,0
Outros	255,3 ± 45,52	4,61	27,9 ± 4,02	1,24

ni - composto não identificado

tr- "trace amounts"

*Índices de Kóvats determinados em relação à série de *n* alcanos

**Porcentagem relativa do composto no total da amostra

? Dúvidas de identificação

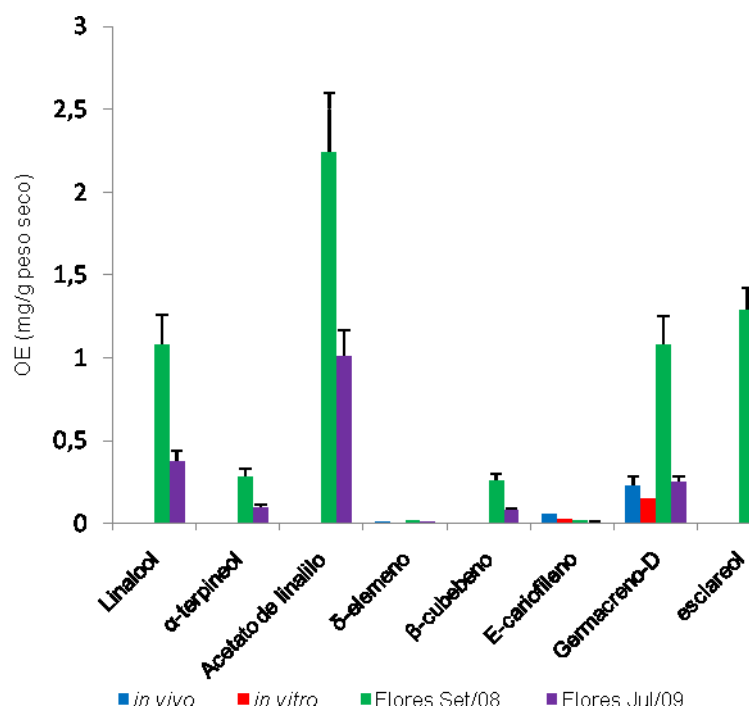


Figura 6-1: Teores dos constituintes principais obtidos a partir do OE das folhas *in vivo* e *in vitro* e das flores colhidas em Set/08 e Jul/09 de *Salvia sclarea*.

Uma observação comparativa das Tabelas 6-1 e 6-2, permite constatar a maior diversidade da composição dos OE das flores face ao OE das folhas. Enquanto que nos OE de folhas há uma prevalência de sesquiterpenos hidrocarbonetos, onde o maioritário é o germacreno D, nos OE das flores, apesar do teor específico de germacreno D ser substancialmente mais elevado que nos OE das folhas, o grupo prevaiente é o dos monoterpénoides, com destaque para o linalool e acetato de linalilo. Plantas de *S. sclarea*, cultivadas em Itália apresentaram também diferenças relevantes em termos qualitativos e quantitativos quanto aos OE das inflorescências e folhas, sendo as primeiras caracterizadas por um elevado teor de linalool (26-29%) e acetato de linalilo (35-53%) e as últimas pelo elevado teor de germacreno D (68-69%) (Carruba *et al.*, 2002).

6.3- Óleos essenciais de *Salvia officinalis* cv "purpurascens"

A análise dos OE de plantas *in vivo* de *S. officinalis* cv "purpurascens" e respectivas culturas *in vitro* mantidas em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de BA revela que as respectivas composições são dominadas pela presença de monoterpénos oxigenados, hidrocarbonetos monoterpénicos e hidrocarbonetos sesquiterpénicos (Tabela 6-3).

Tabela 6-3: Composição dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação da parte aérea de plantas *in vivo* e plântulas *in vitro* de *S. officinalis* cv "purpurascens".

Compostos	IK GC*	IK GC MS*	Parte aérea in vivo		Parte aérea in vitro (0,25BA)	
			Quantidade	(%)**	Quantidade	(%)**
			µg/g peso seco		µg/g peso seco	
triciclono	923	926	7,2 ± 0,59	0,2	0,1 ± 0,002	tr
α-tujeno	928	930	14,9 ± 1,04	0,5	2,5 ± 0,03	0,2
α-pineno	935	938	138,1 ± 9,41	4,3	3,7 ± 0,04	0,3
canfeno	950	953	158,9 ± 10,93	4,9	61,3 ± 4,09	5,7
sabineno	974	977	15,3 ± 0,99	0,5	4,5 ± 0,09	0,4
β-pineno	977	980	608,3 ± 44,60	18,9	181,6 ± 2,12	17,0

mirreno	990	992	13,2 ± 5,33	0,4	8,6 ± 0,11	0,8
<i>n</i> -decano	996	999	0,8 ± 0,01	tr	- -	-
α -terpineno	1016	1019	3,4 ± 0,89	0,1	0,04 ± 0,002	tr
<i>orto</i> -cimeno	1025	1028	17,5 ± 10,50	0,6	2,0 ± 0,02	0,2
limoneno	1032	1032	47,0 ± 6,39	1,5	27,7 ± 0,25	2,6
<i>l,8</i> -cineole	1035	1034	41,5 ± 14,82	1,3	- -	-
<i>Z</i> - β -ocimeno	1038	1040	6,7 ± 2,31	0,2	- -	-
γ -terpineno	1059	1061	7,4 ± 2,97	0,2	5,8 ± 0,04	0,6
hidrato <i>cis</i> -sabineno	1071	1070	7,9 ± 1,78	0,3	-	-
terpinoleno	1087	1090	4,2 ± 0,72	0,1	5,8 ± 0,04	0,5
acetato de terpinenil «4»	1097	1099	6,8 ± 1,09	0,2	-	-
<i>cis</i> -tujona	1103	1108	462,8 ± 36,81	14,4	43,9 ± 0,33	4,2
<i>trans</i> -tujona	1115	1119	49,2 ± 4,43	1,5	10,8 ± 0,04	1,0
ni	1129	1131	10,8 ± 8,33	0,3	-	-
cânfora	1142	1148	320,0 ± 29,27	10,0	75,6 ± 0,45	7,1
<i>trans</i> -3-pinanone	1159	1164	77,0 ± 6,37	2,40	9,0 ± 0,05	0,8
borneol	1164	1169	40,6 ± 5,81	1,27	6,3 ± 0,05	0,6
<i>cis</i> -3-pinanone	1172	1177	20,8 ± 1,80	0,65	± -	-
terpinen-4-ol	1188	1180	10,9 ± 7,50	0,33	1,0 ± 0,48	0,1
α -terpineol	1193	1192	23,3 ± 10,86	0,71	-	-
ni	1207	1204	2,4 ± 0,76	0,07	-	-
verbenona	1214	1214	2,3 ± 0,50	0,07	1,5 ± 0,02	0,1
acetato de bornilo	1283	1287	5,7 ± 0,19	0,18	26,2 ± 0,03	2,5
δ -elemeno	1333	1339	4,0 ± 3,03	0,12	0,8 ± 0,006	0,1
α -cubebeno	1347	1351	13,3 ± 0,14	0,41	2,3 ± 0,01	0,2
α -ylangeno	1368	1373	5,50 ± 0,82	0,2	-	-
α -copaeno	1376	1376	23,1 ± 4,74	0,7	2,1 ± 0,02	0,2
β -bourboneno	1379	1385	6,9 ± 3,89	0,2	-	-
β -cubebeno	1386	1390	11,3 ± 8,63	0,3	-	-
ni	1391	1395	14,1 ± 9,93	0,4	-	-
α -gurjuneno	1409	1410	11,1 ± 1,82	0,35	4,7 ± 0,03	0,4
<i>E</i> -cariofileno	1417	1420	85,0 ± 32,21	2,6	23,9 ± 0,02	2,2
ni	1429	1430	20,1 ± 15,83	0,6	2,8 ± 0,03	0,3
γ -elemeno	1438	1440	10,6 ± 4,09	0,3	- -	-
α -humuleno	1455	1455	431,9 ± 44,04	13,5	283,1 ± 0,90	26,5
<i>alo</i> -aromadendreno	1457	1462	13,3 ± 7,74	0,4	-	-
γ -Muuroleno	1479	1477	18,9 ± 12,80	0,6	16,9 ± 0,18	1,6
germacreno D	1484	1481	12,5 ± 9,53	0,4	1,1 ± 0,01	0,1
ni	1489	1494	64,9 ± 28,35	2,0	-	-
γ -cadineno	1509	1515	12,1 ± 0,34	0,4	-	-

δ -cadineo	1518	1525	98,2 \pm 8,58	3,0	11,7 \pm 0,02	1,1
ledol ?	1566	1568	17,9 \pm 7,81	0,5	13,1 \pm 0,11	1,2
espatulenol	1575	1578	10,6 \pm 0,15	0,3	-	-
viridiflorol ?	1593	1591	72,8 \pm 25,01	2,2	86,5 \pm 0,27	8,1
ni	1607	1603	17,5 \pm 9,77	0,5	12,7 \pm 0,10	1,2
ni	1614	1609	3,1 \pm 1,83	0,1	0,9 \pm 0,04	0,1
manool	2063	2055	120,4 \pm 8,54	3,7	129,2 \pm 0,046	12,1
Total			3224,3 \pm 490,03	100,0	1069,2 \pm 10,12	100,0
% identificação				96,0		98,5

Compostos agrupados

Monoterpenos hidrocarbonetos	1056,9 \pm 99,54	32,9	303,7 \pm 6,83	28,4
Monoterpenos oxigenados	1014,4 \pm 99,81	31,6	146,3 \pm 0,94	13,8
Monoterpenil ésteres	39,9 \pm 18,55	1,2	27,2 \pm 0,51	2,5
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	757,7 \pm 142,4	23,5	346,7 \pm 1,20	32,7
Sesquiterpenos oxigenados	101,2 \pm 32,97	3,1	99,6 \pm 0,38	9,3
Diterpenos	120,4 \pm 8,54	3,7	129,2 \pm 0,05	12,1
Outros	133,9 \pm 88,22	4,1	16,5 \pm 0,21	1,2

ni - composto não identificado

tr- "trace amounts"

*Índices de Kóvats determinados em relação à série de *n* alcanos

**Porcentagem relativa do composto no total da amostra

? Dúvidas na identificação

O perfil geral da composição dos OE de *S. officinalis* cv "purpurascens" não difere muito das plantas *in vivo* para as plântulas *in vitro*. Porém, as plantas *in vivo* apresentam teores de OE cerca de três vezes mais elevados (3,2 mg/g de biomassa seca) do que os das plântulas *in vitro* (1,1 mg/g de biomassa seca). Os compostos maioritários presentes nos respectivos OE e suas percentagens relativas são muito semelhantes estando as diferenças dos OE, basicamente no número total de compostos detectados e respectivos teores individuais que no caso das plantas *in vivo* são superiores aos registados no óleo das plântulas *in vitro* (Tabela 6-3 e Figura 6-2).

