

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**Reguladores Vegetais e Bioestimulantes no desenvolvimento de *Salvia
officinalis* L.: avaliações fisiológicas, bioquímicas e fitoquímicas**

Juliana Aparecida Povh

**Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal**

**BOTUCATU - SP
- 2008 -**

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**Reguladores Vegetais e Bioestimulantes no desenvolvimento de *Salvia
officinalis* L.: avaliações fisiológicas, bioquímicas e fitoquímicas**

Juliana Aparecida Povh

Prof^a Dr^a Elizabeth Orika Ono

Orientadora

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal**

**BOTUCATU - SP
- 2008 -**

*“De fato, não fracassei ao tentar, cerca de 10.000 vezes desenvolver um acumulador.
Simplesmente, encontrei 10.000 maneiras que não funcionam”.*

Thomas A. Edison

DEDICO

Toda glória e a honra deste trabalho deve ser dada, antes,
à Deus, pela provisão e por todas as condições e capacitações
a mim conferidas por Ele.

À minha mãe **Jesulina da Silva Povh**, pelo amor
sempre presente e pelo exemplo de vida que é para mim.

Ao meu pai **José Povh**, pelo apoio e pelos esforços para
que eu chegasse onde estou.

Ao meu irmão, **Jayme Aparecido Povh**, pelo
incentivo, apoio e amizade.

Ao meu filho e benção, **Lucas Povh Cavali**, pela
alegria que tem sido em minha vida.

A todos os meus amigos pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que aqui chegasse, guiando-me em vários momentos difíceis no decorrer desta tese.

Aos meus pais, José Povh e Jesulina da Silva Povh, por terem me ensinado o fundamental para viver com dignidade, respeito e fé.

Ao meu irmão, Jayme Aparecido Povh, uma pessoa que admiro muito.

À Prof^ª Dr^ª Elizabeth Orika Ono, pela orientação, amizade, ajuda, sugestões e críticas na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Domingos Rodrigues, pela constante ajuda e apoio.

À Prof^ª Dr^ª Giuseppina Pace Pereira Lima, pela amizade e ajuda nas análises bioquímicas.

À Prof^ª Dr^ª Márcia Ortiz Mayo Marques, pelo apoio na realização das análises fitoquímicas dos óleos essenciais.

À Prof^ª Dr^ª Marizangela Rizzati Ávila, pela amizade e ajuda nas análises estatísticas.

À grande amiga Daniela Dias Pinto, pela constante colaboração, apoio, paciência e companheirismo que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À grande amiga Maria Olívia Gaspar Corrêa, pela amizade e ajuda durante a instalação do experimento e contribuições na discussão dos resultados.

Às amigas Mônica, Juliana, Dalva, Marta, Laila, Maria Marta, Maria Eugênia, Ivana, Melissa, Fernanda, Andréa, Vanilde, Marcibela que sempre compartilharam comigo dos bons e maus momentos.

Ao auxiliar acadêmico do Departamento de Botânica, José Eduardo Costa, pela ajuda em todas as fases do trabalho, pela amizade e pelo relacionamento de respeito.

À secretaria de Pós-graduação, pelo atendimento sempre atencioso.

À CAPES, pelo importante apoio financeiro concedido durante a realização do curso.

Enfim, a todos que, de alguma maneira, seja com seu apoio ou na condução de suas funções, facilitaram o meu trabalho.

Eu agradeço.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1- INTRODUÇÃO GERAL.....	3
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1. Descrição botânica.....	7
2.1.1. Família Lamiaceae.....	7
2.1.2. A espécie <i>Salvia officinalis</i> L.....	7
2.2. Atividades farmacológicas da <i>S. officinalis</i> L.....	8
2.3. Óleos essenciais.....	8
2.3.1. Importância econômica dos óleos essenciais.....	11
2.3.2. Óleos essenciais em <i>S. officinalis</i>	12
2.4. Atividade Antioxidante.....	14
2.4.1. Compostos fenólicos.....	17
2.4.2. Atividade antioxidante de <i>S. officinalis</i>	18
2.5. Reguladores vegetais.....	20
2.5.1. Aspectos gerais.....	20
2.5.2. Efeitos fisiológicos em plantas aromáticas e medicinais.....	22
CAPÍTULO I – Desenvolvimento de <i>Salvia officinalis</i> L. tratadas com reguladores vegetais e bioestimulantes.....	25
Resumo.....	26
Abstract.....	26
Introdução.....	27
Material e métodos.....	29
Resultados e discussão.....	31
Referências Bibliográficas.....	41
CAPÍTULO II – Reguladores e bioestimulantes vegetais no teor e composição de óleo essencial de <i>Salvia officinalis</i> L.....	45

Resumo.....	46
Abstract.....	46
Introdução.....	47
Material e métodos.....	49
Resultados e Discussão.....	52
Referências bibliográficas.....	60
CAPÍTULO III – Substâncias fenólicas e atividade antioxidante de <i>Salvia officinalis</i> L sob ação de reguladores vegetais e bioestimulantes.....	66
Resumo.....	67
Abstract.....	67
Introdução.....	68
Material e métodos.....	70
Resultados e discussão.....	75
Referências bibliográficas.....	90
3- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
4- CONCLUSÕES.....	97
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

POVH, J.A. **Reguladores vegetais e bioestimulantes no desenvolvimento de *Salvia officinalis* L.: Avaliações fisiológicas, bioquímicas e fitoquímicas.** 2008. 108p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO- Este estudo objetivou avaliar o efeito de reguladores vegetais e bioestimulantes no desenvolvimento, teor e composição de óleo essencial, teores de flavonóides e fenóis totais, atividade antioxidante e atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase de plantas de *Salvia officinalis* L. Para tanto, instalou-se experimento em casa de vegetação, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos contendo três repetições. As plantas foram tratadas com as seguintes substâncias: 1- controle (água); 2- IBA a 100 mg L⁻¹; 3- GA₃ a 70 mg L⁻¹; 4-benzilaminopurina (BAP) a 70 mg L⁻¹; 5- GA₃+cinetina+IBA - Stimulate® a 1% e 5- GA₄₊₇+N-(fenilmetil)-1-purina-6-amino - Promalin® a 100 mg L⁻¹. As avaliações fisiológicas foram realizadas em 7 coletas, pelas seguintes características: altura da planta, área foliar, massa seca de caule, folhas e da parte aérea da planta. Para as avaliações fitoquímicas, foram avaliadas a produção de massa seca da parte aérea e rendimento do óleo essencial, aos 90 e 120 D.A.E. As análises bioquímicas foram determinadas nas sete coletas, determinando-se: os teores de flavonóides e fenóis totais, atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase e atividade antioxidante (CE₅₀). Analisando-se os resultados obtidos foi possível verificar que plantas tratadas com IBA e GA₃ promoveram maiores incrementos na produtividade vegetal, principalmente, na formação da parte aérea. A produção de óleo essencial foi incrementada pela aplicação de IBA nas plantas, mas também tratamentos com GA₃ e o bioestimulante Stimulate® também influenciaram positivamente no acúmulo de óleo essencial. O maior rendimento de óleo essencial foi obtido na coleta aos 120 D.A.E. Os reguladores e bioestimulantes vegetais, assim como a época de coleta, não alteraram os componentes químicos do óleo essencial. O maior teor de fenóis e flavonóides totais foram promovidos pelo tratamento com IBA. Plantas tratadas com IBA, GA₃ e Promalin® apresentaram maior atividade antioxidante. Com relação às atividades enzimáticas, os tratamentos que apresentaram aumento na atividade da peroxidase foram a testemunha, GA₃ e BAP e na atividade da polifenoloxidase foram IBA, GA₃ e Stimulate®.

Palavras-chave: auxina, óleo essencial, fenóis totais, flavonóides, atividade antioxidante

POVH, J.A. **Plant growth regulators and biostimulants on *Salvia officinalis* L. development: Physiological, biochemical and phytochemical evaluations.** 2008. 108p. Thesis (Doctorate) – Institute of Biosciences, UNESP – São Paulo State University, Botucatu.

ABSTRACT- This study aimed at evaluating the effect of plant growth regulators and biostimulants on development, essential oil content and composition, total flavonoid and phenol levels, besides peroxidase, polyphenol oxidase and antioxidant activities in *Salvia officinalis* L plants. The experiment was carried out in a greenhouse from Department of Botany, Institute of Biosciences, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, São Paulo State, Brazil. Experimental design was completely randomized with six treatments and three replicates. Plants were subjected to the following substances: 1- control (water); 2- IBA 100 mg L⁻¹; 3- GA₃ 70 mg L⁻¹; 4- benzylaminopurine (BAP) 70 mg L⁻¹; 5- GA₃+kinetin+IBA - Stimulate® 1%, and 5- GA₄₊₇+ N-(phenylmethyl)-1H-purine-6-amine - Promalin® 100 mg L⁻¹. Physiological evaluations were performed in seven harvestings and consisted of plant height, leaf area, and dry matter of stem, leaves and shoot. As regards phytochemical evaluations, shoot dry matter and essential oil yield were assessed at 90 and 120 D.A.E. Also, the following biochemical evaluations were performed: total flavonoid and phenol levels, besides peroxidase, polyphenol oxidase and antioxidant (CE₅₀) activities. IBA- and GA₃-treated plants had higher plant productivity, mainly concerning shoot formation. IBA application led to an increase in essential oil yield, which was also positively influenced by GA₃ and Stimulate®, a biostimulant. The highest essential oil yield was detected at 120 D.A.E. Plant growth regulators, biostimulants and harvesting times did not lead to alterations in the essential oil chemical composition. IBA-treated plants presented the highest total phenol and flavonoid levels. Plants subjected to IBA, GA₃ and Promalin® had higher antioxidant activity. Considering enzymatic activities, there was an increase in peroxidases when plants were treated with GA₃ and BAP, as well as in controls, whereas polyphenol oxidase was higher in IBA-, GA₃- and Stimulate®-treated plants.

Key words: auxin, essential oil, phenol, flavonoids, antioxidant activity

1- INTRODUÇÃO

As plantas medicinais e aromáticas têm grande importância para a indústria farmacêutica e para a medicina tradicional em vários países. O gênero *Salvia* é pertencente à família Lamiaceae que se destaca por sua importância econômica, sendo suas espécies amplamente utilizadas como medicinais, condimentos, aromáticas e ornamentais (Martins et al., 1998).

Salvia officinalis L. é uma espécie medicinal e aromática originária do Sul da Europa, amplamente usada na medicina para tratamentos de vários grupos de doenças, na fabricação de cosméticos e muitas pessoas usam na preparação de alimentos. É uma planta de clima quente sem excesso de calor, desenvolvendo-se bem em solo drenado argilo-arenoso, podendo sofrer em solos úmidos. (Martins et al., 1998).

Dentre suas propriedades terapêuticas, destacam-se: a emenagoga, diaforética, germicida, antibactericida, anti-séptico, antiinflamatória, antioxidante e adstringente (Evans, 1991; Hertwig, 1991; Costa, 1994). Muito usada para combater a inflamação da cavidade bucal e da gengiva e, também, como agente gastrointestinal (Tekel'Ova, 1993). Extratos de sálvia ou óleo essencial apresentam propriedades hipotensiva, ação no sistema nervoso central e atividade antiespasmódica (Newall, 1996).

O valor comercial das plantas medicinais e aromáticas tem refletido, qualitativa e quantitativamente, na produção de seu óleo. O óleo como um produto do metabolismo da célula vegetal, sendo a composição não estável e dependente de diversos fatores que são regulados pelo metabolismo, pode sofrer alterações qualitativas de seus constituintes (Simões, 1999). Segundo Croteau et al. (1981), a acumulação do óleo essencial depende das fases de desenvolvimento da planta. A origem da folha primordial, sua expansão, total maturação e baixa senescência são importantes para a produção de óleo de valor comercial.

O óleo essencial de *S. officinalis* L. é constituído, principalmente, de monoterpenos e sesquiterpenos, sendo estes sintetizados nas células dos tricomas glandulares (peltado e captado) e armazenados no interior de uma cápsula situada no ápice deste. Este óleo pode ser obtido das folhas e das unidades florais e, tradicionalmente, extraído por arraste de vapor com rendimento variando de 0,5 a 1,1% (Duke, 2002). Os compostos constituintes do óleo já foram caracterizados em vários estudos, sendo verificado que ocorre pouca variação dos componentes majoritários: **tujona** e **cânfora**; e estes são biologicamente ativos e possuem ação tóxica e farmacológica (Duke, 2002).

Em plantas medicinais, não se deve preocupar somente com a produção quantitativa de biomassa, mas também com a riqueza dos princípios ativos contidos. Por isso, diferentes

aspectos de cultivo devem ser levados em consideração para que se possa produzir plantas medicinais em quantidades suficientes e com as qualidades necessárias. Além disso, o conhecimento da composição química de óleos essenciais tem sido utilizado em estudos de taxonomia e filogenia (Gottlieb e Salatino, 1987; Martins, 1996).

Além das propriedades terapêuticas e amplo uso na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, *S. officinalis* é uma erva muito popular que há décadas vem sendo estudada, devido os seus componentes antioxidantes. O efeito protetor exercido por esta espécie tem sido atribuído à presença de vários compostos antioxidantes, os quais se destacam os compostos fenólicos (Chipault et al., 1952; Cuvelier et al., 1996; Martins et al., 1998). Estes compostos apresentam excelente atividade “limpante” (*scavenging*) na ação do oxigênio como radical superóxido, radical hidroxila e oxigênio “singlet” (Masaki et al., 1995) e inibe a peroxidação de lipídios (Hohmann et al., 1999) e, conseqüentemente, os extratos ricos em substâncias antioxidantes tem sido amplamente utilizados para estabilização de lipídios em alimentos ricos em gorduras (Ternes e Schawarz, 1995).

Devido à variabilidade de fatores ambientais os constituintes fenólicos dos extratos obtidos de diferentes exemplares de *S. officinalis* apresentaram grande diferença na composição e, conseqüentemente, diferenças no poder oxidativo (Cuvelier et al., 1996; Areias et al., 2000).

O uso de substâncias ativas que possam aumentar o crescimento e produtividade é de grande interesse econômico. Os reguladores vegetais são amplamente usados na agricultura devido à influência positiva no aumento e na qualidade das colheitas (Nickell, 1982), sendo amplamente testados em frutos e vegetais (Audus, 1972). Porém, poucos estudos apontam a ação dessas substâncias em plantas medicinais e aromáticas, sendo estas também de grande importância econômica, principalmente em espécies produtoras de óleo essencial.

Os reguladores vegetais podem influenciar a resposta de muitos órgãos da planta, porém essa resposta depende de alguns fatores como: a espécie, parte da planta, estágio de desenvolvimento, concentração, interação entre outros reguladores e vários fatores ambientais que também estão envolvidos em processos de crescimento e desenvolvimento de um órgão ou tecido vegetal (Salisbury e Ross, 1992). A aplicação exógena de reguladores vegetais pode modificar o comportamento de uma planta, alterando sua produtividade, como o seu metabolismo secundário, aumentando ou diminuindo o teor de óleo essencial e seus constituintes (Shukla e Farooqi, 1990).

As auxinas são substâncias quimicamente relacionadas com o ácido indolil-3- acético (IAA), que promovem o crescimento das plantas, principalmente através do alongamento

celular (Taiz e Zeiger, 2006). Em plantas medicinais e aromáticas as auxinas estão relacionadas com a síntese e composição do óleo essencial.

As giberelinas estão associadas à promoção do crescimento do caule e a aplicação desse regulador vegetal à planta intacta pode induzir ao aumento significativo na sua altura. A aplicação exógena de giberelina promove o alongamento dos entrenós e associado a esse efeito, há também a diminuição na espessura do caule e no tamanho da folha, além da coloração verde clara das folhas. Apresentam pouco efeito no crescimento da raiz (Taiz e Zeiger, 2006).

As citocininas participam na regulação de muitos processos fisiológicos da planta, incluindo a divisão celular, a morfogênese da parte aérea e das raízes, a maturação dos cloroplastos, o alongamento celular e a senescência (Taiz e Zeiger, 2006). As citocininas, assim como as giberelinas, são reguladores vegetais amplamente empregados para otimizar o crescimento e o rendimento de metabólitos secundários das plantas (Shukla e Farooqi, 1990), pois estas substâncias quando aplicadas exogenamente influenciam vários aspectos do desenvolvimento e da biossíntese de importantes compostos (Wareing e Phillips, 1985).

Muitos estudos foram realizados com o ácido giberélico, pois este favorece o desenvolvimento em várias espécies vegetais por promover o alongamento celular. Em plantas aromáticas, a aplicação de giberelina sintética (GA_3) tem resultado em notável aumento dos entrenós, no acúmulo de material orgânico, aumento ou diminuição no teor de óleo essencial e alterações nos constituintes químicos do óleo (Krys'kov e Shkurat, 1961; Tronchet, 1961; Povh e Ono, 2007).

Atualmente, além do uso dos reguladores vegetais de modo isolados como substâncias ativas para a promoção do aumento da produção, produtos como os bioestimulantes estão em destaque. Os reguladores vegetais são substâncias sintéticas que aplicadas exogenamente possuem ação similar aos grupos de hormônios vegetais conhecidos, enquanto que estimulante vegetal ou bioestimulante é a mistura de reguladores vegetais ou de um ou mais reguladores com outros compostos de natureza bioquímica diferente; esse produto químico pode, em função da sua composição, concentração e proporção das substâncias, incrementar o crescimento e desenvolvimento vegetal (Castro e Vieira, 2001). A aplicação agrícola de reguladores vegetais e bioestimulantes vegetais está se tornando uma prática de grande destaque, aprimorando de forma significativa a produção de laranja 'Pêra' (Castro et al., 1998), feijão, milho, arroz e soja (Alleoni et al., 2000; Milléo et al., 2000; Vieira e Castro, 2001; Vieira e Castro, 2004; Braccini et al., 2005) e o número de bagas em videira (Tecchio, 2005), sendo os resultados obtidos até o momento com o uso dessa técnica bastante promissores (Vieira e Castro, 2004).

Alguns estudos relacionados com o uso dessas substâncias no teor e composição de óleo essencial em plantas medicinais foram realizados por Povh e Ono (2006) e esses autores observaram em plantas de *Salvia officinalis* L. que a aplicação de Stimulate® a 2% promoveu aumento no crescimento e rendimento do óleo essencial.

No Brasil são poucos os estudos sobre o efeito de diferentes reguladores vegetais e bioestimulantes, na produção de biomassa e de metabólitos secundários em plantas medicinais. Portanto, os esforços na busca de substâncias ativas que possam aumentar a produção destas espécies vegetais, visando, principalmente o aumento no crescimento e acúmulo de óleo essencial são de grande importância, principalmente, quando se considera a dependência da indústria farmacêutica nacional à importação de matéria-prima nesta área que chega a 80% (Ming, 1992).

Diante da escassez de estudos em fisiologia de plantas medicinais no Brasil o presente trabalho visou avaliar o efeito de diferentes reguladores vegetais e bioestimulantes no desenvolvimento, no teor de óleo essencial e composição de óleo essencial e na atividade antioxidante de plantas de *Salvia officinalis* L. cultivadas no Brasil.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Descrição Botânica

2.1.1- Família: Lamiaceae

A família Lamiaceae Lindley (Labiatae Juss) pertencente à subclasse Asteridae, ordem Lamiales (Cronquist, 1981) possui aproximadamente 220 gêneros e 4000 espécies de distribuição cosmopolita (Hedge, 1992). Segundo Harley (1994), no Brasil ocorrem 29 gêneros e 505 espécies dessa família. De acordo com Barroso (1986) são poucos os gêneros de nossa flora e muitos os introduzidos em nossas culturas como plantas medicinais, que são produtoras de óleos essenciais, utilizadas como condimento ou ornamentais.

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

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

2.1.2- A espécie *Salvia officinalis* L.

Salvia officinalis L., pertencente à família Lamiaceae, é originária do mediterrâneo e aclimatada na região sul do Brasil, considerada subarbusto lenhoso, as folhas inferiores são pecioladas, opostas, finamente reticuladas e levemente recobertas por fina penugem e as folhas superiores são sésseis, compostas de flores pequenas, geralmente, azuladas. É considerada uma planta aromática e com propriedades medicinais, sendo usada como condimento e na medicina doméstica (Martins et al., 1998).

Desenvolve-se bem em regiões de clima ameno como no sul do Brasil. Aprecia ser cultivada em locais que recebam bastante luz solar e cujo clima seja quente, sem excesso de calor. Em climas tropicais só se conserva viva em vasos protegidos do excesso de radiação solar. Prefere solos de terrenos bem drenados, permeáveis, argilo-arenoso, leves, ricos em matéria orgânica e nutriente, com bom suprimento inicial e periódico de nitrogênio e com uma boa exposição à luz solar, podendo sofrer em terrenos úmidos (Martins et al., 1998).

2.2- Atividades Farmacológicas da *Salvia officinalis* L.

As plantas medicinais e aromáticas têm grande importância para a indústria farmacêutica e para a medicina tradicional em vários países. *Salvia officinalis* L. é uma planta medicinal muito popular que há décadas vem sendo estudada, devido os seus componentes antioxidantes. É amplamente usada na medicina para tratamentos de vários grupos de doenças e muitas pessoas usam na preparação de alimentos (Chipault et al., 1952; Cuvelier et al., 1996).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que, aproximadamente, 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam para atendimento primário da saúde, especialmente a medicina tradicional, da qual a maior parte envolve o uso de extratos vegetais ou seus princípios ativos (Farnsworth et al., 1991).

As folhas de *Salvia officinalis* L. são muito conhecidas por suas propriedades antioxidativas (Chipault et al., 1956; Farag et al., 1989; Lamaison et al., 1990; Schwarz e Ternes, 1992; Cuvelur et al., 1994; Hohmann et al., 1999; Baricevic e Bartol, 2000). Dentre suas propriedades terapêuticas, destacam-se: a emenagoga, diaforética, germicida, anti-inflamatória, antioxidante e adstringente (Evans, 1991; Hertwig, 1991; Costa, 1994).

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

Atualmente, tem sido de grande interesse produtos naturais que possuem potencial antimicrobial para a formulação de produtos cosméticos, incluindo os óleos essenciais de *Laurus nobilis*, *Eucalyptus globulus* e *Salvia officinalis* (Maccioni et al., 2002).

2.3- Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter muitos compostos orgânicos. Seus constituintes podem pertencer às mais diversas classes de compostos, porém os terpenóides e os fenilpropanóides são as classes de compostos mais comumente encontradas. Os terpenos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos, bem como os diterpenos, constituintes minoritários dos óleos

essenciais. Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, etéreos ou simplesmente essências, são princípios ativos encontrados em várias partes das plantas (Tyler et al., 1988; Simões et al., 1999).

Os terpenos ou isoprenos são formados a partir da união de unidades isoprênicas de 5 carbonos. Estes compostos podem ser formados por diferentes rotas biossintéticas, entre elas a rota do ácido mevalônico que ocorre no citoplasma das células secretoras dos tricomas peltados. Para formar ácido mevalônico, três moléculas de acetil CoA sofrem várias reações, passando por processos de fosforilação, descarboxilação e desidratação formando isopentenil difosfato (IPP), que é a unidade básica para a formação de isoprenos. Outros isoprenos (principalmente, triterpenos e sesquiterpenos) podem também serem formados pela rota do metileritritol fosfato, que ocorre nos cloroplastos e/ou plastídeos e utilizam como precursores, intermediários da glicólise ou da redução do carbono por meio da fotossíntese (Castro et al., 2004; Taiz e Zeiger, 2006).

As unidades de IPP são encontradas, principalmente, nas plantas superiores, embora possam estar presentes em outros organismos. Muitas destas unidades ocorrem livres nos tecidos vegetais em forma de glicosídeos, éster de ácidos orgânicos ou então, combinados com proteínas. Alguns terpenos podem funcionar como metabólitos primários, atuando no desenvolvimento do vegetal, porém, a maioria atua como metabólito secundário com função repelente contra herbívoros (Castro et al., 2004; Taiz e Zeiger, 2006).

Os compostos terpênicos: monoterpenóides e sesquiterpenos são compostos por 10 e 15 carbonos, respectivamente, formando a maior parte dos componentes do óleo essencial (Judd, 1999); os óleos essenciais possuem cheiro e sabor característicos e são solúveis em solventes orgânicos apolares, como éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos, apresentando-se na forma de líquido oleoso (Akisui, 1972; Cecy, 1989). De maneira geral, são insolúveis em água, porém apresentam solubilidade suficiente para passar o seu odor à água (Costa, 1986). São importantes como matéria-prima para perfumes e medicamentos sendo também utilizados como especiarias (Claus, 1961; Costa, 1986; Cecy, 1989).

As substâncias odoríferas foram consideradas por muito tempo como “desperdício fisiológico” ou produtos de desintoxicação, como eram vistos os produtos do metabolismo secundário. Atualmente, considera-se a existência de funções ecológicas, como por exemplo, a inibição da germinação, proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra perda de água e aumento da temperatura da planta (Simões, 1999).

Os óleos essenciais desempenham funções de defesa na planta, além de exercerem alguns papéis ecológicos nas interações planta-planta, planta-fungo e planta-animal. A interação planta-animal é caracterizada, principalmente, pela função antiherbivoria que os

óleos apresentam (Gottlieb, 1985). Tal atividade é marcante nos óleos essenciais e mais de 100.000 grupos químicos já foram identificados nos vegetais (Howe e Westley, 1988).

Os óleos essenciais possuem alto índice de refração sendo a maioria óticamente ativa e possui índice de rotação específico como uma propriedade para diagnose, permitindo distinguir o produto natural do sintético (Costa, 1986; Cecy, 1989). Granero (1976), através de estudos fitoquímicos, relata os problemas encontrados durante o processo de obtenção, controle e estudo da composição de um óleo essencial, uma vez que, o mesmo está sujeito aos fenômenos de isomerização, saponificação, hidrólise ou polimerização.

Gottlieb (1984) relata que esses compostos são encontrados em diversas famílias de plantas, ocorrendo em estruturas que evoluíram de orgânulos oleíferos, células oleíferas, cavidades e canais esquizógenos e pêlos glandulares.

A produção de óleos essenciais em plantas está geralmente associada à presença de estruturas secretoras especializadas como tricomas glandulares e ductos de óleo (Venkatachalam et al., 1984). Nas Lamiaceae, o principal órgão secretor são os tricomas glandulares e o detalhe da estrutura pode variar com a espécie (Amelunxen, 1964; 1965). Através de análises em cromatografia gasosa no teor glandular de algumas Lamiaceae, pode-se avaliar a variação quantitativa e qualitativa no teor do óleo entre diferentes tipos de tricoma glandular de alguns tecidos (Henderson et al., 1970).