Os constituintes com maior representatividade nos OE das plantas *in vivo* foram β -pineno (18,9%), α -tujona (14,4%), α -humuleno (13,5%), cânfora (10,0%), canfeno (5,0%), α -pineno (4,3%), manool (3,7%), δ -cadineno (3,0%), *E*-cariofileno (2,6%) e viridiflorol (2,2%) e nos OE das plântulas *in vitro* foram α -humuleno (26,5%), β -pineno (17,0%), manool (13,1%), viridiflorol (8,1%), cânfora (7,1%), canfeno (5,7%), α -tujona (4,2%) e *E*-cariofileno (2,2). A presença predominante de β -pineno, α -tujona e cânfora no OE desta espécie foi também observada por outros

autores (Santos-Gomes e Fernandes-Ferreira, 2003, Marino *et al*, 2001). Porém, como esta planta pode ser cultivada em diferentes localidades e sob diferentes condições, é possível também encontrar resultados diferentes na análise dos constituintes dos OE de *S. officinalis*, tais como teores diferenciados de *cis* e *trans*-tujona (Avato *et al*, 2005), de 1,8-cineole e de borneol (Hayouni *et al*, 2008).

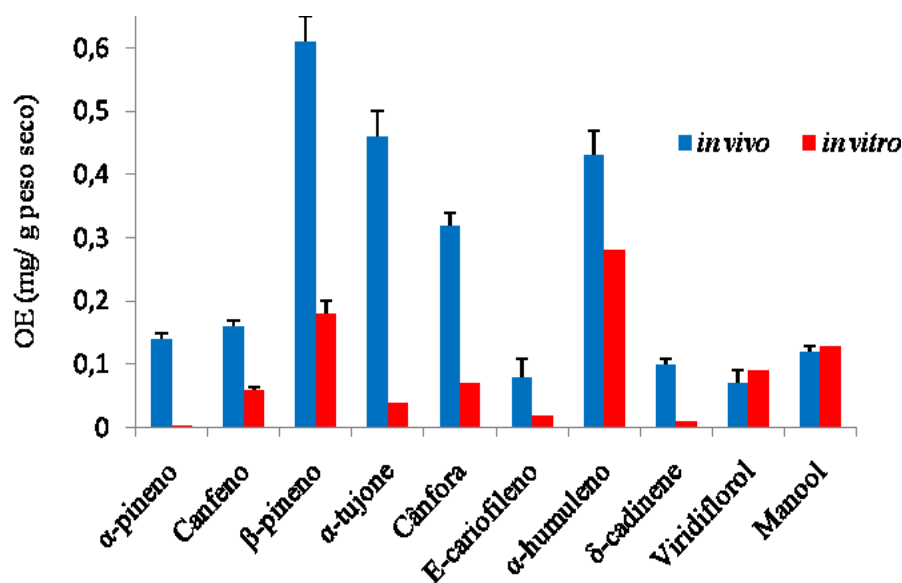


Figura 6-2: Teores dos constituintes principais obtidos a partir do OE das plantas *in vivo* e *in vitro* de *Salvia officinalis* cv "purpurascens".

Como se pode constatar pela Figura 6-2, os constituintes dos OE das plântulas *in vitro* mais representados são α-humuleno, β-pineno e manool, resultado este diferente do obtido por Santos-Gomes e Fernandes-Ferreira (2003) para plântulas de *S. officinalis* desenvolvidas em meio MS suplementado com BA cujo OE, apresentava como constituintes maioritários, a cãnfora, β-pineno e *cis*-tujona. Os OE de plantas *in vivo* de *S. officinalis* cv "purpurascens" apresentavam teores percentuais de α-humuleno (13,5%) significativamente inferiores aos dos OE de plântulas *in vitro* (26,5%), embora em valor absoluto a relação seja inversa (Figura 6-2).

6.4- Óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis*

A composição dos OE obtidos por hidrodestilação da parte aérea vegetativa e das flores de plantas *in vivo* bem como a dos OE de plântulas cultivadas *in vitro* (parte aérea) de *R. officinalis* encontra-se descrita na Tabela 6-4. O somatório dos teores específicos absolutos de todos os compostos conduz a teores de óleos essenciais de 12,5 e 5,4 mg/g de biomassa seca na folhas e flores de plantas *in vivo*, respectivamente e a teores de 2,0 mg/g de biomassa seca das plântulas *in vitro*, ou seja, cerca de 1,3%, 0,5% e 0,2% (w/w) respectivamente (Tabela 6-4).

Em qualquer das três situações, os constituintes maioritários foram α -pineno, 1,8-cineole, verbenona e cânfora. O composto prevalecente foi o α -pineno, correspondendo a 41,1%, 22,7% e 36,8%, dos OE da parte aérea vegetativa e flores das plantas *in vivo* e parte aérea das plântulas *in vitro*, respectivamente. Estes resultados, designadamente no que respeita aos constituintes maioritários, são coerentes com os obtidos por outros autores para esta mesma espécie (Baratta *et al*, 1998, Kaloustian *et al*, 2001, Flamini *et al*, 2002).

Os teores específicos absolutos de cada um dos constituintes maioritários dos OE registados nas folhas de plantas *in vivo* são acentuadamente mais elevados do que os registados nas flores e nas culturas *in vitro* com destaque para o α -pineno (Figura 6-3). É possível observar a grande diferença de teor de α -pineno muito mais elevado no OE das folhas que nos OE das flores, ou plântulas *in vitro* (Figura 6-3). O teor específico absoluto de α -pineno, nos OE das flores é praticamente semelhante ao do acetato de bornilo em torno de 0,1% (1,2 e 0,8 mg/g de peso seco, respectivamente).

Tabela 6-4: Composição dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação da parte aérea e das flores de plantas *in vivo* e da parte aérea das plântulas *in vitro* de *Rosmarinus officinalis*.

Compostos	IK GC*	IK GC- MS*	Parte aérea <i>in vivo</i>		Flores		Parte aérea <i>in vitro</i>	
			Quantidade $\mu\text{g/g}$ peso seco	(%)**	Quantidade $\mu\text{g/g}$ peso seco	(%)**	Quantidade $\mu\text{g/g}$ peso seco	(%)**
triciclono	924	926	16,8 \pm 1,68	0,1	-	-	5,4 \pm 1,03	0,3
α -tujeno	928	930	9,0 \pm 0,86	0,1	-	-	6,5 \pm 1,25	0,3
α -pineno	936	938	5120,3 \pm 520,73	41,1	1182,3 \pm 348,61	22,7	704,2 \pm 122,70	36,8
canfeno	950	953	514,7 \pm 49,37	4,1	136,9 \pm 40,65	2,6	123,6 \pm 24,15	6,4
ni	955	957	55,05 \pm 5,25	0,4	-	-	-	-
sabineno	974	977	-	-	-	-	4,1 \pm 0,79	0,2

<i>β</i> -pineno	977	980	215,7 ± 20,47	1,7	210,2 ± 64,94	4,0	55,1 ± 10,93	2,8
mirreno	991	992	517,9 ± 49,29	4,2	70,3 ± 21,43	1,3	44,8 ± 9,03	2,3
<i>α</i> -felandreno	1005	1005	41,5 ± 3,99	0,3	-	-	4,2 ± 0,80	0,2
<i>α</i> -terpineno	1016	1019	98,9 ± 9,46	0,8	25,6 ± 8,06	0,5	12,4 ± 2,46	0,6
<i>para</i> -cimeno	1025	1027	166,9 ± 15,47	1,3	13,5 ± 4,0	0,3	14,3 ± 2,87	0,7
limoneno	1029	1031	580,0 ± 53,78	4,7	81,3 ± 25,01	1,5	64,6 ± 13,33	3,3
1,8-cineole	1032	1034	1284,0 ± 123,15	10,3	356,8 ± 108,93	6,8	133,2 ± 26,57	6,8
<i>Z-β</i> -ocimeno	1039	1040	26,6 ± 2,33	0,2	-	-	12,6 ± 2,67	0,6
<i>E-β</i> -ocimeno	1052	1044	3,7 ± 0,42	tr	-	-	-	-
<i>γ</i> -terpineno	1059	1054	256,6 ± 24,42	2,1	101,8 ± 31,49	1,9	44,9 ± 9,22	2,3
nopol ?	1065	1059	9,42 ± 0,93	0,1	-	-	-	-
hidrato cis-sabineno	1071	1070	1,6 ± 0,15	tr	33,6 ± 10,52	0,6	6,7 ± 1,37	0,3
terpinoleno	1087	1090	179,5 ± 17,13	1,4	10,4 ± 4,13	0,27	19,0 ± 3,95	1,0
linalool	1100	1100	237,0 ± 22,23	1,9	32,9 ± 13,14	0,68	0,9 ± 0,25	0,1
<i>cis</i> -thujona	1113	1123	4,3 ± 0,39	tr	-	-	-	-
<i>α</i> -canfolenal	1122	1128	5,5 ± 0,50	tr	-	-	-	-
ni	1125	1130	26,0 ± 3,14	0,2	-	-	-	-
cânfora	1147	1148	761,8 ± 72,64	6,1	454,8 ± 139,73	8,64	214,4 ± 43,24	10,9
<i>trans</i> -3-pinanona	1160	1163	15,9 ± 1,63	0,1	-	-	-	-
pinocarvona?	1162	1165	20,5 ± 2,05	0,2	-	-	-	-
borneol	1165	1168	138,2 ± 14,11	1,1	34,0 ± 25,88	0,41	47,7 ± 9,96	2,4
ni	1169	1170	13,7 ± 2,25	0,1	-	-	-	-
<i>cis</i> -3-pinanona	1172	1176	104,0 ± 10,51	0,8	110,8 ± ±33,94	2,11	-	-
terpinen-4-ol	1176	1178	137,7 ± 13,10	1,1	96,7 ± 29,91	1,83	23,5 ± 4,41	1,2
<i>α</i> -terpineol	1190	1191	177,0 ± 17,11	1,4	4,6 ± 1,21	0,09	16,4 ± 3,52	0,8
ni	1204	1204	-	-	62,3 - 19,57	1,18	- -	-
verbenona	1208	1211	1000,1 ± 95,08	8,0	449,5 ± 138,03	8,54	88,5 ± 18,78	4,5
ni	1236	1238	26,7 ± 2,42	0,21	-	-	-	-
ni	1241	1244	32,8 ± 2,77	0,26	-	-	-	-
ni	1249	1246	10,1 ± 1,32	0,08	9,8 ± 5,16	0,25	-	-
geraniol	1260	1256	141,8 ± 13,38	1,14	-	-	-	-
eucarvone ?	1271	1275	6,3 ± 0,78	0,05	3,8 ± 0,73	0,08	-	-
acetato de bornilo	1284	1286	340,4 ± 32,33	2,73	842,3 ± 261,10	16,0	205,9 ± 65,21	9,3
timol	1291	1293	6,9 ± 0,67	0,1	-	-	-	-
ni	1332	1330	-	-	4,3 - 1,06	0,1	-	-
<i>δ</i> -elemeno	1339	1344	5,7 ± 0,40	0,1	-	-	-	-
ni	1363	1353	6,2 ± 0,57	0,1	-	-	-	-
ni	1368	1365	44,7 ± 3,86	0,4	43,6 ± 19,56	0,8	-	-
ni	1375	1372	-	-	16,6 ± 5,51	0,3	-	-
<i>β</i> -elemeno	1393	1392	-	-	-	-	1,7 ± 0,39	0,1
ni	1395	1384	21,1 ± 1,78	0,2	-	-	-	-
<i>E</i> -cariofileno	1411	1418	48,1 ± 4,45	0,4	153,0 ± 49,67	2,9	20,1 ± 4,53	1,0
<i>α</i> -humuleno	1453	1453	9,9 ± 0,91	0,1	23,0 ± 15,38	0,3	3,7 ± 0,82	0,2
ni	1511	1514	-	-	15,7 ± 9,85	0,2	-	-

óxido de cariofileno	1585	1583	-	-	10,5 ± 6,09	0,2	-	-		
ni	1653	1651	-	-	8,2 ± 2,90	0,2	-	-		
ni	1738	1740	-	-	-	-	4,4 ± 0,96	0,2		
ni	1784	1782	-	-	12,8 ± 7,50	0,2	-	-		
ni	1885	1889	-	-	15,7 ± 8,74	0,2	-	-		
ni	1937	1939	-	-	16,8 ± 4,49	0,3	-	-		
ni	2053	2055	-	-	23,6 ± 7,95	0,4	-	-		
abietratieno	2059	2068	-	-	5,5 ± 0,53	0,1	4,0	0,88		
ni	2181	2181	-	-	23,4 ± 11,01	0,4	-	-		
ni	2269	2288	-	-	133,6 ± 45,28	2,5	-	-		
ni	2330	2327	-	-	336,3 ± 191,95	5,0	16,6 ± 17,50	3,8		
ni	2571	2559	-	-	96,3 ± 68,32	1,2	-	-		
ni	2717	2719	-	-	155,1 ± 81,32	2,4	-	-		
Total		12458,3	± 1220,9	100,0	5418,0	± 1873,5	100,0	1965,2	± 404,1	100,0
% identificação				98,8			84,3			95,9

Compostos agrupados

Monoterpenos hidrocarbonetos	7749,7	± 769,52	62,1	1865,8	± 558,84	35,7	1122,2	± 206,55	58,3
Monoterpenos oxigenados	4014,6	± 384,5	32,2	1540,1	± 490,77	29,1	524,6	± 106,73	26,8
Monoterpenil ésteres	340,4	± 32,33	2,7	842,3	± 261,10	15,9	205,9	± 65,21	9,3
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	63,4	± 5,76	0,5	186,4	± 71,14	3,3	25,6	± 5,75	1,3
Outros	290,2	± 28,79	2,4	983,3	± 491,65	15,9	86,9	± 19,86	4,3

ni - composto não identificado

tr- "trace amounts"

*Índices de Kóvats determinados em relação à série de *n* alcanos

**Percentagem relativa do composto no total da amostra

? Dúvidas na identificação

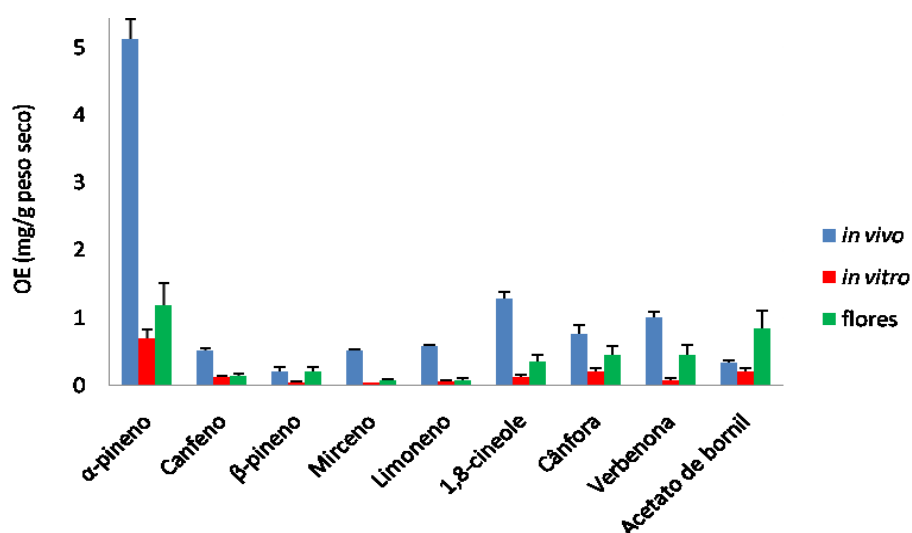


Figura 6-3: Teores dos constituintes principais obtidos a partir do OE das plântulas *in vivo*, *in vitro* e das flores de *Rosmarinus officinalis*.

6.5- Óleos essenciais de *Pelargonium graveolens*

Os óleos essenciais de *P. graveolens* obtidos por hidrodestilação de folhas de plantas *in vivo* e rebentos caulinares desenvolvidos *in vitro* apresentaram um perfil muito heterogêneo, embora com grande parte dos constituintes comuns (Tabela 6-5). O somatório dos teores específicos absolutos de todos os constituintes do OE de folhas de plantas *in vivo* foi de 30,4 mg/g de biomassa seca ou seja, rendimento de OE de cerca de 3% (w/w). Estes valores são cerca de 60 vezes superiores aos do OE de rebentos caulinares desenvolvidos *in vitro* que foram de 0,5 mg/g, ou seja, cerca de 0,05% (w/w).

Tabela 6-5: Composição dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação de folhas de plantas *in vivo* e de rebentos caulinares desenvolvidos *in vitro* de *Pelargonim graveolens*.

Compostos	IK GC*	IK GC MS*	Folhas de plantas <i>in vivo</i>		Parte aérea <i>in vitro</i> (0,01NAA+0,50BA)		
			Quantidade	(%)**	Quantidade	(%)*	
			µg/g peso seco		µg/g peso seco	*	
α -pineno	936	938	2008,5 ± 447,7	6,6	8,2 ± 0,5	1,6	
canfeno	950	953	14,7 ± 6,2	tr	-	-	
β -pineno	977	981	7,0 ± 1,4	tr	-	-	
mirreno	991	992	186,9 ± 145,9	0,5	5,5 ± 0,3	1,1	
α -felandreno	1005	1008	1833,4 ± 412,2	6,0	27,7 ± 1,5	5,4	
α -terpineno	1017	1020	13,7 ± 2,9	0,1	6,81 ± 0,3	1,3	
orto-cimeno	1025	1028	275,2 ± 62,0	0,9	-	-	
β -felandreno	1030	1033	812,5 ± 184,8	2,7	3,5 ± 0,2	0,7	
Z- β -ocimeno	1039	1041	411,3 ± 94,8	1,3	-	-	
E- β -ocimeno	1049	1051	92,5 ± 20,8	0,3	-	-	
terpinoleno	1087	1091	29,6 ± 1,2	0,1	-	-	
ni	1130	1132	38,0 ± 7,0	0,1	0,3	0,1	0,1
mentona	1154	1159	3,4 ± 0,6	tr	-	-	
isomentona	1172	1177	18812,7 ± 4204,2	61,9	-	-	
ni	1187	1187	40,1 ± 10,1	0,1	-	-	
α -terpineol	1193	1194	1,6 ± 0,1	tr	-	-	
ni	1206	1202	6,3 ± 4,4	tr	-	-	
piperitona	1254	1260	689,7 ± 155,4	2,3	-	-	

formato de citronelilo	1275	1279	-	-	20,3 ± 0,6	4,0
ni	1317	1307	3,3 ± 1,0	tr	0,4 ± 0,3	0,1
ni	1324	1329	17,0 ± 3,9	0,1	0,9 ± 0,1	0,2
δ -elemeno	1335	1339	19,7 ± 3,9	0,1	4,3 ± 0,2	0,8
α -cubebeno	1351	1351	13,6 ± 4,0	0,1	0,9 ± 0,3	0,2
α -copaeno	1372	1376	63,2 ± 13,0	0,2	- ± -	-
β -bourboneno	1380	1385	42,7 ± 9,4	0,1	6,7 ± 0,9	1,3
β -elemeno	1387	1392	12,6 ± 2,8	0,1	4,5 ± 1,9	0,9
<i>E</i> -cariofileno	1413	1420	426,1 ± 96,2	1,4	17,0 ± 0,3	3,3
ni	1434	1430	13,8 ± 0,8	0,1	8,0 ± 0,2	1,6
α -guaieno	1439	1447	86,5 ± 18,6	0,3	140,5 ± 2,2	27,5
ni	1443	1451	63,8 ± 33,0	0,2	1,4 ± 0,02	0,3
ni	1447	1455	22,0 ± 4,9	0,1	0,4 ± 0,04	0,1
germacreno D	1483	1482	24,7 ± 17,9	0,1	19,3 ± 4,7	3,8
ni	1492	1489	-	-	3,3 ± 1,5	0,7
γ -cadineno	1515	1515	55,1 ± 12,7	0,09	-	-
δ -cadineno	1518	1526	139,8 ± 12,9	0,5	19,0 ± 0,2	3,7
butanoato de citronelilo	1527	1528	-	-	2,2 ± 0,04	0,4
ni	1552	1559	-	-	32,8 ± 0,4	6,4
ni	1560	1565	-	-	1,5 ± 0,04	0,3
tiglato de 2-fenil-etilo	1581	1589	909,7 ± 195,5	3,0	-	-
10- <i>epi</i> - γ -eudesmol	1610	1623	1824,1 ± 381,3	6,1	117,5 ± 1,3	23,0
ni	1638	1644	233,4 ± 80,1	0,9	-	-
ni	1645	1656	679,2 ± 140,6	2,3	-	-
tiglato de geranilo (?)	1702	1703	-	-	1,1 ± 0,5	0,2
ni	1718	1722	422,1 ± 84,1	1,4	6,9 ± 0,07	1,3
ni	1753	1758	-	-	36,6 ± 0,2	7,2
ni	1815	1855	-	-	1,2 ± 0,5	0,2
ni	1947	1952	-	-	12,3 ± 0,03	2,4
Total			30364,3 ± 6878,3	100,0	510,7 ± 19,5	100,0
% identificação				95,8		80,6
Compostos agrupados						
Monoterpenos hidrocarbonetos			5685,3 ± 1379,9	18,5	51,7 ± 2,7	10,1
Monoterpenos oxigenados			19507,4 ± 4360,3	64,2	-	-