A produção de metabólitos secundários, no caso óleo essencial, está condicionada a diversos fatores. Segundo Correa Júnior et al. (1991), fatores de ordem genética ou endógena são os que dependem da carga genética de cada planta, sendo diferentes para cada espécie fazendo com que cada qual tenha uma composição química diferente. Fatores externos como temperatura, pluviosidade, vento, solo, latitude e altitude também interferem de forma significativa na síntese dos metabólitos secundários. Fatores técnicos, como forma de plantio, adubação, tratos culturais e época de colheita também têm sua importância, tanto na produção de biomassa como no teor de princípios ativos.

De acordo com Simões (1999), a composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento, mas as condições ambientais são capazes de causar variações significativas. Os aspectos determinantes da variabilidade são:

- **quimiotipos:** a ocorrência de quimiotipos ou raças químicas é freqüente em plantas ricas em óleos essenciais; seriam aqueles vegetais botanicamente idênticos, mas que diferem quimicamente;
- **ciclo vegetativo:** em uma determinada espécie, a concentração de cada um dos compostos do seu óleo essencial pode variar durante o desenvolvimento do vegetal;

- **fatores extrínsecos:** o ambiente no qual o vegetal se desenvolve e os tipos de cultivo também influenciam sobre a composição química dos óleos essenciais. A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem influência direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície.

2.3.1- Importância econômica dos óleos essenciais

Atualmente, na agricultura tem-se incluído além de plantas convencionais, as plantas cujos metabólitos secundários são valorizados por suas características aromáticas ou terapêuticas, ou matéria-prima natural para perfumarias e indústria química. A agroindústria tem investido em pesquisas de óleos essenciais em plantas para aumentar a qualidade do óleo (Sangwan et al., 2001).

Os óleos essenciais têm uma larga utilização nas indústrias alimentícias, de cosméticos e perfumaria e de higiene e limpeza. O Brasil importa a maior parte dos óleos essenciais que a indústria nacional desses setores utiliza, em média nos últimos anos importou-se U\$ 10,8 milhões, contra U\$ 2,2 milhões de exportações. Destaca-se neste segmento os óleos essenciais de cítricos que movimentam nesse setor, mundialmente, cerca de U\$ 900 milhões anuais somente em relação à perfumaria (Serafini e Cassel, 2001).

Os indicadores de mercado dão conta de que há uma real possibilidade para a produção nacional neste campo econômico, com vantagens em termos de custo e qualidade. Pesquisas realizadas com algumas espécies cultivadas no Brasil demonstraram que o rendimento e a qualidade dos óleos obtidos equivalem e, em alguns casos, superam o padrão mundial. A região do Mediterrâneo e Estados Unidos são os principais produtores de *Salvia officinalis* L.; no Brasil esta espécie foi aclimatada e tem sido cultivada, principalmente na região Sul (Serafini e Cassel, 2001).

Portanto, a utilização crescente nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticos tornou o cultivo de espécies aromáticas e a obtenção de óleos essenciais em importantes atividades econômicas. Embora, a utilização maior ocorra nas áreas de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas) e cosméticos (perfume e produtos de higiene), também em farmácias, as drogas vegetais ricas em óleos essenciais são empregadas *in natura* para a preparação de infusões. Ainda, muitos óleos essenciais são utilizados em função de suas propriedades terapêuticas e para a aromatização de formas farmacêuticas destinadas ao uso oral (Simões, 1999).

2.3.2- Óleos essenciais em *Salvia officinalis* L.

Salvia officinalis L. contém óleo essencial constituído, principalmente, de monoterpenos e sesquiterpenos, sendo estes sintetizados nas células dos tricomas glandulares e armazenados no interior de uma cápsula situada no ápice do tricoma glandular; é obtido das folhas e das unidades florais e, tradicionalmente, extraído por arraste de vapor com rendimento variando de 0,5 a 1,1% (Duke, 2002).

O valor comercial das plantas medicinais e aromáticas tem refletido, qualitativa e quantitativamente, na produção de seu óleo. O óleo como um produto do metabolismo da célula vegetal, sendo a composição não estável e dependente de diversos fatores que são regulados pelo metabolismo, pode sofrer alterações qualitativas de seus constituintes (Simões, 1999).

O óleo essencial de sálvia já foi caracterizado em vários estudos, sendo verificado que ocorre pouca variação dos componentes majoritários: **tujona** e **cânfora** e estes compostos constituintes do óleo essencial são biologicamente ativos e possuem ação tóxica e farmacológica (Duke, 2002). Guillen et al. (1996) descrevem como principais componentes a α -tujona, cariofileno, 1,8-cineol, α -humuleno e cânfora. Segundo Drazic e Brkic (2001), dos compostos do óleo essencial de *Salvia officinalis* pode-se destacar a α -tujona, cânfora, 1,8-cineol, α -pireno, β -pireno, β -cariofileno e α -humoleno.

Lawrence et al. (1971) e Croteau e Karp (1976) descrevem para o óleo essencial de *Salvia officinalis* L. a cânfora como o maior componente, correspondendo a cerca de 20% do óleo. A biossíntese deste monoterpeno envolve como primeiro passo, a ciclização do **geranil pirofosfato** a **bornil pirofosfato** (Croteau e Karp, 1977). O **bornil pirofosfato** é hidrolizado a **borneol** (borneol pirofosfatase), que é, subsequentemente, oxidado a **cânfora** (borneol pirofosfato sintetase) (Croteau e Karp, 1976).

Segundo Croteau et al. (1981), a acumulação do óleo essencial depende das fases de desenvolvimento da planta. A origem da folha primordia, sua expansão, total maturação e baixa senescência são importantes para a produção de óleo de valor comercial. A ontogenia também afeta a composição do óleo, em *Salvia officinalis* L. o teor de cânfora aumenta com a expansão da folha.

Guenther (1949) descreve que a alta qualidade de plantas de sálvia é uma combinação de vários fatores, como a coloração da folha (prata), teor do óleo essencial (>1,5%) e composição do óleo essencial; as plantas chegam ao máximo de produção no primeiro ano de crescimento. Putievsky et al. (1992) descrevem que a boa qualidade do óleo de sálvia deve conter alta porcentagem (>50%) de α - e β -tujonas e baixa proporção (<20%) de cânfora.

Estudos sobre a influência da variação sazonal na composição do óleo essencial em *Salvia officinalis* L. realizados por Pitarevic et al. (1984) demonstram que a produção e composição do óleo variou mês a mês, atingindo o máximo durante o verão. Entretanto, para se obter um óleo essencial de melhor qualidade, isto é, com a máxima porcentagem de tujona, recomenda-se a colheita das folhas durante o outono.

Putievsky et al. (1986) realizaram colheitas de *Salvia officinalis* L. em três diferentes épocas (primavera, verão e outono) e verificaram que o maior rendimento de óleo essencial foi obtido no verão, colhido no primeiro ano. Estes autores verificaram ainda que, a maior quantidade dos principais componentes do óleo, tujonas e cânfora, ocorreu no segundo ano após o plantio, na primavera. Enquanto que para Guenther (1949), o maior rendimento de óleo essencial de sálvia também ocorreu no verão, mas a melhor qualidade foi obtida no outono.

Alguns estudos revelam o efeito da secagem na qualidade do óleo essencial de plantas de *Salvia officinalis* L. A recomendação de temperatura para a secagem varia de 35 a 50°C (Koller, 1987; Bendl et al., 1988). Muller et al. (1992) estudaram o efeito da temperatura de secagem e a qualidade e quantidade de óleo essencial em plantas de *Salvia officinalis* L. e relatam que, com o aumento na temperatura de 30 até 90°C e tempo de secagem, resultou em redução de 99,7% à temperatura de 90°C e 120 horas, porém alguns compostos, como α -tujona, não foi significativamente alterada por temperaturas superiores a 50°C, mas em outros compostos como, pineno, canfeno e mirceno, foi observada alteração com o aumento da temperatura.

É importante ressaltar que vários estudos com *Salvia officinalis* L. cultivada no mundo todo revelam uma grande variedade na constituição química do óleo essencial que é dependente da fertilização mineral do solo (Piccaglia e Marotti, 1993), intensidade de luz (Li et al., 1996), idade do órgão (Länger et al., 1993), condições climáticas (Máthé et al., 1992), sazonalidade (Putievsky et al., 1986; Grella e Picci, 1988) e parte da planta (Perry et al., 1999). Por causa da ampla variação, os constituintes do óleo essencial de sálvia, algumas vezes, não se assemelha ao perfil padrão definido pela ISO 9909 (Bruneton, 1999) para óleo essencial oficial de *Salvia officinalis* L., que de acordo com Bruneton (1999) é: *cis*-tujona (18 a 43%), *trans*-tujona (3 a 8,5%), cânfora (4,5 a 24,5%), cineol (5,5 a 13%), humoleno (0-12%), α -pireno (1 a 6,5%), canfeno (1,5 a 7%), limoneno (0,5 a 3%), linalool (no máximo 1%) e acetado de bornila (2,5% no máximo).

Em plantas medicinais, não se deve preocupar somente com a produção quantitativa de biomassa, mas também com a riqueza dos princípios ativos contidos. Por isso, diferentes aspectos de cultivo devem ser levados em consideração para que se possam produzir plantas

medicinais em quantidades suficientes e com as qualidades necessárias. Além disso, o conhecimento da composição química de óleos essenciais tem sido utilizado em estudos de taxonomia e filogenia (Gottlieb e Salatino, 1987; Martins, 1996).

Portanto, a quantidade e a qualidade dos óleos essenciais produzidos por diferentes espécies medicinais são dependentes de diversos fatores. No entanto, Henderson et al. (1970) sugerem que esta variação, tanto na quantidade e qualidade de óleo essencial, pode estar relacionada também com o tipo de estruturas secretoras e a sua frequência. Dessa forma, muitos autores, através de diferentes técnicas de estudos estruturais, tais como microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, correlacionam à composição de óleo essencial com os sítios de produção e liberação.

2.4- Atividade Antioxidante

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (Atoui et al., 2006).

O oxigênio é uma molécula altamente reativa que pode ser reduzido para formar agentes quimicamente reativos, denominados de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), tais como radical hidroxila (OH^\cdot), ânion radical superóxido (O_2^\cdot) e hidroperoxila (ROO^\cdot) que são moléculas que ocupam um orbital atômico ou molecular sozinho, sendo conhecidas também como radicais livres. Estas formas de oxigênio são altamente prejudiciais para os constituintes celulares, incluindo o DNA, podendo oxidar os lipídios e as proteínas (Haslam, 1996; Valko et al., 2004; El-Agamey et al., 2004; Omoni e Aluko, 2005).

Os ROS atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno *bis*-alílico, iniciando assim, o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos (Haslam, 1996; Valko et al., 2004; El-Agamey et al., 2004; Omoni e Aluko, 2005).

Os hidroperóxidos formados na peroxidação lipídica têm vida curta e quando reagem com metais formam aldeídos (isto é, malonaldeído, acroleína, crotonaldeído) e epóxidos, os

quais são reativos e causam danos *de novo* ao DNA (Valko et al., 2004; El-Agamey et al., 2004; Omoni e Aluko, 2005).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides (Haslam, 1996; Valko et al., 2004; El-Agamey et al., 2004; Omoni e Aluko, 2005). Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (Atoui et al., 2006).

A vitamina E é a designação dada a um grupo de compostos antioxidantes lipossolúveis, entre os quais o α -tocoferol é a forma mais ativa. É encontrada em lipoproteínas e membranas, atuando no bloqueio da reação em cadeia da peroxidação lipídica, através do seqüestro do radical peroxila. A vitamina C tem muitas funções fisiológicas, entre elas, o alto poder antioxidante de reciclar a vitamina E no processo de peroxidação lipídica das membranas e lipoproteínas (Haslam, 1996; Valko et al., 2004; El-Agamey et al., 2004; Omoni e Aluko, 2005).

Os carotenos (CAR) protegem os lipídios dos danos peroxidativos inativando o oxigênio singlete, sem sofrer degradação, através da reação com os radicais peroxila, hidroxila e superóxido. A atividade antioxidante dos CAR é decorrente da habilidade de deslocar elétrons desemparelhados através da estrutura de ligações duplas conjugadas, sendo relatadas na literatura três propostas de mecanismos para a reação de radicais livres com CAR (Haslam, 1996; Valko et al., 2004; El-Agamey et al., 2004; Omoni e Aluko, 2005).

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que, presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podendo serem reciclados por outro antioxidante (Haslam, 1996; Valko et al., 2004; El-Agamey et al., 2004; Omoni e Aluko, 2005; Atoui et al., 2006).

No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres. Estas moléculas, geradas *in vivo*, reagem com DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras. A autooxidação dos ácidos graxos insaturados, componente da membrana celular, é

apontada por Ramarathnam et al. (1995) como o processo oxidativo que ocorre mais freqüentemente no organismo humano.

A adição de antioxidantes em alimentos é uma via efetiva na prevenção do desenvolvimento de compostos que confere aroma e sabor indesejáveis como resultado da oxidação de lipídios (Namiki, 1990).

A constatação de que os vegetais possuem substâncias biologicamente ativas que trazem benefícios à saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis tem impulsionado estudos sobre a sua propriedade antioxidante. O efeito antioxidante de vegetais foi, inicialmente, evidenciado por Chipault et al. (1952) que avaliaram a ação de 32 espécies medicinais e aromáticas, das quais o alecrim e a sálvia foram consideradas as mais eficazes. Posteriormente, esta ação foi constatada na soja e produtos de soja (Pratt e Birac, 1979), na canela (Mancini-Filho et al., 1998), na maçã (Leja et al., 2003), no espinafre e repolho (Ismail et al., 2004), no coentro (Melo et al., 2005), entre outros.