Monoterpenil ésteres	-	-	22,5 ± 0,7	4,4
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	884,0 ± 191,4	2,9	212,2 ± 10,7	41,6
Sesquiterpenos oxigenados	2733,8 ± 576,8	7,5	125,4 ± 1,9	24,6
Outros	1553,8 ± 370,0	6,9	98,8 ± 3,5	19,4

ni - composto não identificado

tr - "trace amounts"

? Dúvidas de identificação

*Índices de Kóvats determinados em relação à série de *n* alcanos

**Percentagem relativa do composto no total da amostra

Os seis constituintes maioritários identificados no OE de folhas de plantas *in vivo* de *P. graveolens* são, por ordem decrescente, a isomentona (62,9%), α -pineno (6,6%), 10-epi- γ -eudesmol (6,1%), α -felandreno (6,0%), tiglato de 2-fenil-etilo (3,0%) e β -felandreno (2,7%), ao passo que no OE das plântulas *in vitro* são o α -guaiano (27,5%), 10-epi- γ -eudesmol (23,0%), α -felandreno (5,4%), formato de citronelilo (4,0%), germacreno-D (3,8%), δ -cadineno (3,7%) e *E*-cariofileno (3,3%). Do OE das plântulas *in vitro* fazem parte dois constituintes não identificados cujos teores são de 6,4% e 7,2%. Facto relevante a assinalar é a, pelo menos aparente, ausência da isomentona e do tiglato de 2-fenil-etilo no OE de plântulas *in vitro*, quando o primeiro destes compostos, por si só, representa mais de 60% do OE de folhas de plantas *in vivo* (Tabela 6-5). Por outro lado o principal constituinte do OE produzido *in vitro*, α -guaiano, é minoritário no OE obtido das plantas *in vivo*. Outra diferença a assinalar é a ausência de formato de citronelilo nos OE de plantas *in vivo*. Outras diferenças assinaláveis encontram-se nas concentrações do 10-epi- γ -eudesmol, *E*-cariofileno, germacreno D e δ -cadineno, substancialmente mais elevadas nos OE produzidos pelas plântulas *in vitro*, e nas concentrações de α -pineno e β -felandreno, substancialmente mais elevadas nos OE das plantas *in vivo*. O α -guaiano e γ -eudesmol são referidos como maioritários nos OE de alguns genótipos de plantas de *P. graveolens* do Norte da Índia (Ram *et al*, 1995). Por outro lado, a maioria dos trabalhos que descrevem os constituintes do óleo essencial de *Pelargonium* sp, demonstram uma forte presença de geraniol e citronelol (Rao *et al*, 2002; Saxena *et al*, 2007). As diferenças de composição, designadamente quanto aos teores relativos dos constituintes dos óleos essenciais de uma dada espécie de planta submetida a condições diferentes são, com frequência, atribuídas à respectiva diversidade genética (Skoula *et al*, 2000).

No caso presente deste trabalho, podemos especular que a aparente ausência de alguns constituintes do OE de plantas *in vivo* no OE de plântulas *in vitro* se deve à sua falta de detecção pelo facto de se ter utilizado pequena quantidade de material na hidrodestilação. Porém, esta hipótese dificilmente poderá explicar o inverso. A maior quantidade e maior diversidade de composição dos OE das plantas *in vivo*, pode ter explicação no efeito de uma gama mais diversificada de factores de stresse ambiental, como defendem alguns autores (Ellis, 1988; Lima *et al.*, 2003).

Neste estudo, o grupo dos monoterpenos nos OE de plantas *in vivo* é maioritário, representando cerca de 83%, ao passo que o grupo maioritário dos OE de plântulas *in vitro* é o dos sesquiterpenos, representando cerca de 66% (Tabela 6-5). Como os monoterpenos são compostos voláteis muito sensíveis às temperaturas, podem ser em parte perdidos durante a manipulação das plântulas, desde a sua retirada do meio até o início do processo, visto que as plântulas *in vitro* são muito mais sensíveis a perdas de água. De acordo com alguns autores, a composição dos OE de *Pelargonium* sp é afectada por factores ambientais, designadamente temperatura (Rajeswara *et al.*, 1996). Um estudo com *Mentha spicata* demonstrou que a quantidade de monoterpenos depende da ontogenia dos tricomas glandulares (Gershinzon *et al.*, 1989). Deste modo, a imaturidade das folhas de plântulas *in vitro* de *P. graveolens*, poderá estar na base da menor complexidade e diferenças quantitativas dos constituintes comuns do respectivo OE, face ao OE de folhas e OE de flores de plantas *in vivo*.

Mesmo se tratando de material vegetal com mesma origem, já que as plântulas *in vitro* foram obtidas de explantes retirados das mesmas plantas *in vivo* de onde foi isolado o respectivo OE, as diferenças finais em resposta às mudanças ambientais, luminosidade, humidade, fotoperíodo e suplementação hormonal, são muito evidentes. Estes resultados indicam a grande plasticidade fenotípica desta espécie. Porém, como ainda não há o conhecimento total das vias biossintéticas de *P. graveolens*, é difícil encontrar explicações mais concretas para os resultados obtidos neste trabalho.

6.6) Utilização dos óleos essenciais das espécies estudadas em aromaterapia

O aumento da procura de produtos naturais, designadamente óleos essenciais para aplicações terapêuticas justifica a relevância da investigação científica em domínios da sua caracterização química, produção biotecnológica e actividades biológicas. Uma das utilizações dos OE é em aromaterapia, uma terapia complementar que utiliza óleos essenciais para efeitos de recuperação de estados de depressão e ansiedade, perdas de memória e neuropatologias, relaxamento, redução dos níveis de stresse e alívio das tensões musculares (Thorgrimsen *et al*, 2007). Porém, esta prática é ainda encarada em termos holísticos, muito baseada em conhecimentos empíricos e os aromaterapeutas pouco exigem do controlo de qualidade dos óleos que usam.

O controlo de qualidade dos óleos essenciais utilizados nesta técnica de medicina alternativa, com base na determinação da respectiva composição, a par da determinação de efeitos farmacológicos e toxicológicos deverá passar a ser uma exigência como forma de credibilizar a aromaterapia à luz dos conceitos da medicina moderna ocidental. Este trabalho centrou-se na caracterização dos OE fazendo-se uma abordagem superficial à sua produção biotecnológica por meio de culturas *in vitro*. Não foram definidos objectivos específicos no âmbito das respectivas actividades biológicas, razão pela qual não foram realizadas experiências neste domínio. Porém, é possível agora comparar os constituintes presentes nos óleos analisados com os de OE citados na literatura por possuírem actividades sobre o sistema nervoso central.

Os efeitos antioxidantes dos OE de espécies pertencentes a família Lamiaceae (Cuvelier *et al*, 1994) é visto como uma potencial forma de prevenção das doenças degenerativas, que são aquelas que envolvem a morte celular na presença dos radicais livres (Eidi *et al*, 2006). Esta é uma característica importante que deve entrar nos critérios de escolha das espécies cujos OE são utilizados em aromaterapia com finalidade neuroprotetora.

Os OE também podem actuar como inibidores da actividade de *AchE*, uma enzima envolvida na hidrólise da acetilcolina e que leva à progressão da doença de *Alzheimer* (Dohi *et al*, 2009), doença associada ao avanço da idade é muito comum actualmente (Eidi *et al*, 2006). Vários componentes dos óleos são investigados pelo

seu efeito sobre esta enzima, *AchE*, tendo sido constatado que a maioria dos inibidores da *AchE* são terpenóides (Miyazawa e Yamafuji, 2005). Os índices IC₅₀ (concentração que determina 50% de inibição) para *AchE*, determinados para o 1,8-cineole e do α -pineno são muito baixas, 0.015 e 0.022 mg/mL, respectivamente (Dohi *et al.*, 2009). Outros autores tinham já destacado a actividade destes compostos sobre *AchE* (Orhan *et al.*, 2008). Estes dois monoterpénóides, 1,8 cineole e α -pineno, estão entre os compostos maioritários dos óleos essenciais de folhas e flores de plantas *in vivo* e plântulas *in vitro* de *R. officinalis*, estudadas neste trabalho, o que permite perspectivar a sua aplicação e acção efectiva na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas. Análises e ensaios de actividade antioxidante de OE de *R. officinalis* revelaram que os monoterpénóides 1,8- cineole, α - e β - pineno, presentes como constituintes maioritários, neutralizavam os radicais livres (Wang *et al.*, 2008). Nos OE das plantas de *R. officinalis*, estudadas no âmbito desta dissertação, o β -pineno não é composto maioritário mas, nos OE de *S. officinalis* cv "purpurascens" este composto está entre os principais constituintes .

Em muitas publicações científicas, diversas espécies do género *Salvia* são descritas como potenciadoras da memória (Perry *et al.*, 2000; Tildesley *et al.*, 2003; Eidi *et al.*, 2006). Estas conclusões resultam de experiências cientificamente conduzidas e da investigação clínica. No caso de *Salvia officinalis* a presença de teores elevados de α -tujona também está ligada a esta actividade, pois este composto actua sobre o GABA, um neurotransmissor que tem um importante papel em aspectos da memória (Johnston *et al.*, 2006). O óleo essencial de *S. officinalis* cv "purpurascens", analisado no âmbito desta dissertação, revelou níveis de α -tujona em torno de 14%.

Os OE podem também ser vistos como meio de tratamento de doenças neuropsiquiátricas que incluem o stresse, a depressão e a ansiedade. Muitas vezes as respostas neurocelulares que estão na base destes problemas são danos inflamatórios que podem até mesmo progredir para quadros mais graves (García-Bueno *et al.*, 2008). O uso da aromaterapia como um ansiolítico combinando a massagem com a absorção do óleo essencial pela pele, pode ser uma forma de combater o stresse e os danos inflamatórios causados por ele. A fragrância também é importante no efeito relaxante. Os óleos do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) têm sido investigados pelo

seu efeito na ansiedade (Moss *et al*, 2003). Compostos como linalool e acetato de linalilo foram referenciados como tendo acção ansiolítica (Elisabetsky *et al*, 1995). Por outro lado, o efeito anti-inflamatório e analgésico do linalool foi demonstrado em ensaios efectuados com ratos de laboratório, aos quais foram administradas injeções de ácido acético (Peana *e tal.*, 2003). Os OE de flores de *S. sclarea*, colhidas em Setembro de 2008 e Julho de 2009 são caracterizados pela presença de teores elevados de acetato de linalilo (28,75-45,29%) e linalool (13,91-17,22%). Estes constituintes são vistos também como bons aromatizantes, constituindo referência para a qualificação de um bom odor dos óleos essenciais (Carrubba *et al*, 2002).

Diversos autores vêm referenciando também o OE de *P. graveolens* como tendo efeito ansiolítico e antidepressivo justificando a sua aplicação em aromaterapia (Hadfield, 2001; Edge, 2003 e van der Watt *et al*, 2008). Perante os resultados das análises dos constituintes presentes nos OE das plantas utilizadas neste trabalho, em comparação com o que já vem sendo descrito na literatura, pode dizer-se que estas espécies são potenciais fontes de princípios activos para utilização alternativa em pacientes que sofrem de doenças neurodegenerativas, ou de ansiedade e/ou depressão.

IV- Considerações finais e perspectivas futuras

Com o desenvolvimento deste trabalho, pode dizer-se que o objectivo específico i.a) -“determinação da composição dos óleos essenciais das plantas *in vivo* das espécies em estudo”, foi atingido na sua quase totalidade visto que a percentagem dos constituintes identificados, na maior parte dos casos foi superior a 90%. Em termos concretos, estes valores foram de 93%, 97% e 100% no que respeita aos óleos essenciais (OE) de folhas, flores colhidas em Setembro de 2008 e flores colhidas em Julho de 2009 de *Salvia sclarea*, respectivamente; 96% no que respeita aos OE de folhas de *Salvia officinalis* cv. ‘purpurascens’; 99% e 84% no que respeita aos OE da parte aérea e flores de *Rosmarinus officinalis*, respectivamente; 96% no que respeita aos OE de *Pelargonium graveolens*. O mesmo se pode dizer no que respeita aos OE produzidos pelas culturas *in vitro* de plântulas ou rebentos caulinares (objectivo específico i.b) cujas percentagens de constituintes identificados foram de 96%, nos casos de *S. sclarea* e *R. officinalis*; 99%, em *S. officinalis* cv. ‘purpurascens’ e 81% em *P. graveolens*. O objectivo ii.a)- “definição de protocolos de micropropagação das espécies em estudo” foi também atingido, pelo menos em parte, visto que ficou demonstrado o estabelecimento e realização da micropropagação destas espécies, embora apenas uma delas (*P. graveolens*) tenha chegado à fase de aclimatização. Reconhece-se, porém que o tempo não foi suficiente para otimizar os diferentes passos dos processos de micropropagação das diferentes espécies, designadamente no que respeita à rizogénese e aclimatização das espécies de *S. sclarea*, *S. officinalis* cv “purpurascens” e *R. officinalis*. Ainda relativamente aos objectivos específicos, pode dizer-se que o objectivo ii.b)- “definição de uma estratégia de transformação genética” foi o que, por motivos circunstanciais, ficou mais aquém do esperado. Tais motivos prendem-se com o facto de só em Junho de 2009 terem ficado reunidas as condições experimentais para os primeiros ensaios de transformação, dependentes da câmara de culturas que, por acidente esteve inoperacional entre Janeiro e Maio de 2009. Registou-se, porém a indução de *hairy roots* o que significa que há razões para considerar que a estratégia delineada para a transformação é adequada, sendo, entretanto, necessário efectuar alguns acertos em diferentes etapas do processo.

Os resultados obtidos neste trabalho abrem algumas perspectivas em termos da sua aplicação no domínio do controlo de qualidade dos óleos essenciais utilizados em aromaterapia e outras aplicações no domínio da produção agro-industrial de OE. Desde logo, e considerando os objectivos gerais delineados neste trabalho, pode dizer-se que este trabalho contribui para o conhecimento mais aprofundado da composição das três espécies da família Lamiaceae e de uma espécie da família Geraniaceae em estudo (objectivo i) dado que na literatura não se encontrou listagens tão completas de compostos identificados, como as que nesta tese são apresentadas, designadamente para os génotipos aqui descritos e estudados. Como foi já referido no texto da tese, os OE destas espécies estão entre os mais utilizados em aromaterapia. Em consequência deste trabalho, e considerando o objectivo geral ii) “definição de marcadores químicos passíveis de serem utilizados em controlo de qualidade dos OE” sugere-se que, sejam considerados para essa finalidade os seguintes marcadores que a seguir se descrevem para cada uma das espécies estudadas:

Salvia sclarea

- OE de folhas: δ -elemeno, α -copaeno, *E*-cariofileno, germacreno D, δ -cadineno*
- OE de flores: linalool, α -terpineol, acetato de linalilo, β -cubebeno, germacreno-D

Salvia officinalis cv. ‘purpurascens’

- OE de folhas: β -pineno, *cis*-tujona, cânfora, α -humuleno, canfeno

Rosmarinus officinalis

- OE da parte aérea: α -pineno, limoneno, 1,8-cineole, cânfora, verbenona
- OE de flores: α -pineno, 1,8-cineole, cânfora, verbenona, acetato de bornilo

Pelargonium graveolens

- OE de folhas: α -pineno, α -felandreno, β -felandreno, isomentona, 10-*epi*- γ -eudesmol.

A utilização dos marcadores acima referidos, no controlo de qualidade dos OE dos génotipos referidos, matéria-prima habitual em preparados para utilização aromaterapêutica, embora insuficientes, contribuirão para a credibilização da aromaterapia (objectivo geral iii). Por outro lado, a aplicação de protocolos de micropropagação em explorações agro-industriais destas espécies, contribuirá para a normalização das produções de OE visto que esta técnica permite a clonagem destes

genótipos a taxas muito superiores às obtidas por processos de macropropagação, tornando também possível o recurso à robótica. Numa perspectiva horizontal, seria aconselhável que este tipo de abordagem se estendesse a outras espécies, também utilizadas em aromaterapia.

Numa perspectiva vertical, impõe-se, que: (a) se optimize os protocolos de micropropagação; (b) se desenvolva e aplique a tecnológica do DNA recombinante, como forma de produção de novos sistemas de cultura *in vitro*, como *hairy roots* e, sobretudo, culturas de rebentos caulinares e plântulas transgênicas com maior capacidade de produção de OE e de OE com perfis de composição mais valiosa, eventualmente com recursos a engenharia metabólica.

Por outro lado, e na perspectiva da contribuição para a credibilização da aromaterapia, impõe-se também que se ponham em prática abordagens experimentais, *in vitro* e *in vivo*, no sentido de determinar as actividades biológicas dos OE e seus constituintes ao nível do sistema nervoso central, bem como os respectivos mecanismos de acção.

*Enquanto o composto ni - IK 1496 (GC-MS) não estiver identificado.

V- Referências bibliográficas

- Adam, K. P., Zaap, J. (1998) Biosynthesis of the isoprene units of camomile sesquiterpenes. *Phytochemistry*. **48**: 953-959.
- Agarwal, P. K., Ranu, R. S. (2000) Regeneration of plantlets from leaf and petiole explants of *Pelargonium x hortorum*. *In vitro Cell Dev. Biol. – Plant*. **36**: 392-397.
- Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A. H., Khani, M. (2003) *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. **28**: 53-59.
- Alarcon-Aguilar, F. J., Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J. L., Aguirre-Garcia, F. (2002) Investigation on the hypo-glycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytotherapy Research*. **16**: 383-386.
- Almeida, C. F. C. B. R., Albuquerque, U. P. (2002) Check-list of the family *Lamiaceae* in Pernambuco, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **45**(3): 343-353.
- Alpizar, E., Dechamp, E., Lapeyre-Montes, F., Guilhaumon, C., Bertrand, B., Jourdan, C., Lashermes, P., Etienne, H. (2008) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. *Oxford Journals: Annals of Botany*. 12pp.
- Al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M, Sen, P. (1999) Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*. **37**: 124-130.

- Amoah, B. K., Wu, W., Sparks, C., Jones, H. D. (2001) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. *Journal of Experimental Botany*. **52** : 1135-1142.
- Andrade, G. M., Sartoretto, L. M., Brasileiro, A. C. M. (2003) Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium spp.* *Fitopatologia Brasileira*. **28**: 465-476.
- Andreasen, N. C. (2003) Admirável cérebro novo – dominar a doença mental na era do genoma. CLIMEPSI Sociedade Médico Psicológica, Lda, Lisboa, PT. 389pp.
- Antkiewicz-Michaluk, L., Lazarewicz, J. W., Patsenka, A., Kajta, M., Zieminska, E., Salinska, E., Wasik, A., Golembiowska, K., Vetulani, J. (2006) The mechanism of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines neuroprotection: the importance of free radicals scavenging properties and inhibition of glutamate-induced excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry*. **97**: 846-856.
- Arikat, N. A., Jawad, F. M., Karam, N. S., Shibli, R. A. (2004) Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturae*. **100**: 193-202.
- Avato, P., Fortunato, I. M., Ruta, C., D'Elia, R. (2005) Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Science*. **169**: 29-36.
- Baricevic, D., Bartol, T. (2000) The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus. *Pharmacology*. **5**: 143-184.
- Baricevic, D., Sosa, S., Della, L. R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., Zupancic, A. (2001) Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L.

- leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. **75**: 125-132.
- Barreiro, A. P. (2006) Produção de biomassa, rendimento e composição do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em função de reguladores vegetais. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 96pp.
- Barros, L. M. G., Viana, A. A. B., Carneiro, M. (2004) Aprendendo com as agrobactérias: das plantas transgênicas aos mecanismos de crescimento e desenvolvimento vegetal. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. **1**(32): 15-27.
- Barz, W., Ellis, B. E. (1981) Potential of plant cell cultures for pharmaceutical production. In: *Natural products as medicinal agents*. Supl. da *Planta Med. e Lloydia*. Hippokrates Verlag, pp. 471-607.
- Bi, Y. -M., Cammue, B. P. A., Goodwin, P. H., KrishnaRaj, S., Saxena, P. K. (1999) Resistance to *Botrytis cinerea* in scented geranium transformed with a gene encoding the antimicrobial protein Ace-AMP1. *Plant Cell Reports*. **18**: 835-840.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001) Production of plant secondary metabolites: A Historical Perspective. *Plant Science*. **161**: 839-851.
- Bruno, D. G. (2008) Efeito de um fitocomposto no desenvolvimento de leitões submetidos ao desafio experimental com *Salmonella typhimurium*. Dissertação de Mestrado em Nutrição e Produção Animal, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, SP, 137pp.

- Buchanan, B. B., Gruissen, W., Jones, R. L. (2000) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologists*. Rockville, Maryland, USA. pp.1251-1268
- Buckle, J. (1999) Aromatherapy in perianesthesia nursing. *Journal of PeriAnesthesia Nursing*. **14** (6): 336-344.
- Bulgakov, V. P. (2008) Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*. **26**(4): 318-324.
- Burrit, D. J., Leung, D. W. M. (1996) Organogenesis in cultured petiole explants of *Begonia x erythrophylla*: the timing and specificity of the inductive stimuli. *Journal of Experimental Botany*. **47**(297): 557-567.
- Butterworth, R. F. (1982) Neurotransmitter function in thiamine-deficiency encephalopathy. *Neurochemistry International*. **4**: 449-464.
- Cardarelli, M., Mariotti, D., Pomponi, M., Spanò, L., Capone, I., Costantino, P. (1987) *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Molecular and General Genetics*. **209**(3): 475-480.
- Carrubba, A., la Torre, R., Piccaglia, R., Marotti, M. (2002) Characterization of an Italian biotype of clary sage (*Salvia sclarea* L.) grown in a semi-arid Mediterranean environment. *Flavour and Fragrance Journal*. **17**: 191-194.
- Caruso, J. L., Callahan, J., DeChant, C., Jayasimhulu, K., Winget, G. D. (2000) Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*. *Plant Cell Reports*. **19**: 500-503.
- Casanova, E., Trillas, M. I., Moysset, L., Vainstein, A. (2005) Influence of *rol* genes in floriculture. *Biotechnology Advances*. **23**(1): 3-39.

- Castro, D. C. V. B. L. (2004) Transformação genética de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica para a introdução de resistência a fungos. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 194pp.
- Celiktas, O. Y., Bedir, E., Sukan, F. V. (2007) In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*. **101**: 1457-1464.
- Chappell, J. (1995) The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiology*. **107**: 1-6.
- Charlwood, B. V., Brown, J. T., Mouston, C., Morris, G. S., Charlwood, K. A. (1988) The accumulation of isoprenoid flavour compounds in plant cell cultures. In: *Bioflavour '87* (ed. P. Schreier). Walter de Gruyter, Berlin.
- Chawla, H.S. (Ed.). (2002) Introduction to Plant Biotechnology (second edition). Science Publishers, Inc, Enfield USA, Plymouth UK.
- Christey, M. (2001) Use of ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. **37**(6): 687-700.
- Conner, A. J., Glare, T. R., Nap, J. P. (2003) The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *The Plant Journal*. **33**: 19-46.
- Cortés, M. J. B. Aromaterapia. www.biosalud.org/archivos/noticias/4aromaterapia.pdf (Consultado a 25 de Maio de 2009).
- Cowan, M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*. **12**(4): 564-582.

- Craveiro, A. A., Fernandes, A. G., Andrade, C. H. S., Matos, F. J. A., Alencar, J. W., Machado, M. I. L. (1981) *Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste*. Fortaleza, UFC, 209pp.
- Cronquist (1981). www.lohmueller.business.t-online.de/botany/fam/l/Labiatae.htm#s (Consultado a 10 de Agosto de 2009).
- Cunha, A. C., Fernandes-Ferreira, M. (2001) Ontogenic variations in *n*-alkanes during somatic embryogenesis of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Science*. **160**: 1137-1143.
- Cuvelier, M. E., Berset, C., Richard, H. (1994) Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **42** (3): 665-669.
- Dahleen, L. S., Okubara, P. A., Blechl, A. E. (2001) Transgenic approaches to combat *Fusarium head* Blight in wheat and Barley. *Crop Science*. **41**(3): 628-637.
- Debersac, P., Heydel, J. M., Amiot, M. J., Goudonnet, H., Artur, Y., Suschetet, M., Siess, M. H. (2001) Induction of cytochrome P450 and/or detoxication enzymes by various extracts of rosemary: description of specific patterns. *Food and Chemical Toxicology*. **39**(9): 907-918.
- de Leo, V., Lanzetta, D., Cazzavacca, R., Morgante, G. (1998) Treatment of menopausal symptoms with non hormonal drug therapy. *Minerva Ginecologica*. **50**: 207-211.
- Demarne, F. E. (2002) in Gomes, P. B., Mata, V. G., Rodrigues, A. E. (2007) Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*. **41**: 50-60.

- Dohi, S., Trasaki, M., Makino, M. (2009) Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **57**: 4313-4318.
- Douglas, C. J., Halperin, W., Nester, E. W. (1982) *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plant cells. *Journal of Bacteriology*. **152** (3): 1265-1275.
- Douglas, J. M., Croteau (1995) Terpenoid Metabolism. *The Plant Cell*. **7**:1015-1026.
- Dweck, A. C. (2000) in Kintzios, S. E. (Ed.), SAGE - The Genus *Salvia*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp.1-25.
- Edge, J. (2003) A pilot study addressing the effect of aromatherapy massage on mood, anxiety and relaxation in adult mental health. *Complement Ther Nurs Midwifery*. **9**:90-7.
- Edris, A. E. (2007) Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*. **21** (4): 308-323.
- Eidi, M., Eidi, A., Bahar, M. (2006). Effects of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with the cholinergic system in rats. *Nutrition*. **22**: 321-326.
- Elisabetsky, E., Marschner, J., Souza, D. (1995) Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochemical Research*. **20**(4): 461-465.
- Ellis, B. E. (1988) Natural products from plant tissue culture. *Natural Product Reports*. 581-612.

- Elmann, A., Mordechay, S., Rindner, M., Ravid, U. (2008) Geranium essential oil inhibits nitric oxide (NO) production from activated microglial cells. 15th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Indianapolis, IN. *Neuroscience*. Poster nº 273.
- Estévez, M., Ventanas, S., Ramirez, R., Cava, R. (2005) Influence of the addition of rosemary essential oil on the volatiles pattern of porcine frankfurters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(21): 8317-8324.
- Fahim, F., Esmat, A., Fadel, H., Hassan K. (1999) Allied studies on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 50: 413-427.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., Araújo, M. E. M. (2006) The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*. 108: 31-37.
- Flamini, G., Cioni, P. L., Morelli, I., Macchia, M., Ceccarini, L. (2002) Main Agronomic-Productive Characteristics of Two Ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and Chemical Composition of Their Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 50 (12): 3512-3517.
- Fontes, R., Alçada, N. (2008) A bioquímica e a química orgânica. users.med.up.pt/ruifonte/PDFs/2008-2009/Bioquimica_e_Quimica_Organica.pdf. (Consultado a 10 de Agosto de 2009).
- Fraternale, D., Giamperi, L., Bucchini, A., Ricci, D., Epifano, F., Genovese, S., Curini, M. (2005) Composition and antifungal activity of essential oil of *Salvia sclarea* from Italy. *Chemistry of Natural Compounds*. 41(5): 604-606.

- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., Rasooli, I. (2007) Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*. **102**: 898-904.
- García-Bueno, B., Caso, J. R., Leza, J. C. (2008) Stress as a neuroinflammatory condition in brain: Damaging and protective mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. **32**: 1136–1151.
- George, E. F., Sherrington, P. D. (1984) Plant propagation by tissue culture, handbook and directory of commercial laboratories in: Zigiotto, D. C. (2007) Compostos fenólicos e atividade antioxidante em plantas *Salvia officinalis* (L) micropropagadas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Bio-ciências, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 54pp.
- George, E. F. (ed.) (1993) *Plant propagation by tissue culture*. Parte 1: The technology e Parte 2: In practice. Exegetics Limited, Edington, England.
- Gershinzon, J., Maffei, M., Croteau, R. (1989) Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). *Plant Physiol*. **89**: 1351-1357.
- Giri, A., Narasu, M. (2000) Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*. **18**: 1-22.
- Gomes, P. B., Mata, V. G., Rodrigues, A. E. (2007) Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*. **41**: 50-60.
- Grieve, M. (1996) A Modern herbal. Barnes & Noble Books. pp.681-683.
- Hadfield, N. (2001) The role of aromatherapy massage in reducing anxiety in patients with malignant brain tumours. *Int J Palliat Nurs*. **7**:279-85.

- Hallahan, D. L. (2000) Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of Labiate plants. *Advances in Botanical Research*. **31**: 77-120.
- Hamburger, M., Hostettmann, K. (1991) in Barreiro, A. P. (2006) Produção de biomassa, rendimento e composição do óleo essencial de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) em função de reguladores vegetais. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 96pp.
- Handa, T. (1992) Genetic transformation of *Antirrhinum majus* L. and inheritance of altered phenotype induced by Ri T-DNA. *Plant Science*. **81**(2): 199-206.
- Haraguchi, H., Saito, T., Okamura, N., Yagi, A. (1995) Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosemarinus officinalis*. *Planta Med.* **61**: 333-336. <http://books.google.com/books> (Consultado a 03 de Abril de 2009).
- Harrewijn P., van Oosten A. M., Piron P. G. M. (2001) *Natural Terpenoids as Messengers*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Hassanein, A., Dorion, N. (2005) Efficient plant regeneration system from leaf discs of zonal (*Pelargonium x hortorum*) and two scented (*P. capitatum* and *P. graveolens*) geraniums. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **83**: 231-240.
- Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J. Y., Mohammed, H., Hamdi, M. (2008) Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*. **125**: 242-251.
- Hazell, A. S., Todd, K. G., Butterworth, R. F. (1998) Mechanisms of neuronal cell death in Wernicke's encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*. **13**: 97-122.