Os estudos *in vitro* da atividade antioxidante podem ser realizados através do ensaio espectrofotométrico de redução do radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·), freqüentemente utilizado para determinar a capacidade de espécies vegetais na captura de radicais livres. Esse ensaio consiste na habilidade dos antioxidantes para seqüestrar radicais livres gerados no meio da reação (Frankel e Meyer, 2000), onde o antioxidante reage com o radical DPPH (radical livre), convertendo-o em sua forma reduzida (1,1-difenil-2-picrilhidrazina). Nesta reação, a solução metanólica de DPPH, inicialmente de coloração violeta, torna-se amarelada e o grau deste descoramento indica a habilidade do antioxidante em seqüestrar o radical livre. A atividade é monitorada espectrofotometricamente de modo a quantificar o grau de inibição da oxidação pelo antioxidante a ser testado (Molyneux, 2003; Abidille et al., 2005).

Na indústria alimentícia, a oxidação lipídica é inibida por seqüestradores de radicais livres. Os compostos mais utilizados com esta finalidade são o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), *terc*-butil-hidroxi-quinona (TBHQ) e galato de propila (GP). Estudos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem alguns efeitos tóxicos. O galato de propila, por exemplo, quando na presença de peróxido de hidrogênio reage com íons ferrosos formando espécies reativas de oxigênio, as quais podem, posteriormente, atacar alvos biológicos (Haslam, 1996; Soares, 2002).

Devido aos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles.

2.4.1- Compostos fenólicos

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se, principalmente, às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Haslam, 1996; Soares, 2002; Chun et al., 2005).

Os compostos fenólicos, constituintes de um amplo e complexo grupo de fitoquímicos, são produtos secundários do metabolismo vegetal que apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxilas, o que possibilita atuarem como agentes redutores, exercendo proteção ao organismo contra o estresse oxidativo (Scalbert e Williamson, 2000). São amplamente distribuídos na natureza e é sugerido que sua atividade antioxidante ocorre por conjugação, isolando os grupos hidroxilas (Decker, 1995).

Os compostos fenólicos de plantas estão agrupados em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis e ligninas (Naczki, 2004).

Embora as evidências sejam claras sobre a ação *in vitro* dos fenóis e polifenóis com espécies reativas de oxigênio eles podem, em algumas circunstâncias, tal como o ascorbato e os carotenóides, mostrarem características pró-oxidantes (Haslam, 1996; Valko et al., 2004; El-Agamey et al., 2004; Omoni e Aluko, 2005).

Os flavonóides constituem uma das maiores classes de compostos fenólicos. O esqueleto básico dos flavonóides contém 15 carbonos em um arranjo com dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de 3 carbonos aberta ou fechada. Esta estrutura é resultante de duas rotas biossintéticas separadas: a rota do ácido chiquímico, através da fenilalanina e a rota do ácido malônico. Os flavonóides são classificados em grupos diferentes, primeiramente, pelo grau de oxidação da cadeia de três carbonos. Os diferentes flavonóides desempenham funções diversas nos vegetais, incluindo pigmentação e defesa (Taiz e Zeiger, 2006).

Os flavonóides atraem a atenção de pesquisadores por suas potencialidades medicinais, especialmente aquelas relacionadas a propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, antialérgicas, mutagênicas, carcinogênicas, anticarcinogênicas,

citotóxicas, antineoplásicas e hipoglicemiantes (Khosa et al., 1983; Hukeri et al., 1988; Alcaraz e Jiménez, 1988; Stafford, 1990; Pathak e Singla, 1991).

Benavente-Garcia et al. (1997) afirmam que em *Citrus* a capacidade antioxidante dos flavonóides os possibilita a agir como anticânceres, antivirais, antiinflamatórios e exercem efeitos sobre a fragilidade dos capilares e uma habilidade em inibir a agregação de plaquetas em humanos.

Outras funções têm sido atribuídas para os flavonóides na planta, dentre elas, estão suas contribuições para as cores de flores e frutos que desempenham importante função ecológica na atração de animais para a polinização e dispersão de sementes. Podem atuar também como substâncias filtradoras, uma vez que, fenólicos são acumulados como resultado de estresse por alta luminosidade e há, nesse sentido, forte evidências que danos ao DNA por radiação ultravioleta (UV) levam a acumulação de flavonóides e outros fenólicos absorventes de luz UV, principalmente, em tecidos dérmicos da planta (Dey e Harbone, 1997).

Muitos efeitos antioxidantes promovidos por compostos fenólicos tem sido elucidados como atividade de ácidos fenólicos derivados do carnosol e flavonóides (Wang et al., 1998).

A degradação oxidativa de lipídios é um dos fatores limitantes na vida de prateleira dos produtos alimentícios. A oxidação de lipídios insaturados induz a formação de compostos que são inaceitáveis tanto do ponto de vista das características organolépticas quanto por aspectos toxicológicos. A atividade antioxidante desses compostos são resultados de vários possíveis mecanismos: 1) radical livre- atividade *scavenging*; 2) transição metal- atividade quelante e/ou oxigênio singlete- atividade quelante (Namiki, 1990; Das e Pereira, 1990; Schwarz e Ternes, 1992).

2.4.3- Atividade antioxidante de *Salvia officinalis* L.

O efeito protetor exercido por plantas medicinais, tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes, dentre os quais se destacam os compostos fenólicos. *Salvia officinalis* L. é uma planta medicinal muito popular que há décadas vem sendo estudada, devido os seus componentes antioxidantes (Chipault et al., 1952; Cuvelier et al., 1996).

Rosmarinus officinalis L. e *Salvia officinalis* L. possuem “forte” atividade antioxidante (Madsen et al., 1997; Cuppett e Hall, 1998). Alguns de seus compostos fenólicos têm demonstrado excelente atividade “limpante” (*scavenging*) na ação do oxigênio como radical superóxido, radical hidroxila e oxigênio singlete (Masaki, et al., 1995) e inibe a peroxidação de lipídios (Hohmann et al., 1999) e, conseqüentemente, os extratos ricos em substâncias

antioxidantes tem sido amplamente utilizados para a estabilização de lipídios em alimentos ricos em gorduras (Ternes e Schwarz, 1995).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos de *Salvia officinalis* L. apresentaram alta eficiência antioxidante (Wang et al., 1998). Devido à variabilidade de fatores ambientais os constituintes fenólicos dos extratos obtidos de diferentes exemplares de sálvia apresentaram grande diferença na composição e, conseqüentemente, diferenças no poder oxidativo (Cuvelier et al., 1996; Areias et al., 2000).

Antioxidantes de origem natural tem recebido especial atenção, principalmente as espécies *Rosmarinus officinalis* L. e *Salvia officinalis* L., que são consideradas altamente eficientes. Muitas das atividades antioxidantes de sálvia tem sido atribuída aos compostos: ácido carnósico, carnosol e ácido rosmarínico (Cuvelier et al., 1996). Entretanto, os componentes químicos desta espécie são complexos, vários compostos como os diterpenos, triterpenos e flavonóides tem sido isolados (Brieskorn e Kapadia, 1979; Karl et al., 1982; Djarmati et al., 1992; Cuvelier, 1994, 1996; Tada, 1997) e dentre estes componentes que apresentam contribuição significativa na atividade antioxidante total apresentada, os compostos fenólicos estão em destaque.

2.5- Reguladores Vegetais

2.5.1. Aspectos gerais

Os reguladores vegetais são amplamente usados na agricultura devido à influência positiva no aumento e na qualidade das colheitas (Nickell, 1982), sendo amplamente testados em frutos e vegetais de importância econômica (Audus, 1972). Porém, poucos trabalhos têm sido feitos sob ação desses reguladores vegetais em plantas medicinais, que também são de grande importância econômica, comparando a produção com a composição do óleo essencial (Reinchling et al., 1977; Stahl e Wollensah, 1986; El-Keltawi e Croteau, 1986, 1987).

Os reguladores vegetais podem influenciar a resposta de muitos órgãos da planta, porém essa resposta depende de alguns fatores como: a espécie, parte da planta, estágio de desenvolvimento, concentração, interação entre outros reguladores e vários fatores ambientais estão ainda envolvidos em processos de crescimento e desenvolvimento de um órgão ou tecido vegetal (Salisbury e Ross, 1992). A aplicação exógena de reguladores vegetais pode modificar o comportamento de uma planta, alterando sua produtividade, como o seu metabolismo secundário, aumentando ou diminuindo o teor de óleo essencial e seus constituintes (Shukla e Farooqi, 1990).

As auxinas são substâncias quimicamente relacionadas com o ácido indolil-3- acético (IAA) que promovem o crescimento das plantas, principalmente através do alongamento celular. Os efeitos fisiológicos da auxina dependem de alguns fatores como: estágio de desenvolvimento do tecido ou órgão; concentração; tipo, endógeno ou exógeno e, principalmente, a interação com outros reguladores vegetais (Taiz e Zeiger, 2006). Em plantas medicinais e aromáticas as auxinas estão relacionadas com a síntese e composição do óleo essencial. Em plantas de *Mentha piperita* tratadas com auxina há aumento na produção de óleo (Trease e Evans, 1978).

As giberelinas são associadas à promoção do crescimento do caule e a aplicação desse regulador vegetal à planta intacta pode induzir ao aumento significativo na sua altura. A aplicação exógena de giberelina promove o alongamento dos entrenós e associado a esse efeito, há também a diminuição na espessura do caule e no tamanho da folha, além da coloração verde clara das folhas. Apresentam pouco efeito no crescimento da raiz (Taiz e Zeiger, 2006).

As citocininas participam na regulação de muitos processos fisiológicos da planta, incluindo a divisão celular, a morfogênese da parte aérea e das raízes, a maturação dos cloroplastos, o alongamento celular e a senescência (Taiz e Zeiger, 2006).

As giberelinas e as citocininas são reguladores vegetais amplamente empregados para otimizar o crescimento e o rendimento de metabólitos secundários das plantas (Shukla e Farooqi, 1990), pois estas substâncias quando aplicadas exogenamente influenciam vários aspectos do desenvolvimento e da biossíntese de importantes compostos (Wareing e Phillips, 1985).

Muitos estudos foram realizados com o ácido giberélico, pois este favorece o desenvolvimento em várias espécies vegetais por promover o alongamento celular. Em plantas aromáticas, a aplicação de giberelina sintética (GA₃) tem resultado em notável aumento dos entrenós, no acúmulo de material orgânico, aumento ou diminuição no teor de óleo essencial e alterações nos constituintes químicos do óleo (Krys'kov e Shkurat, 1961; Tronchet, 1961; Povh e Ono, 2007).

Atualmente, além do uso dos reguladores vegetais de modo isolados como substâncias ativas para promoção de aumento de produção, produtos como os bioestimulantes estão em destaque. Os reguladores vegetais são substâncias sintéticas que aplicadas exogenamente possuem ação similar aos grupos de hormônios vegetais conhecidos, enquanto que estimulante vegetal ou bioestimulante é a mistura de reguladores vegetais ou de um ou mais reguladores com outros compostos de natureza bioquímica diferente; esse produto químico pode, em função da sua composição, concentração e proporção das substâncias, incrementar o crescimento e desenvolvimento vegetal (Castro e Vieira, 2001). A aplicação agrícola de reguladores vegetais e de bioestimulantes vegetais está se tornando uma prática de grande destaque, aprimorando de forma significativa a produção de laranja 'Pêra' (Castro *et al.*, 1998), feijão, milho, arroz e soja (Alleoni *et al.*, 2000; Milléo *et al.*, 2000; Vieira e Castro, 2001; Vieira e Castro, 2004; Braccini *et al.*, 2005) e o número de bagas em videira (Tecchio, 2005), sendo os resultados obtidos até o momento com o uso dessa técnica bastante promissores (Vieira e Castro, 2004).

No momento, no mercado são encontradas formas prontas de bioestimulantes e, dentre as opções disponíveis, o Stimulate® é um produto que apresenta em sua composição 0,009% de cinetina (citocinina), 0,005% de ácido giberélico (giberelina) e 0,005% de ácido indolilbutírico (auxina) e, de acordo com Castro *et al.* (1998), atua no crescimento e no desenvolvimento vegetal, estimulando a divisão celular, a diferenciação e o alongamento das células, com aumento também da absorção e da utilização dos nutrientes, sendo especialmente eficiente quando aplicado com fertilizantes foliares. Outro bioestimulante é o Promalin®, que é a mistura de GA₄₊₇ + N-(fenilmetil) – 1-purina-6-amina, duas giberelinas e uma citocinina, respectivamente.

Alguns estudos relacionados com o uso dessas substâncias com o teor e composição de óleo essencial em plantas medicinais foram realizados por Povh e Ono (2006) e esses autores observaram em plantas de *Salvia officinalis* L. que a aplicação de Stimulate® a 2% promoveu aumento no crescimento e rendimento do óleo essencial.

No Brasil poucos são os estudos sobre o efeito de diferentes reguladores vegetais na produção de biomassa e de metabólitos secundários em plantas medicinais. Portanto, os esforços na busca de substâncias ativas que possam aumentar a produção das plantas medicinais e aromáticas, visando, principalmente, a produção de óleos essenciais são de grande importância, principalmente, quando se considera a dependência da indústria farmacêutica nacional à importação de matéria-prima nesta área que chega a 80% (Ming, 1992).

2.5.2- Efeitos Fisiológicos em Plantas Aromáticas e Medicinais

As giberelinas têm sido amplamente usadas para aumentar o crescimento e a produção de partes aéreas da planta (Shurkla e Farroqi, 1990). Muitos foram os autores que estudaram seus efeitos em plantas medicinais.

Haikal e Badr (1982) relataram em camomila aumento na altura da planta e número de ramos principais com a aplicação de GA₃. El-Shahar *et al.* (1984), em manjerição (*Ocimum basilicum* L.), observaram aumento da área foliar e do número de folhas por planta com a aplicação de 90 mg L⁻¹ de GA₃. Na concentração de 100 mg L⁻¹ Sheheed *et al.* (1990) estudando a mesma espécie observaram aumento no número total de folhas (68,82%), na área foliar (84,59%), massa de matéria fresca da planta (85,85%) e na matéria seca (82,84%).

Umesha *et al.* (1991), estudando plantas de *Ocimum gratissimum* L., verificaram aumento na altura da planta, comprimento do entrenó, área foliar e acumulação de massa seca com a aplicação foliar de GA₃ nas concentrações de 50, 100 e 150 mg L⁻¹, aumentando também a produção total de óleo essencial. Os melhores resultados foram observados na concentração de 100 mg L⁻¹.

Farroqi *et al.* (1993) analisaram o efeito de GA₃ na produtividade de *Artemisia pallens* (Wall.) e observaram que nas concentrações de 100, 150 e 200 mg L⁻¹ aumentaram a altura da planta e o número de ramos secundários por planta.

Singh e Misra (2001) relataram que plantas de *Mentha spicata* tratadas com GA₃ na concentração de 1000 mg L⁻¹ apresentaram aumento na altura, número de folhas, comprimento de entrenós e teor total de clorofila.

O ácido giberélico favorece o desenvolvimento de espécies vegetais por promover o alongamento celular. Em plantas aromáticas, a aplicação de giberelina sintética (GA₃) tem resultado em notável aumento dos entrenós de *Ocimum basilicum* (Tronchet, 1961). Esses resultados também foram descritos por Povh e Ono (2004) em plantas de *Salvia officinalis* L. e aumento na acumulação do material orgânico de *Mentha piperita*, sendo observado diminuição do conteúdo de seu óleo essencial (Krys'kov e Shkurat, 1961).

Frequentemente, as giberelinas têm sido usadas para aumentar o crescimento e a produção de partes aéreas da planta, visando maior produtividade, porém em estudos com este regulador vegetal, muitos pesquisadores observaram que em algumas plantas aromáticas e medicinais a aplicação exógena de GA₃ promoveu alteração na quantidade e qualidade do óleo essencial.

A aplicação de GA₃ em *Ocimum gratissimum* L. refletiu no incremento da produção total de óleo essencial (Umesha et al., 1991), promovendo também, aumento na produção e qualidade do óleo essencial em *Ocimum sanctum* e *O. basilicum* (Eid e Ahmed, 1976). Misra (1995) descreveu em plantas de *Pogostimon cablin* tratadas com GA₃ aumento do crescimento vegetal e a produção de óleo essencial.

As citocininas também podem promover alterações no teor e composição do óleo essencial em plantas medicinais e aromáticas, por aumento na divisão celular. Assim, Zlatev et al. (1978) estudaram a influência das citocininas em *Mentha piperita* e verificaram aumento no rendimento de massa verde. Entretanto, Scravoni et al. (2006) descreveram para *Mentha piperita* L. aumento na produção de massa fresca com a aplicação exógena de citocinina (BAP a 50 mg L⁻¹), no entanto, menor teor de óleo essencial.

A aplicação foliar de citocinina promoveu o crescimento de *Mentha piperita*, *M. spicata* e *Salvia officinalis* observando-se também aumento na produção de óleo essencial pela planta (El-Keltawi e Croteau, 1987). Os autores relatam ainda que, o aumento observado na produção de óleo essencial pela planta é atribuído, em parte, ao crescimento induzido pela citocinina.

Sheheed et al. (1990), estudando plantas de *Ocimum basilicum* L. tratadas com GA₃ e cinetina, observaram notável aumento no crescimento, sendo os melhores resultados obtidos na concentração de 100 mg L⁻¹ para GA₃ e 50 mg L⁻¹ para cinetina.

Segundo Youssef e Talaat (1998), em plantas de *Lavandula officinalis*, a aplicação de cinetina na concentração de 20 ou 40 mg L⁻¹, aumentou significativamente a altura da planta, número de ramificações e massa fresca e seca da planta. A composição química do óleo essencial produzido pela planta também foi influenciada pelo tratamento, diminuindo o teor de 1,8-cineol e cânfora e aumentando o teor de linalool.

El-Khateeb (1989) observou aumento na altura da planta de *Rosmarinus officinalis* L. sob o efeito de GA₃ nas concentrações de 50 e 200 mg L⁻¹, porém para a produção de óleo essencial o aumento foi observado apenas na concentração de 50 mg L⁻¹.

Mahmoud e Shetty (1996) relataram que a aplicação de GA₃ em *Ocimum basilicum* L. estimulou o crescimento vegetal, como a altura da planta, número de folhas e área foliar. É interessante relatar, que estes autores, utilizando cinetina e uma auxina sintética, o ácido indolil-3-acético (IAA), observaram inibição do crescimento da planta, resultando em diminuição na massa fresca. Descreveram ainda que, em plantas tratadas com GA₃ houve diminuição do teor de óleo essencial em 0,18% comparado com 0,21% do controle, enquanto que a auxina e a cinetina promoveram aumento de 0,24 e 0,27%, respectivamente.

Povh e Ono (2006) descreveram aumento no teor de óleo essencial em plantas de *Salvia officinalis* L. quando tratadas com ácido giberélico e Stimulate® e o maior aumento sendo observado em plantas tratadas com GA₃.

CAPÍTULO I

**DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE *Salvia officinalis* L. TRATADAS COM
REGULADORES VEGETAIS E BIOESTIMULANTES**

DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE *Salvia officinalis* L. TRATADAS COM REGULADORES VEGETAIS E BIOESTIMULANTES

RESUMO- Este estudo objetivou avaliar o efeito de reguladores vegetais e bioestimulantes no desenvolvimento de plantas de *Salvia officinalis* L. O experimento foi instalado em casa de vegetação sendo as plantas tratadas com os seguintes tratamentos: 1- controle (água); 2- IBA a 100 mg L⁻¹; 3- GA₃ a 70 mg L⁻¹; 4-benzilaminopurina (BAP) a 70 mg L⁻¹; 5- GA₃+cinetina+IBA – Stimulate[®] a 1% e 5- GA₄₊₇+N-(fenilmetil)-1-purina-6-amino – Promalin[®] a 100 mg L⁻¹. Os tratamentos foram aplicados quatro vezes, sendo a primeira, 25 dias após a emergência (D.A.E.), a segunda, a terceira e a quarta aplicação aos 10, 20 e 30 D.A.E., respectivamente. Em cada coleta (sete coletas), determinaram-se: altura da planta (comprimento da parte aérea), área foliar, massa de matéria seca do caule, das folhas e da parte aérea da planta. Analisando-se os resultados obtidos foi possível verificar que plantas tratadas com IBA e GA₃ promoveram maiores incrementos na produtividade vegetal, principalmente, na formação da parte aérea.

Palavras-chave: ácido giberélico, ácido indolilbutírico, cinetina, Lamiaceae

DEVELOPMENT OF *Salvia officinalis* L. PLANTS TREATED WITH PLANT GROWTH REGULATOR AND BIOSTIMULANTS

ABSTRACT- This study aimed at evaluating the effect of plant growth regulators and biostimulants on *Salvia officinalis* L. plant development. The experiment was carried out in a greenhouse and plants were subjected to the following treatments: 1- control (water); 2- IBA 100 mg L⁻¹; 3- GA₃ 70 mg L⁻¹; 4-benzylaminopurine (BAP) 70 mg L⁻¹; 5- GA₃+kinetin+IBA – Stimulate[®] 1%; and 6- GA₄₊₇+ N-(phenylmethyl)-1H-purine-6-amine – Promalin[®] 100 mg L⁻¹. Treatments were sprayed four times: the first, at 25 days after emergence (D.A.E.); the second, third and fourth, at 10, 20 and 30 D.A.E., respectively. In each harvest (a total of seven), plant height (shoot length), leaf area, and dry matter mass of stem, leaves and shoot were assessed. IBA- and GA₃-treated plants led to higher plant productivity, mainly regarding shoot formation.

Key words: gibberelic acid, indolebutyric acid, kinetin, Lamiaceae

INTRODUÇÃO

Salvia officinalis L., pertencente à família Lamiaceae, é uma planta originária do sul da Europa, popularmente conhecida como sálvia é utilizada, principalmente, como planta aromática e com propriedades medicinais (Martins et al., 1998). Os principais produtores para esta espécie estão na região do Mediterrâneo e Estados Unidos; no Brasil foi aclimatada e tem sido cultivada, principalmente nos estados da região Sul do Brasil (Serafini e Cassel, 2001).

As plantas medicinais e aromáticas têm grande importância para a indústria farmacêutica e para a medicina tradicional em vários países, tornando de grande importância o conhecimento da fisiologia dessas plantas nos dias de hoje. Nesse sentido, vários estudos têm sido concentrados no conhecimento do desenvolvimento e da produtividade de plantas que possuam interesses econômicos tanto por suas propriedades aromáticas como medicinais.

O uso dos reguladores vegetais na agricultura tem mostrado grande potencial no aumento da produtividade, mas sua utilização ainda não é prática usual em plantas aromáticas e medicinais (Reinchling et al., 1977; Stahl e Wollensah, 1986; El-Keltawi e Croteau, 1986, 1987). Porém, atualmente, o crescente interesse econômico pelo aumento na demanda por produtos derivados de plantas aromáticas e medicinais, o uso de reguladores vegetais têm despertado interesse, visando principalmente, à promoção de aumento no crescimento da parte aérea, como comprimento do caule, número de folhas, área foliar e acúmulo de massa seca e na produtividade, principalmente dos princípios ativos, como os óleos essenciais.

Os reguladores vegetais influenciam a resposta de muitos órgãos da planta, porém essa resposta depende de alguns fatores como: a espécie, parte da planta, estágio de desenvolvimento, concentração, interação entre os outros reguladores e, ainda, vários fatores ambientais estão envolvidos em processos de crescimento e desenvolvimento de um órgão ou tecido vegetal (Salisbury e Ross, 1992). Os reguladores vegetais são substâncias sintéticas que aplicadas exogenamente possuem ação similar aos grupos de hormônios vegetais conhecidos (Castro e Vieira, 2001).

O estimulante vegetal ou bioestimulante é a mistura de reguladores vegetais ou de um ou mais reguladores com outros compostos de natureza bioquímica diferente (Castro e Vieira, 2001). São compostos orgânicos que, em baixas concentrações, inibem, promovem ou modificam processos morfológicos e fisiológicos nas plantas. Esse produto químico pode, em função da sua composição, concentração e proporção das substâncias, incrementar o crescimento e desenvolvimento vegetal, estimulando a divisão celular, diferenciação e o

alongamento das células, favorecer o equilíbrio hormonal da planta, podendo, também, aumentar a absorção e a utilização de água e dos nutrientes pelas plantas (Vieira e Castro, 2001).

Dentre os hormônios vegetais, tradicionalmente, cinco grupos, ou classes, têm recebido maior atenção: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico. Mas, recentemente outras substâncias foram reconhecidas como reguladoras do desenvolvimento vegetal, tais como brassinosteróides, ácido salicílico, jasmonatos, compostos fenólicos e poliaminas (Davies, 2004).

As auxinas são substâncias quimicamente relacionadas com o ácido indolil-3- acético (IAA), que promovem o crescimento das plantas, principalmente através do alongamento celular. Os efeitos fisiológicos da auxina dependem de alguns fatores como: estágio de desenvolvimento do tecido ou órgão; concentração; tipo, endógeno ou exógeno e, principalmente, a interação com outros reguladores vegetais (Taiz e Zeiger, 2006).

Os estudos com as giberelinas estão associados à promoção do crescimento do caule e a aplicação exógena deste regulador vegetal, via foliar, na planta intacta pode induzir ao aumento significativo na sua altura, atuando, principalmente, no alongamento celular (Taiz e Zeiger, 2006). É um regulador vegetal amplamente usado para aumentar o crescimento e a produção da parte aérea da planta (Shurkla e Farooqi, 1990).

Estudos em diversas plantas medicinais demonstraram os efeitos do ácido giberélico (GA₃) no aumento na altura da planta (Haikal e Badr, 1982; El-Khateeb, 1989; Umesha et al., 1991; Mahmoud et al., 1996; Singh e Mishra, 2001; Povh e Ono, 2005), área foliar (El-Salhar et al., 1984; Shedeed et al., 1990; Umesha et al., 1991; Mahmoud et al., 1996; Povh e Ono, 2005), número de folhas (El-Salhar et al., 1984; Shedeed et al., 1990; Mahmoud et al., 1996; Singh e Mishra, 2001), massa de matéria fresca da planta (Shedeed et al., 1990), massa de matéria seca (Shedeed et al., 1990; Umesha et al., 1991; Povh e Ono, 2005) e número de ramos secundários por planta (Farooqi et al., 1993).

As citocininas participam da regulação de muitos processos fisiológicos da planta, incluindo a divisão celular, a morfogênese da parte aérea e das raízes, a maturação dos cloroplastos, o alongamento celular e a senescência (Taiz e Zeiger 2006).