- Hoeffler, C., Fleurentin, J., Mortier, F., Pelt, J. M., Guillemain, J. (1987) Comparative choleric and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of *Rosmarinus officinalis* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **19**(2): 133-143.
- Hubbert, M., Sievers, H., Lehnfeld, R., Kehrl, W. (2006) Efficacy and tolerability of a spray with *Salvia officinalis* in the treatment of acute pharyngitis - a randomised, double-blind, placebo-controlled study with adaptive design and interim analysis. *European Journal of Medical Research*. **11**: 20-26.
- Hu, Y., Wang, P. J. (1983) Meristem, shoot tip and bud culture in: Zigiotto, D. C. (2007) Compostos fenólicos e atividade antioxidante em plantas *Salvia officinalis* (L) micropropagadas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 54pp.
- Iuvone, T., De Filippis, D., Esposito, G., D'Amico, A., Izzo, A. A. (2006) The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **317**: 1143-1149.
- Johnston, G. A. R., Hanrahan, J. R., Chebib, M., Duke, R. K., Mewett, K. N. (2006) Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. *Advances in Pharmacology*. **54**: 285-316.
- Joy, P. P., Thomas, J., Mathew, S., Skaria, B. P. (2001) Medicinal Plants. *Tropical Horticulture*. **2** (eds. Bose, T. K., Kabir, J., Das, P., Joy, P. P.): 449-632.
- Joyeux, M., Roland, A., Fleurentin, J., Mortier, F., Dorfman, P. (1990) Tert-Butyl hydroperoxide induced injury isolated rat hepatocytes: a model for studying anti-hepatotoxic crude drugs. *Planta Med*. **56**: 171-174.

- Kabouche, Z., Boutachagne, N., Laggoune, S., Kabouche, A., Ait-Kaki, Z., Benlabed, K. (2005) Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *Interantional Journal of Aromatherapy*. **15**: 129-133.
- Kaloustian, J., Portugal, H., Pauli, A. M., Pastor, J. (2002) Chemical, Chromatographic, and Thermal Analysis of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Applied Polymer Science*. **83**: 747–756.
- Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., Figueiredo, A. C., Tilney, P. M., Van Zyl, R. L., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Van Vuuren, S. F. (2007) Trichomes, essential oil composition and biological activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica* Codd, two species from the Cape region of South Africa. *South African Journal of Botany*. **73**: 102-108.
- Kennedy, D. O., Pace, S., Haskell, C., Okello, E. J., Milne, A., Scholey, A. B. (2006) Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery. *Neuropsychopharmacology*. **31**: 845-852.
- Kitto, S. L. (1997) Commercial Micropropagation. *HortScience*. **32 (6)**: 1012-1014.
- Kosaka K., Yokoi T. (2003) Carnosic acid, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. *Biol Pharm Bull*. **26(11)**: 1620-1622.
- Kozai, T.; Kubota, C.; Jeong, B. R. (1997) Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **51**: 49-56
- Kuhlmann, A., Röhl, C. (2006) Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* cultures of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and their anti-inflammatory effect

- on lipopolysaccharide-activated microglia. *Pharmaceutical Biology*. **44**(6): 401-410.
- Lalli, J. Y. Y., Van Zyl, R. L., Van Vuuren, S. F., Viljoen, A. M. (2008) In vitro biological activities of South African *Pelargonium* (Geraniaceae) species. *South African Journal of Botany*. **74**: 153-157.
- Lamaison, J., Petitjean-Freytet, C., Carnat, A. (1990) Rosemarinic acid, total hydroxycinnamic derivatives and antioxidant activity of Apiaceae, Boraginaceae and Lamiceae medicinals. *Ann Pharm Fr*. **48**: 103-108.
- Lawrence, B. M. (1997) Progress in essential oils: rosemary oil. *Perfum. Flavor*. **20**(1): 47; 22(5): 71.
- Leal, P. F., Braga, M. E., Sato, D. N., Carvalho, J. E., Marques, M. O., Meireles, M. A. (2003) Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**(9): 2520-2525.
- Lima, C. F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. (2005) The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **97**: 383-389.
- Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. (2007) Drinking of *Salvia officinalis* tea increases CCL4-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*. **45**: 456-464.
- Lima, G. P. P., Zigiotto, D. C., Takaki, M. (2008) Micropropagação de *Salvia officinalis* L. com avaliação do teor de fenóis totais e atividade antioxidante. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. **10**(2): 75-82.

- Lima, H. R. P., Kaplan, M. A. C., Cruz, A. V. M. (2003) Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. *Floresta e Ambiente*. **102**: 71-77.
- Lis-Balchin, M., Deans, S. G. (1996) Antimicrobial effects of hydrophilic extracts of *Pelargonium* species (Geraniaceae). *Letters in Applied Microbiology*. **23**: 205-207.
- Lorenzo, D., Dellacassa, E., Frizzo, C. D., Serafini, L. A., Dugo, P., Moyna, P. (1999) *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) essential oils from the south of Brazil and Uruguay. *Journal of Essential Oil Research*. **11**: 27-29.
- Lorenzo, D., Paz, D., Davies, P., Villamil, J., Vila, R., Cañigueral, S., Dellacassa, E. (2004) Characterization and enantiomeric distribution of some terpenes in the essential oil of a Uruguayan biotype of *Salvia sclarea* L. *Flavour and Gragrance Journal*. **19**: 303-307.
- Mackereth, P. (1995) Aromatherapy- nice but not 'essential'. *Complementary Therapies in Nursing & Midwifery*. **1**: 4-7.
- Makunga, N. P., van Staden, J. (2008) An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. **92**: 63-72.
- Masaki, H., Sakaki, S., Atsumi, T., Sakurai, H. (1995) Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **18**: 162-166.
- Menezes, N. L., Frazin, S. M., Roversi, T., Nunes, E. P. (2004) Germinação de sementes de *Salvia splendens* sellow em diferentes temperaturas e qualidades de luz. *Revista Brasileira de Sementes*. **26**(1): 32-37.

- Meshnick, S. R., Taylor, T. E., Kamchonwongpaisan, S. (1996) Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiological Reviews*. **60**(2): 301-315.
- Metcalf, J.R., Chalk, L. (1972). *Anatomy of the Dicotyledons*. 2, Oxford: Clarendon Press.
- Meyer, A., Tempé, J., Costantino, P. (2000) Hairy root: A molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. *Plant-microbe interactions*. G. Stacey and N. T. Keen. St. Paul, APS Press: 93-139.
- Mišić, D., Grubišić, D., Konjević, R. (2006) Micropropagation of *Salvia brachyodon* through nodal explants. *Biologia Plantarum*. **50** (3): 473-476.
- Misra, P., Chaturvedi, H. C. (1984) Micropropagation of *Rosmarinus officinalis* L. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. **3**: 163-168.
- Miura, K., Kikuzaki, H., Nakatani, N. (2002) Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**: 1845-1851.
- Miyazawa, M.; Yamafuji, C. (2006) Inhibition of acetylcholinesterase activity by tea tree oil and constituent terpenoids. *Flavour Fragrance Journal*. **21**: 198-201.
- Moniz, A. L. C. A. M. G. C. (2007) Depressão e valores cronobiológicos. Tese de Doutoramento em Psicologia Clínica. Instituto de Educação e Psicologia, Universidade do Minho, 139pp.
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., Vojnov, A. A. (2006) Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*. **40**(2): 223-231.

- Moss M, Cook J, Wesnes K, Duckett P. (2003) Aromas of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. *Int J Neurosci.* **113**(1): 15-38.
- Mulder-Krieger, Th., Verpoorte, R., Svendsen, A. B., Scheffer, J. J. C. (1988) Production of Essential Oils and Flavours in Plant Cell and Tissue Cultures. A review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **13**: 85-154.
- Munné-Bosch, S., Schwarz, K., Alegre, L. (1999) Enhanced formation of alpha-tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water-stressed rosemary plants. *Plant Physiol.* **121**: 1047–1052.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* **15**: 473-498.
- Ninomiya, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Norihisa, N., Kasajima, N., Yoshino, T., Morikawa, T., Yoshikawa, M. (2004) Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **14**: 1943-1946.
- Oksman-Caldentey, K.-M., Kivelä, O., Hiltunen, R. (1991) Spontaneous shoot organogenesis and plant regeneration from hairy root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Science.* **78**(1): 129-136.
- Oluwatuyi, M., Kaatz, G. W., Gibbons, S. (2004) Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Fitochemistry.* **65**(24): 3249-3254.
- Oriniakova, P., Pavingerova, D., Matousek, J. (1999) Methodical aspects of hop (*Humulus lupulus* L.) genetic transformation. *Rost. Vyr.* **45**(5): 219-227.

- Palazón, J., Cusidó, R., Roig, C., Piñol, M. (1998) Expression of the *rolC* gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants. *Plant Cell Reports*. **17**: 384-390.
- Pannunzio, P., Hazell, A. S., Pannunzio, M., Rao, K. V., Butterworth, R. F. (2000) Thiamine deficiency results in metabolic acidosis and energy failure in cerebellar granule cells: an in vitro model for the study of cell death mechanisms in Wernicke's encephalopathy. *Journal Neuroscience Research*. (62): 286-292.
- Papageorgiou, V., Gardeli, C., Mallouchos, A., Papaioannou, M., Komaitis, M. (2008) Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis L.* and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**(16): 7254-7264.
- Patwardhan, B. (2009) Drug Discovery and Development: Traditional Medicine and Ethnopharmacology Perspectives. www.scitopics.com/Drug_Discovery_and_Development_Traditional_Medicine_and_Ethnopharmacology_Perspectives.html» (Consultado a 10 de Julho de 2009).
- Pavela, R. (2004) Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia*. **75**: 745-749.
- Peana, A. T., D'Aquila, P. S., Chessa, M. L., Moretti, M. D. L., Serra, G., Pippia, P. (2003) (-) - Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *European Journal of Pharmacology*. **460**: 37-41.
- Pellegrineschi, A., Damon, J.-P., Valtorta, N., Paillard, N., Tapfer, D. (1994) Improvement of Ornamental Characters and Fragrance Production in Lemon-scented Geranium Through Genetic Transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nat Biotech*. **12**(1): 64-68.