Os estudos da aplicação agrícola de reguladores vegetais e de bioestimulantes vem se destacando, principalmente de forma significativa na produção de laranja 'Pêra' (Castro et al., 1998), feijão, milho, arroz e soja (Alleoni et al., 2000; Milléo et al., 2000; Vieira e Castro, 2001; Vieira e Castro, 2004; Ávila, 2004; Braccini et al., 2005) e videira (Tecchio, 2005), sendo os resultados obtidos até o momento com o uso dessa técnica bastante promissores (Vieira e Castro, 2004).

Existem no mercado formas prontas de bioestimulantes e, dentre as opções disponíveis, o Stimulate® é um bioestimulante que apresenta em sua composição 0,009% de cinetina (citocinina), 0,005% de ácido giberélico (giberelina) e 0,005% de ácido indolilbutírico (auxina). De acordo com Castro et al. (1998), o Stimulate atua no desenvolvimento vegetal, estimulando a divisão celular, a diferenciação e o alongamento das células, com aumento também da absorção e da utilização dos nutrientes, sendo especialmente eficiente quando aplicado com fertilizantes foliares. Outro bioestimulante é o Promalin®, uma mistura de duas giberelinas (GA_{4+7}) + citocinina (N-fenilmetil-1-purina-6-amina).

Em plantas medicinais e aromáticas o uso de Stimulate® foi realizado em plantas de *Salvia officinalis* L. por Povh e Ono (2006), que descrevem aumento no crescimento e rendimento do óleo essencial na concentração de 2%.

No desenvolvimento de plantas aromáticas e medicinais a época de coleta auxilia na escolha do período ideal de maior produtividade, visando além do aumento de biomassa, incremento no teor e composição do óleo essencial, sendo este a matéria prima de maior importância econômica. Desse modo, os diversos estudos demonstram que a aplicação de reguladores vegetais e bioestimulantes podem promover aumento na produtividade vegetal. No entanto, o conhecimento do efeito dessas substâncias na fisiologia de plantas aromáticas e medicinais no Brasil se faz necessário. Esses estudos podem corroborar com informações sobre espécies exóticas de importância econômica, visando aumento na sua produtividade.

Assim, o presente estudo objetivou avaliar o desenvolvimento de plantas de *Salvia officinalis* L. tratadas com reguladores vegetais e bioestimulantes em sete épocas de coleta.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido entre setembro de 2005 e fevereiro de 2006 em casa de vegetação instalada no Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP. A época da implantação deste experimento coincidiu com temperaturas mais quentes exigidas para esta espécie, de acordo com Martins et al. (1998).

O solo usado no presente experimento apresentava as seguintes características químicas: pH $CaCl_2$ = 5,61; M.O. = 22,66 g kg^{-1} ; P = 22,8 mg dm^{-3} ; H+Al = 34,1, K = 5,12, Ca = 43,56, Mg = 17,65, SB = 66,3, CTC = 100,4 mmole dm^{-3} e V% = 66. A análise química do solo foi determinada pelo Departamento de Recursos Naturais, Setor: Ciência do Solo, da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu, SP.

As plantas foram obtidas de sementes já tratadas com Thiram (dissulfeto tetrametil – tiuram) e semeadas diretamente em vasos com capacidade de 12 litros, com solo corrigido (calagem – 9,12 g vaso⁻¹ de calcáreo dolomítico) e adubado com 15,85 g vaso⁻¹ de superfosfato simples; 2,4 g vaso⁻¹ de nitrogênio; não houve necessidade de adição de potássio e 10% do volume do vaso de matéria orgânica, esterco curtido. Foi realizada ainda adubação de cobertura com solução completa de Hoagland (200 mL vaso⁻¹) uma vez por semana, 65 dias após a emergência. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas sempre que necessário. A temperatura máxima durante a condução do experimento foi de 27°C e a mínima de 16°C.

Foram utilizados seis tratamentos: 1– controle (água); 2– ácido 4-(3-indolil)butírico (IBA) a 100 mg L⁻¹; 3– ácido giberélico (GA₃) a 70 mg L⁻¹; 4– benzilaminopurina (BAP) a 70 mg L⁻¹; 5– ácido giberélico (GA₃) + cinetina (Kt) + ácido indolilbutírico (IBA) – Stimulate[®] a 1% e 6– GA₄₊₇ + N-(fenilmetil)-1-purina-6-amino – Promalin[®] a 100 mg L⁻¹.

Para o ácido 4-(3-indolil)butírico (IBA) foi utilizado o produto p.a. da Vetec Química Fina Ltda.; o ácido giberélico (GA₃) utilizado foi na forma do produto comercial Pro-Gibb contendo 10% de GA₃, da Sumitomo do Brasil; a benzilaminopurina (BAP) utilizada foi na forma do produto p.a. da Sigma; a mistura de GA₃ + cinetina (Kt) + IBA utilizada foi na forma do produto comercial Stimulate[®] contendo 90 mg L⁻¹ de cinetina (Kt), 50 mg L⁻¹ de IBA e 50 mg L⁻¹ de GA₃ por litro do produto, fabricado pela Stoller do Brasil S.A. e a mistura de GA₄ + GA₇ + N-(fenilmetil)-1-purina-6-amina foi utilizada na forma do produto comercial Promalin[®] contendo 1,8% de GA₄+GA₇ e 1,8% de N-(fenilmetil)-1-purina-6-amina fabricado pela Sumitomo do Brasil.

A aplicação dos tratamentos foi realizada com pulverizador manual, com pressão constante de 40 libras, equipado com lança contendo um bico leque tipo 110°02, que proporcionou volume de 310 mL de calda por m². Na solução contendo os reguladores vegetais foi adicionado espalhante adesivo não iônico alquil-fenol-poliglicoléter, ou seja, o produto comercial Extravon na dose de 0,5 mL L⁻¹ de solução, fabricado pela Ciba-Geigy Química S/A.

Foram realizadas quatro aplicações, sendo a primeira, 25 dias após a emergência (D.A.E.) e a segunda, a terceira e a quarta aplicação aos 10, 20 e 30 D.A.E., respectivamente.

As características medidas nas sete coletas avaliadas foram: altura da planta (comprimento da parte aérea) em cm, definida como a distância do colo até o ponto mais alto da planta; área foliar total das lâminas, em cm², com a utilização de integrador de área foliar Area Meter, modelo LI-3100 da Li-Cor; massa seca do caule e folhas + pecíolos, em gramas,

que foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 70°C durante 72 horas, até massa constante.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 x 7 (seis tratamentos e sete épocas de coleta) com três repetições e os resultados submetidos à análise de variância (teste F) e na presença de interação entre os fatores, procedeu-se os desdobramentos necessários. As médias dos tratamentos com as diferentes substâncias dentro de cada época de coleta foram comparadas pelo teste Scott-Knott (1974), ao nível de 1% de probabilidade e para avaliar o efeito das épocas de coleta para cada substância utilizou-se análise de regressão polinomial. Para a análise estatística foi utilizado o pacote computacional SISVAR (Ferreira, 1999). Na escolha do melhor modelo de regressão foram adotados os seguintes critérios: regressão significativa, desvios da regressão não-significativa, coeficiente de determinação e análise de resíduos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Altura da planta (comprimento da parte aérea)

Nas coletas realizadas dos 40 aos 124 D.A.E. o GA₃ promoveu aumento significativo no crescimento do caule, em comparação aos demais tratamentos (Tabela 1). O bioestimulante Promalin® promoveu o segundo maior aumento na altura da planta em todas as épocas de coleta, porém aos 54 D.A.E. este não diferiu significativamente do tratamento com IBA.

Os demais tratamentos promoveram aumento significativo da altura em planta de sálvia, em relação à testemunha. O BAP promoveu efeito de aumento na altura até aos 68 D.A.E, após este período o mesmo não diferiu do controle.

A aplicação exógena de GA₃ à planta intacta pode induzir ao aumento na sua altura devido ao seu efeito sobre o alongamento dos entrenós (Taiz e Zeiger, 2006).

Estes resultados também foram encontrados por Farooqi et al. (1993) que analisaram o efeito de alguns reguladores vegetais na produtividade e conteúdo de óleo essencial de *Artemisia pallens* (Wall.) e observaram aumento na altura da planta e no número de ramos secundários por planta com a aplicação de GA₃.

Estudando plantas de *Ocimum gratissimum* L., Umesha et al. (1991) verificaram aumento na altura da planta e comprimento do entrenó com a aplicação foliar de GA₃ nas concentrações de 50, 100 e 150 mg L⁻¹, sendo os melhores resultados observados na concentração de 100 mg L⁻¹. Singh e Misra (2001) relatam que plantas de *Mentha spicata* tratadas com GA₃ também apresentaram aumento na altura. Povh e Ono (2005) descrevem

para *Salvia officinalis* L. aumento no comprimento do caule com a aplicação de 100 mg L^{-1} de GA_3 .

Geralmente, o GA_3 causa efeitos estimulantes no crescimento em altura da planta e este resultado é causado pelo alongamento celular e não pelo aumento na divisão celular (Stowe e Yamaki, 1959). Os resultados do presente estudo e os citados pelos autores acima, demonstram que plantas de *Salvia officinalis* L., com relação ao comprimento da parte aérea responderam positivamente ao efeito dos reguladores vegetais e bioestimulantes, principalmente, ao tratamento com GA_3 .

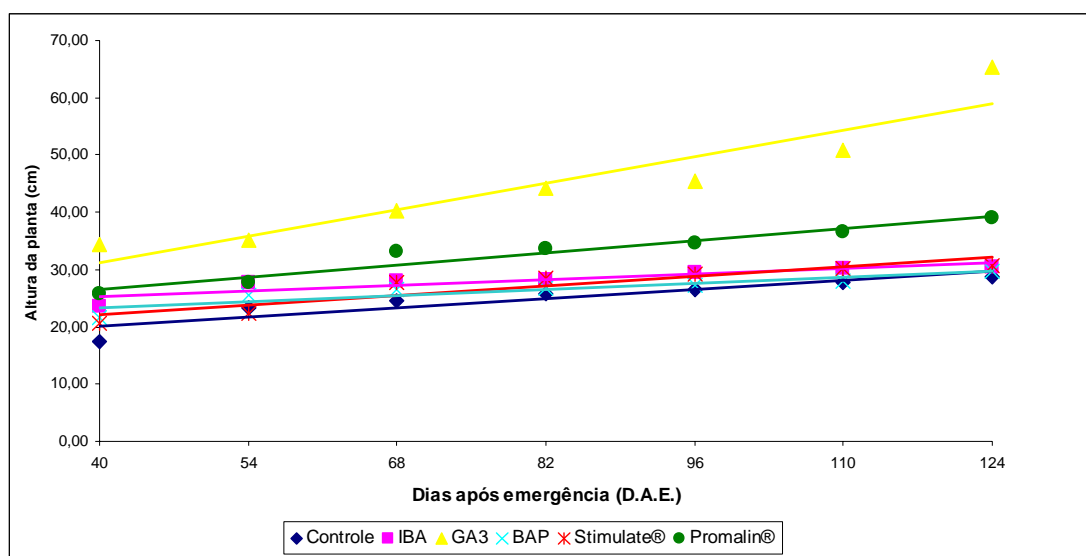
Com relação ao efeito da época de coleta dentro de cada tratamento, a Figura 1 revela que todos os tratamentos apresentaram crescimento linear. De maneira geral, a altura da planta de *S. officinalis*, durante o período estudado apresentou tendência de aumento em plantas tratadas com GA_3 e lento crescimento nas plantas controle.

Os resultados apresentados nesta característica avaliada indicam que GA_3 , seguido do Promalin®, produto este constituído da mistura de duas giberelinas (GA_4 e GA_7) e uma citocinina, foram os tratamentos que aceleraram o crescimento em altura da planta, principalmente, aos 124 D.A.E. O efeito positivo do Promalin® no crescimento das plantas de *S. officinalis*, provavelmente, se deva as giberelinas da sua composição.

Tabela 1. Altura (cm) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais e bioestimulantes nas sete épocas de coleta.

Tratamentos ¹	D.A.E.						
	40	54	68	82	96	110	124
Controle	17,50 D	23,25 D	24,58 D	25,67 D	26,50 D	27,67 D	28,83 C
IBA	23,50 C	27,75 B	28,08 C	28,17 C	29,50 C	30,33 C	30,50 C
GA ₃	34,28 A	35,17 A	40,25 A	44,33 A	45,33 A	50,83 A	65,33 A
BAP	21,63 C	25,58 C	26,58 C	26,83 D	27,17 D	28,00 D	29,83 C
Stimulate®	20,75 C	22,25 D	27,67 C	28,50 C	29,33 C	30,17 C	30,67 C
Promalin®	25,67 B	27,75 B	33,17 B	33,67 B	34,67 B	36,67 B	39,17 B
Média	23,89	26,96	30,06	31,20	32,08	33,95	37,39
C.V. (%)	3,86						

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade



Tratamentos	Modelo ajustado ¹	R ²
Controle	$\hat{Y} = 15,496 + 0,114X$	0,85
IBA	$\hat{Y} = 22,492 + 0,070X$	0,80
GA ₃	$\hat{Y} = 17,973 + 0,331X$	0,88
BAP	$\hat{Y} = 20,240 + 0,077X$	0,84
Stimulate®	$\hat{Y} = 17,164 + 0,121X$	0,86
Promalin®	$\hat{Y} = 20,448 + 0,153X$	0,94

P < 0,001: para todos os modelos ajustados

¹ $\hat{Y} = a + b_1X + b_2X^2 + b_3X^3$

Figura 1. Altura (cm) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais: IBA, GA₃ e BAP e bioestimulantes: Stimulate® e Promalin®, em função das sete coletas, realizadas a intervalos de 14 dias.