- Pellegrineschi, A., Davolio-Mariani, O. (1997) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of scented geranium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **47**(1): 79-86.
- Pengelly, A. (2004) in Bruno, D. G. (2008) Efeito de um fitocomposto no desenvolvimento de leitões submetidos ao desafio experimental com *Salmonella typhimurium*. Dissertação de Mestrado em Nutrição e Produção Animal - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, SP, 137pp.
- Peres, L. E. P. (2002) Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. **25**: 44-48.
- Pereira, M^a Florbela Bento Martino de Sá (1996) Caracterização química e transformação de componentes não celulósicos de algumas espécies de *Acacia* existentes em Portugal. Tese de doutoramento, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 230pp.
- Perry, N., Howes, M. J., Houghton, P., Perry, E. (2000) in Kintzios SE (Ed.), SAGE - The Genus *Salvia*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam. pp. 207-223.
- Peterson, A., Machmudah, S., Roy, B. C., Goto, M., Sasaki, M., Hirose, T. (2006) Extraction of essential oil from geranium (*Pelargonium graveolens*) with supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **81**: 167-172.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerril, R., Casanova, J. (2002) Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*. **17**: 15-19.

- Pitarokili, D., Couladis, M., Petsikos-Panayotarou, N., Tzakou, O. (2002) Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. **50**: 6688-6691.
- Price, S. (2002) Aromaterapia e as emoções: como usar óleos essenciais para equilibrar o corpo e a mente. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil. 316pp.
- Radtke, O. A., Foo, L. Y., Lu, Y. R., Kiderlen, A. E., Kolodziej, H. (2003) Evaluation of sage phenolics for their antileishmanial activity and modulatory effects on interleukin-6, interferon and tumour necrosis factor-alpha-release in RAW 264.7 cells. *Zeitschrift fur Naturforschung C. Journal of Biosciences*. **58**: 395-400.
- Rajeswara, R, Kauk, P. N., Mallavarapu, G. R., Ramesh, S. (1996) Effect of seasonal climatic changes on biomass yield and terpenoid composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species). *Biochem. System. Ecol.* **24**(7/8): 627-635.
- Ram, M., Gupta, M. M., Naqvi, A. A., Kumar, S. (1995) Commercially viable crop of geranium in northern Indian plains. *J. Med. Arom. Plant Sci.* **17**: 17-20.
- Rao, B. R. R. (2002) Biomass yield, essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium species*) as influenced by row spacings and intercropping with cornmint (*Mentha arvensis L.f. piperascens Malinv. ex Holmes*). *Industrial Crops and Products*. **16**: 133-144.
- Rao, B. R. R., Kaul, P. N., Syamasundar, K. V., Ramesh, S. (2002) Water soluble fractions of rose-scented geranium (*Pelargonium species*) essential oil. *Bioresource Technology*. **84**: 243-246.

- Rho, K. H., Han, S. H., Kim, K. S., Lee, M. S. (December 2006) Effects of aromatherapy massage on anxiety and self-esteem in Korean elderly women: a pilot study. *Int J Neurosci.* **116** (12): 1447-55.
- Rosal, L. F. (2004) Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (D.C.) Mac Leish) Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, 106pp.
- Saller, R., Buechi, S., Meyrat, R., Schmidhauser, C. (2001) Combined herbal preparation for topical treatment of *Herpes labialis*. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.* **8**: 373-382.
- Samejima, K., Kanazawa, K., Ashida, H., Danno, G. (1995) Luteolin - a strong antimutagen against dietary carcinogen, Trp-P-2, in peppermint, sage, and thyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **43**: 410-414.
- Santos-Gomes, P. C., Fernandes-Ferreira, M. (2003) Essential Oils Produced by in Vitro Shoots of Sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Agricultural Food Chemistry.* **51**: 2260-2266.
- Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Fernandes-Ferreira, M. (2002) Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science.* **162**: 981-987.
- Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Fernandes-Ferreira, M. (2003) Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal Plant Physiology.* **160**: 1025-1032.

- Santos, R. I. (2000) *in* Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. (2000) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Santa Catarina, RS, UFSC, 821pp.
- Sato, A. Y. (1999) Micropropagação e protocolo para transformação de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) via *Agrobacterium rhizogenes*. Tese doutorado. Universidade Federal de Viçosa, 90pp.
- Savelev, S. U., Okello, E. J., Perry, E. K. (2004) Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytotherapy Research*. **18**: 315-324.
- Saxena, G, Banerjee, S., Rahman, L., Mallavarapu, G. R., Sharma, S., Kumar, S. (2000) An efficient in vitro procedure for micropropagation and generation of somaclones of rose scented *Pelargonium*. *Plant Science*. **155**: 133-140.
- Saxena, G., Banerjee, S., Rahman, L., Verma, P. C., Mallavarapu, G. R., Kumar, S. (2007) Rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) generated by *Agrobacterium rhizogenes* mediated Ri-insertion for improved essential oil quality. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. **90**:215-223.
- Scortichini, M., Rossi, M. P. (1991) Preliminary in vitro evaluation of the antimicrobial activity of terpenes and terpenoids towards *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* *Journal of Applied Bacteriology*. **71**: 109-112.
- Shin, S, Lim, S. (2004) Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *Journal of Applied Microbiology*. **97**: 1289-1296.
- Simpson, M. G. (2006) *Plant Systematics*. Elsevier Academic Press Publications. 590 pp.

- Skoula, M., Abbas, J. E., Johnson, C. B. (2000) Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of *Salvia fruticosa* Mill. growing in Crete. *Biochem. Systemat. Ecol.* **28**: 551-561.
- Sotelo-Felix, J. I., Martinez-Fong, D., Muriel De la Torre, P. (2002) Protective effect of carnosol on CCl₄-induced acute liver damage in rats. *European Journal Gastroenterology Hepatology.* **14**(9): 1001-1006.
- Souza, V. C, Lorenzi, H. (2005) in Barreiro, A. P. (2006) Produção de biomassa, rendimento e composição do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em função de reguladores vegetais. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 96pp.
- Spena, A., Schmulling, T., Koncz, C., Schell, J. (1987) Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. *EMBO J.* **6**: 3891-3899.
- Street, H. E. (1977) *Plant tissue and cell culture*, 2^a ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London.
- Styles, J. L. (1997) The use of aromatherapy in hospitalized children with HIV disease. *Complementary Therapies in Nursing & Midwifery.* **3**: 16-20.
- Tappin, M. R. R., Pereira, J. F. G., Lima, L. A., Siani, A. C., Mazzei, J. L., Ramos, M. F. S. (2004) Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. *Química Nova.* **27**(2): 236-240.
- Tepfer, D. (1984) Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cellular Microbiology.* **37**: 959– 67.

- Tepfer, D. (1990) Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiologia Plantarum*. **79** (1): 140-146.
- Thorgrimsen, L., Spector, A., Wiles, A., Orrell, M. (2007) Aromaterapia para la demência. *La Biblioteca Cochrane Plus*. **3**: 13pp.
- Tollsten, L., Øvstedal, D. O. (2008) Differentiation in floral scent chemistry among populations of *Conopodium majus* (Apiaceae). *Nordic Journal of Botany*. **14**(4): 361-368.
- Tildesley, N. T. J., Kennedy, D. O., Perry, E. K., Ballard, C. G., Savelev, S., Wesnes, K. A., Scholey, A. B. (2003) *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. **75**: 669-674.
- Todorov, S., Philianos, S., Petkov, V., Harvala, C., Zamfirova, R., Olimpiou, H. (1984) Experimental pharmacological study of three species from genus *Salvia*. *Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica*. **10**: 13-20.
- Tzfira, T., Rhee, Y., Chen, MH., Kunik, T., Citovsky, V. (2000) Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: The molecules that walk through the walls. *Annual Review of Microbiology*. **54**: 187-219.
- Vavilin, D., Vermaas, W. (2007) Continuous chlorophyll degradation accompanied by chlorophyllide and phytol reutilization for chlorophyll synthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1767**: 920-929.
- Van Den Dool, H., Kratz, P. D. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*. **2**: 463-471.

- van der Watt, G., Janca, A. (2008) Aromatherapy in nursing and mental health care. *Contemporary Nurse*. **30** (1):69-75.
- van der Watt, G., Laugharne, J., Janca, A. (2008) Complementary and alternative medicine in the treatment of anxiety and depression (Editorial Review). *Current Opinion in Psychiatry*. **21**:37-42.
- Vienna, C. F., Graz, R. B., Hohenheim, R. C., Milano, D. T., Trieste, A. T., Wien, K. Z-E. (2005) Study on the assessment of plant/ herbs, plant/ herb extracts and their naturally or synthetically produced components as “additives” for use in animal production. CFT/EFSA/FEEDAP. 297pp.
- Vinterhalter, B., Ninkovic, S., Cingel, A., Vinterhalter, D. (2006) Shoot and root culture of *Hypericum perforatum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. *Biologia Plantarum*. **50**(4): 767-770.
- Vujosevic, M. e Blagojevic, J. (2004) Antimutagenic effects of extracts from sage (*Salvia officinalis*) in mammalian system in vivo. *Acta Veterinaria Hungarica*. **52**: 439-443.
- Wang, W., Wu, N., Zu, Y. G., Fu, Y. J. (2008) Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*. **108**: 1019-1022.
- www.carcer.gov/cancertopics/cam/aromatherapy (Consultado a 29 de Outubro de 2009)
- Yoo, S. S., Kook, S. H., Chin, K. B., Shim, J. H. (2005) The comparison of physical-chemical and textural properties, as well a volatile compounds, from low-fat and regular-fat sausages. *International Journal of Food Science and Technology*. **40**: 83-90.

- Zaouli, Y., Messaoud, C., Ben Salah, A., Boussaïd, M. (2005) Oil composition variability among populations in relationship with their ecological areas in Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. *Flavour and Fragrance Journal*. **20**: 512-520.
- Zeng, H. H., Tu, P. F., Zhou, K., Wang, H., Wang, B. H., Lu, J. F. (2001) Antioxidant properties of phenolic diterpenes from *Rosmarinus officinalis*. *Acta Pharmacologica Sinica*. **22**(12): 1094-1098.
- Zgórká, G., Główniak, K. (2001) Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **26**: 79-87.
- Zigiotto, D. C. (2007) Compostos fenólicos e atividade antioxidante em plantas *Salvia officinalis* (L) micropropagadas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Bio-ciências, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 54pp.
- Zimmerman, J. L. (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell*. **5**: 1411-1423.
- Zupko, I., Hohmann, J., Redei, D., Falkay, G., Janicsak, G., Mathe, I. (2001) Antioxidant activity of leaves of *Salvia species* in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. *Planta medica*. **67**: 366-368.