Área foliar

De maneira geral, a área foliar apresentou, em todos os tratamentos, crescimento linear, em função da época de coleta (Figura 2).

Pela Tabela 2 observa-se que aos 40 D.A.E. os tratamentos com Promalin®, Stimulate®, GA₃ e IBA apresentaram a maior área foliar, comparado às plantas tratadas com BAP e controle. Todos os tratamentos, exceto com GA₃, apresentaram maior área foliar aos 110 D.A.E. O tratamento com GA₃ apresentou pouca influência na área foliar, ou seja, não promove a expansão das células foliares.

A maior expansão da área foliar ocorrida em plantas tratadas com IBA pode ser atribuída ao efeito das auxinas no alongamento e divisão celular (Taiz e Zeiger, 2006). Povh e Ono (2005) também observaram que o IBA exerceu a maior influência na expansão foliar.

Contrariando os resultados obtidos neste trabalho, Shedeed et al. (1990) observaram aumento na área foliar (84,59%) em plantas de *Ocimum gratissimum* L. tratadas com GA₃ a 100 mg L⁻¹. Também Umesha et al. (1991), estudando plantas de *O. gratissimum* L., verificaram aumento da área foliar com a aplicação foliar de GA₃ nas concentrações de 50, 100 e 150 mg L⁻¹.

Em alfafa (*Medicago sativa* L.) os autores Tomkins e Hall (1991) relataram que a benzilaminopurina (BAP) promoveu aumento na área foliar e produção total de massa seca. Povh e Ono (2005) estudando plantas de *S. officinalis* também verificaram aumento na área foliar com a aplicação de BAP a 100 mg L⁻¹.

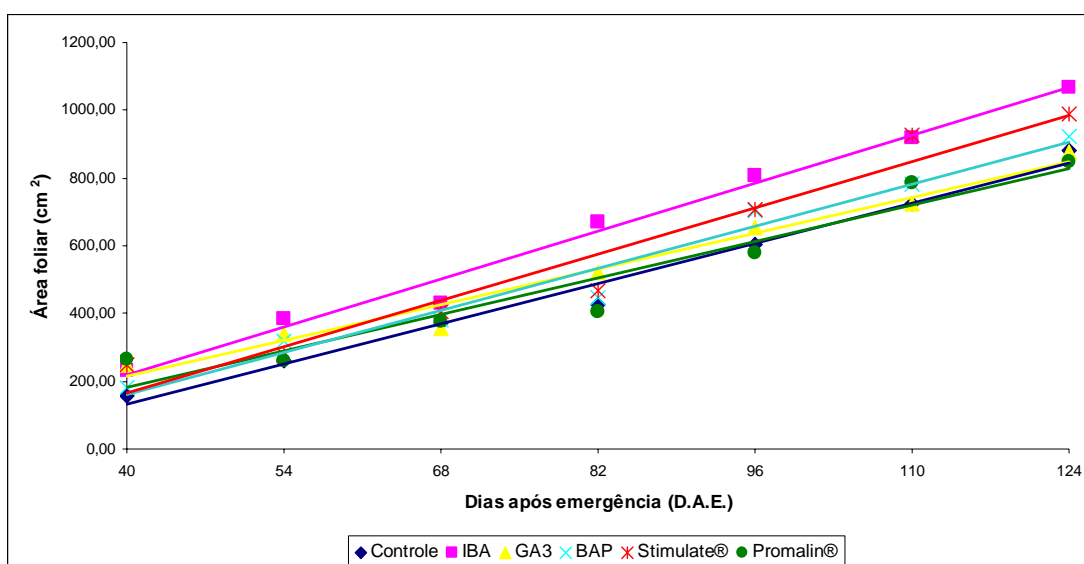
De acordo com os trabalhos apresentados na literatura, GA₃ e BAP exercem forte influência no aumento da área foliar, porém, no presente trabalho estes reguladores vegetais promoveram pouca alteração na área foliar, podendo este resultado estar relacionado com a concentração, que foram utilizados a 70 mg L⁻¹, concentração menor que a utilizada por Povh e Ono (2005) para esta mesma espécie.

Todos os tratamentos apresentaram crescimento linear como revela a Figura 2, e os tratamentos que apresentaram os maiores valores para área foliar ao longo do ciclo de desenvolvimento, até aos 124 D.A.E. foram o IBA, seguido do bioestimulante Stimulate®, produto este que apresenta na sua composição 0,005% de IBA.

Tabela 2. Área foliar média (dm²) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais e bioestimulantes nas sete épocas de coleta.

Tratamentos ¹	D.A.E.						
	40	54	68	82	96	110	124
Controle	157,48 B	261,80 C	373,89 A	427,74 C	604,25 D	724,90 C	879,57 C
IBA	233,53 A	383,13 A	430,42 A	670,02 A	818,57 A	916,82 A	1067,35 A
GA ₃	247,28 A	338,89 B	357,15 A	523,23 B	652,87 C	725,13 C	877,95 C
BAP	181,45 B	319,98 B	382,42 A	446,65 C	703,13 B	783,62 B	921,48 C
Stimulate®	248,11 A	278,47 C	405,43 A	465,70 C	707,68 B	925,02 A	988,43 B
Promalin®	263,98 A	261,75 C	378,61 A	406,70 C	577,47 D	787,65 B	848,95 C
Média	221,97	307,34	387,99	490,01	672,83	810,52	930,62
C.V. (%)	5,65						

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade



Tratamentos	Modelo ajustado ¹	R ²
Controle	$\hat{Y} = -205,135 + 8,477X$	0,99
IBA	$\hat{Y} = -182,064 + 10,094X$	0,98
GA ₃	$\hat{Y} = -87,438 + 7,551X$	0,98
BAP	$\hat{Y} = -191,361 + 8,847X$	0,97
Stimulate®	$\hat{Y} = -224,186 + 9,735X$	0,95
Promalin®	$\hat{Y} = -125,124 + 7,667X$	0,93

P < 0,001: para todos os modelos ajustados

¹ $\hat{Y} = a + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$

Figura 2. Área foliar (dm²) de plantas de *Salvia officinalis* L. submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais: IBA, GA₃ e BAP e bioestimulantes: Stimulate® e Promalin®, em função de sete coletas, realizadas a intervalos de 14 dias.

Massa seca de folha

De maneira geral, os resultados demonstram que os maiores incrementos de massa seca de folhas ocorreu aos 124 D.A.E. em plantas tratadas com IBA, seguidas de Stimulate® (Tabela 3). Todos os tratamentos apresentaram crescimento linear, ou seja, apresentaram aumento contínuo de massa seca de folhas do início até a última avaliação (Figura 3).

Aos 124 D.A.E. pode-se observar que os resultados encontrados para massa seca de folhas, assemelham-se aos da área foliar, revelando que o IBA é o regulador vegetal com maior efeito na promoção de aumento na área foliar e na massa seca de folhas e o bioestimulante Stimulate® promoveu o segundo maior aumento também na área foliar como na massa seca de folhas.

Essa maior massa seca de folhas promovida pelo IBA e Stimulate® está relacionada com a influência destes na expansão foliar, que resultou na maior área foliar nesses tratamentos. O Stimulate® é um bioestimulante constituído pela mistura de três reguladores vegetais: auxina (IBA), ácido giberélico (GA₃) e citocinina (cinetina), sugerindo que o IBA da sua composição foi o responsável pela expansão foliar.

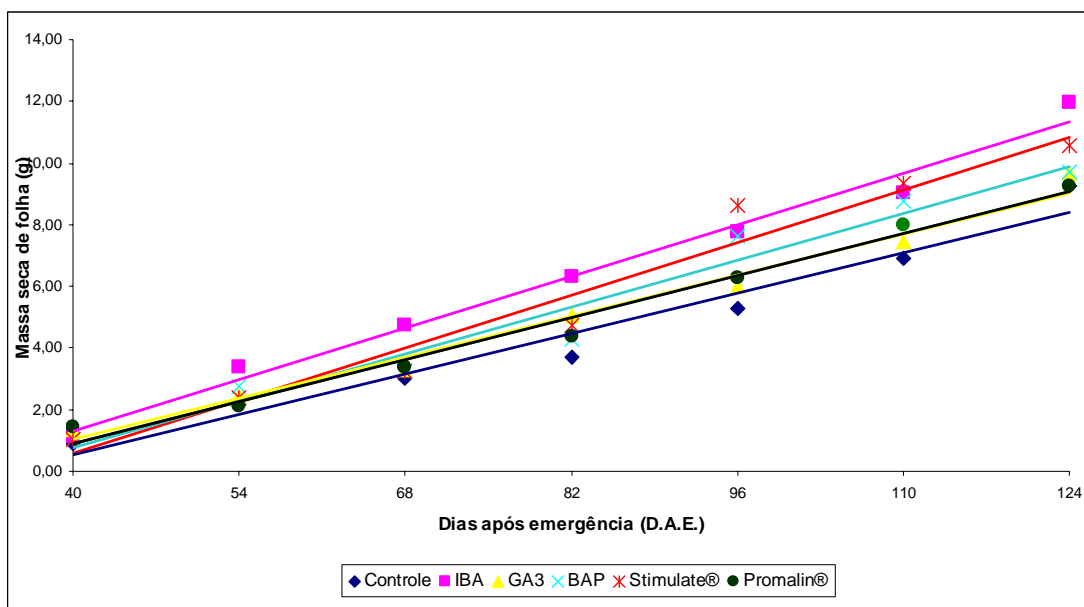
No presente trabalho, o IBA promoveu maior acúmulo de matéria seca de folhas, no entanto, é conhecida na literatura que tanto o GA₃, quanto o BAP (citocinina), também podem promover aumento no crescimento e na massa seca de folhas. Assim, a interação entre o IBA, GA₃ e cinetina também justifica o aumento da massa seca de folhas encontrada neste trabalho, com esse bioestimulante.

Os resultados encontrados na literatura relatam divergências em relação à influência do GA₃ na massa seca de folhas, assim como ocorre na área foliar. No presente trabalho pode-se observar que GA₃ promoveu aumento significativo dos 82 aos 110 D.A.E., porém não foi o tratamento mais efetivo no acúmulo de massa seca de folhas. Dahab et al. (1987) verificaram em plantas de *Chrysanthemum frutescens* tratadas com GA₃ aumento nas massas de matéria fresca e seca das folhas. Em plantas de *Ruta graveolens* L. o GA₃ aumentou o número de folhas e a massa da matéria seca de folhas (El-Khateeb et al., 1991). No entanto, Eid e Ahmed (1976) observaram em plantas de *Ocimum basilicum* L (manjeriço) tratadas com GA₃ nas concentrações de 50, 100 e 200 mg L⁻¹, diminuição na massa seca de folhas em todas as concentrações.

Tabela 3. Massa seca média de folhas (g) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais e bioestimulantes nas sete épocas de coleta.

Tratamentos ¹	D.A.E.						
	40	54	68	82	96	110	124
Controle	0,91 A	2,16 B	3,01 B	3,70 D	5,29 D	6,90 C	9,24 C
IBA	1,11 A	3,39 A	4,72 A	6,31 A	7,76 B	9,02 A	11,98 A
GA ₃	1,37 A	2,46 B	3,30 B	5,04 B	5,99 C	7,44 B	9,65 C
BAP	1,03 A	2,74 B	3,23 B	4,27 C	7,65 B	8,76 A	9,71 C
Stimulate®	1,06 A	2,41 B	3,25 B	4,74 B	8,62 A	9,34 A	10,58 B
Promalin®	1,45 A	2,12 B	3,37 B	4,40 C	6,27 C	8,00 B	9,27 C
Média	1,16	2,55	3,48	4,74	6,93	8,24	10,07
C.V. (%)	5,50						

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade



Tratamentos	Modelo ajustado ¹	R ²
Controle	$\hat{Y} = -3,226 + 0,094X$	0,96
IBA	$\hat{Y} = -3,478 + 0,120X$	0,99
GA ₃	$\hat{Y} = -2,804 + 0,096X$	0,98
BAP	$\hat{Y} = -3,546 + 0,108X$	0,96
Stimulate®	$\hat{Y} = -4,280 + 0,122X$	0,96
Promalin®	$\hat{Y} = -2,992 + 0,097X$	0,98

P < 0,001: para todos os modelos ajustados

¹ $\hat{Y} = a + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$

Figura 3. Massa seca das folhas (g) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais: IBA, GA₃ e BAP e bioestimulantes: Stimulate® e Promalin®, em função das sete coletas, realizadas a intervalos de 14 dias.

Massa seca de caule

Com relação à massa seca de caule, plantas tratadas com GA₃ apresentaram maior acúmulo de matéria seca no caule em comparação com os demais tratamentos (Tabela e Figura 4). Todos os tratamentos tiveram crescimento linear, ou seja, apresentaram crescimento contínuo durante todo o ciclo de desenvolvimento estudado (Figura 4).

O aumento promovido pelo GA₃ no acúmulo de massa seca de caule está relacionado com o efeito deste regulador vegetal sobre o seu crescimento, devido ao seu efeito no alongamento dos entrenós (Taiz e Zeiger, 2006).

Estudando plantas de *Ocimum gratissimum* L. Umesha et al. (1991) verificaram aumento na altura da planta, comprimento do entrenó, área foliar e acumulação de massa seca com a aplicação foliar de GA₃ nas concentrações de 50, 100 e 150 mg L⁻¹, aumentando também a produção total de óleo essencial.

Os autores Singh e Misra (2001) também observaram aumento da massa seca de caule em plantas de *Mentha spicata* tratadas com GA₃ a 1000 mg L⁻¹. Povh e Ono (2005) observaram para *Salvia officinalis*, que GA₃ a 100 mg L⁻¹ promoveu aumento significativo no comprimento da parte aérea e acúmulo de massa seca de caule.

Massa seca da parte aérea

Os resultados mostram que o tratamento com GA₃ apresentou maior rendimento de massa seca da parte aérea em relação aos demais tratamentos, em todas as épocas de avaliação (Tabela 5). Este resultado provavelmente, tenha acontecido devido ao maior crescimento do caule e acúmulo de massa seca de caule observado. A produção de massa seca da parte aérea em plantas medicinais é muito importante por estar relacionada com a produção de óleo essencial, ou seja, quanto maior a produtividade de massa seca da parte aérea, maior será a produção de óleo (Czepak, 1998).

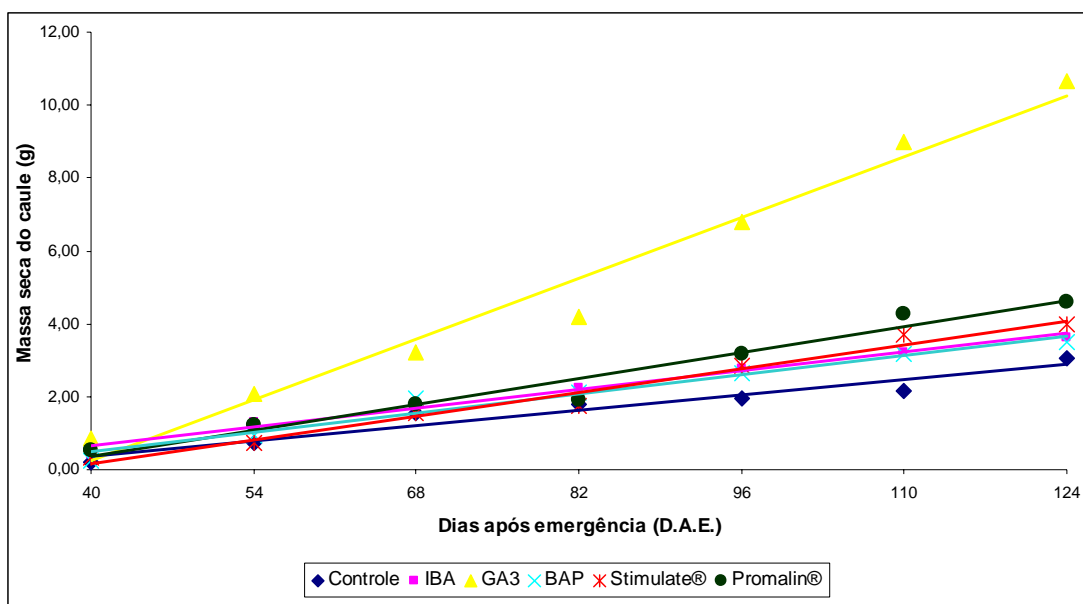
O tratamento com IBA e Stimulate® também promoveu maior acúmulo de massa seca da parte aérea na maioria das avaliações realizadas e este resultado deve estar relacionado com a maior expansão foliar promovida por estes tratamentos e maior acúmulo de massa seca de folhas.

Todos os tratamentos apresentaram crescimento linear, com maior acúmulo de massa seca da parte aérea aos 124 D.A.E. (Figura 5), mostrando que este período para plantas tratadas com GA₃ a coleta da parte aérea para a extração de óleos essenciais poderia ser realizada sem prejuízo na produção.

Tabela 4. Massa seca média de caule (g) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais e bioestimulantes nas sete épocas de coleta.

Tratamentos ¹	D.A.E.						
	40	54	68	82	96	110	124
Controle	0,19 A	0,74 B	1,56 B	1,79 B	1,96 C	2,14 D	3,04 D
IBA	0,40 A	1,29 B	1,82 B	2,23 B	2,76 B	3,22 C	3,64 D
GA ₃	0,86 A	2,08 A	3,21 A	4,17 A	6,80 A	8,97 A	10,67 A
BAP	0,24 A	0,94 B	1,96 B	2,10 B	2,65 B	3,17 C	3,48 D
Stimulate®	0,31 A	0,75 B	1,56 B	1,74 B	2,85 B	3,69 C	3,99 C
Promalin®	0,51 A	1,21 B	1,81 B	1,92 B	3,18 B	4,28 B	4,61 B
Média	0,42	1,17	1,99	2,66	3,70	4,58	6,07
C.V. (%)	12,56						

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade



Tratamentos	Modelo ajustado ¹	R ²
Controle	$\hat{Y} = -0,829 + 0,030X$	0,94
IBA	$\hat{Y} = -0,838 + 0,037X$	0,99
GA ₃	$\hat{Y} = -1,434 + 1,671X$	0,98
BAP	$\hat{Y} = -1,028 + 0,038X$	0,97
Stimulate®	$\hat{Y} = -1,681 + 0,046X$	0,98
Promalin®	$\hat{Y} = -1,636 + 0,051X$	0,97

P < 0,001: para todos os modelos ajustados

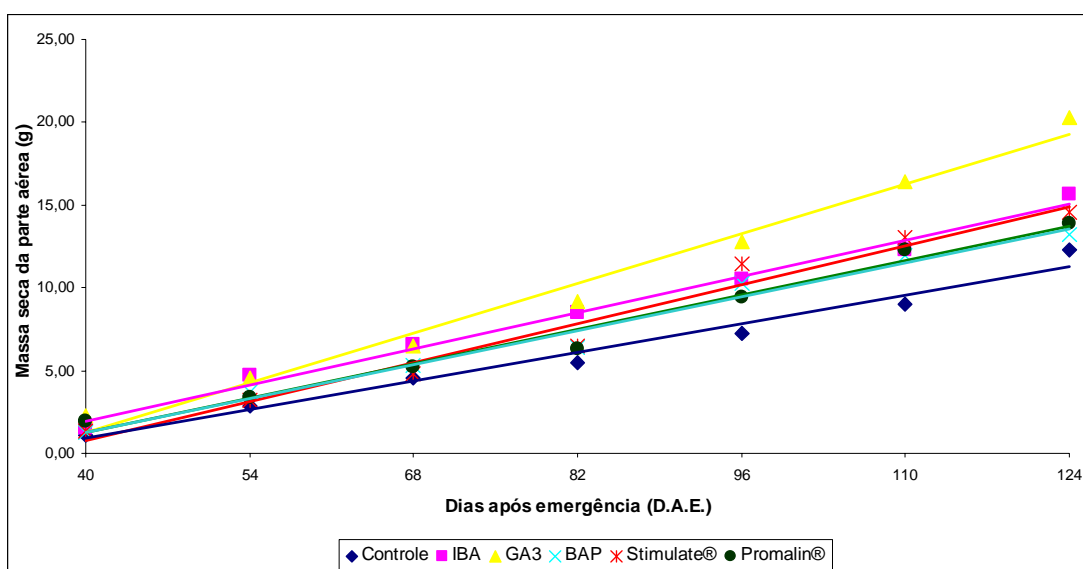
¹ $\hat{Y} = a + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$

Figura 4. Massa seca do caule (g) de plantas de *Salvia officinalis* L. submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais: IBA, GA₃ e BAP e bioestimulantes: Stimulate® e Promalin®, em função de sete coletas, realizadas a intervalos de 14 dias.

Tabela 5. Massa seca média da parte aérea (g) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais e bioestimulantes nas sete épocas de coleta.

Tratamentos ¹	D.A.E.						
	40	54	68	82	96	110	124
Controle	1,10 B	2,90 B	4,58 B	5,49 D	7,25 E	9,04 D	12,29 E
IBA	1,52 B	4,69 A	6,55 A	8,54 B	10,53 C	12,25 C	15,62 B
GA ₃	2,24 A	4,54 A	6,51 A	9,21 A	12,79 A	16,41 A	20,33 A
BAP	1,28 B	3,68 B	5,20 B	6,38 C	10,30 C	11,94 C	13,19 D
Stimulate®	1,37 B	3,17 B	4,81 B	6,49 C	11,47 B	13,04 B	14,57 C
Promalin®	1,97 A	3,33 B	5,18 B	6,33 C	9,45 D	12,29 C	13,89 D
Média	1,58	3,72	5,47	7,41	10,63	12,83	16,15
C.V. (%)	5,88						

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade



Tratamentos	Modelo ajustado ¹	R ²
Controle	$\hat{Y} = -4,059 + 0,124X$	0,98
IBA	$\hat{Y} = -4,316 + 0,157X$	0,99
GA ₃	$\hat{Y} = -1,748 + 3,009X$	0,98
BAP	$\hat{Y} = -4,573 + 0,146X$	0,98
Stimulate®	$\hat{Y} = -5,957 + 0,168X$	0,97
Promalin®	$\hat{Y} = -4,627 + 0,148X$	0,98

P < 0,001: para todos os modelos ajustados

¹ $\hat{Y} = a + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$

Figura 5. Massa seca da parte aérea (g) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais: IBA, GA₃ e BAP e bioestimulantes: Stimulate® e Promalin®, em função de sete coletas, realizadas a intervalos de 14 dias.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento de plantas de *Salvia officinalis* L. tratadas com reguladores vegetais e bioestimulantes, avaliado através de medidas biométricas como: a altura da planta, área foliar e produção de massa seca de caule, folha e parte aérea, indicaram que plantas tratadas com IBA e GA₃ promoveram maiores incrementos na produtividade vegetal, principalmente, na formação da parte aérea.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro concedido para a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEONI, B.; BOSQUEIRO, M.; ROSSI, M. Estudo dos reguladores vegetais de stimulate no desenvolvimento e produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Publicatio UEPG**, v. 6, p. 23-35, 2000.

ÁVILA, M.R. **Teores de óleo, proteínas e isoflavonas, qualidade das sementes e utilização de bioestimulante em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 2006. 107p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

BRACCINI, A.L.; MONFERDINI, M.A.; ÁVILA, M.R.; SCAPIM, C.A.; BRAMBILLA, D.; ARAGÃO, R.M.; BRAMBILLA, T. Emergência das plântulas e componentes da produção de sementes em resposta a diferentes doses e formas de aplicação do bioestimulante Stimulate 10X na cultura da soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 27, Cornélio Procópio, 2005. **Resumos Expandidos...** Londrina: Embrapa Soja, 2005. p. 565-566.

CASTRO, P.R.C.; PACHECO, A.C.; MEDINA, C.L. Efeitos de Stimulate e de micro-citros no desenvolvimento vegetativo e na produtividade da laranjeira 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Scientia Agricola**, v. 55, p. 338-341, 1998.

CASTRO, P.R.C.; VIEIRA, E.L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. 132p.

CZEPAK, M.P. Produção de óleo bruto e mentol cristalizável em oito frequências de colheita da menta (*Mentha arvensis* L.). In: MING, C. L. et al. (Coord.). **Plantas medicinais**,

aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agronômica. Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, 1998, p. 53-80.

DAHAB, A.M.A.; ELDABH, R.S.; SALEM, M.A. Effect of gibberellic acid on growth, flowering and constituents of *Chrysanthemum frutescens*. **Acta Horticulture**, v. 205, p. 129-135, 1987.

DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: DAVIES, P. J. (Ed). **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. London: Kluwer Academic Publishers, 1995. 833p.

EID, M.N.A.; ABMED, S.S. Preliminary studies on the effect of gibberellic acid and cycocel on the growth and essential oil content of *Ocimum basilicum* L. **Egyptian Journal Horticulture**, v. 3, p. 83-87, 1976.

EL-KELTAWI, N.E.; CROTEAU, R. Influence of ethephon and daminozid on growth and essential oil content of peppermint and sage. **Phytochemistry**, v. 25, p. 1285-1288, 1986.

EL-KHATEEB, M.A. Effect of some growth regulators on the vegetative growth and essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. plant. **Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo**, v. 40, p. 333-346, 1989.

EL-KHATEEB, M.A.; BADAWY, E.M.; BOSELAH, A.E. Effect of some growth regulators on growth, chemical composition and essential oil of *Ruta graveolens* L. plants. **Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo**, v. 42, p. 829-848, 1991.

EL-SAHHAR, K.F.; FOUAD, M.K.; FAHMI, R.; RAID, F. Effect of gibberellic acid (GA_3) on some botanical and chemical characteristics of basil (*Ocimum basilicum* L.). **Annals of Agricultural Science**, Cairo, v. 29, p. 401-414, 1984.

FAROOQI, A.A.; DEVIAH, K.A.; VASUNDHARA, M. Effect of some growth regulators and pinching on growth, yield and essential oil content of davana (*Artemisia pallens* Wall). **Indian Perfumer**, v. 37, p. 19-23, 1993.

FERREIRA, D.F. **Sistema de análise de variância (SISVAR)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1999. ver 4.3 (Build 43).

HAIKAL, M.; BADR, M. Effect of some GA_3 and CCC treatments on the growth and oil quantity and quality of chamomile. **Egyptian Journal of Horticulture**, v. 9, p. 117-123, 1982.

MAHMOUD, S.E.D.M.; SHETTY, K. Response of growth and essential oil content of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) to some natural hormones. **Acta Horticulture**, v. 426, p. 629-634, 1996.

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

- MILLÉO, M.V.R.1; VENÂNCIO, W.S.1; MONFERDINI, M.A. Avaliação da eficiência agrônômica do produto Stimulate aplicado no tratamento de sementes e no sulco de plantio sobre a cultura do milho (*Zea mays* L.). **Arquivos Instituto Biológico**, v. 67, p. 1-145, 2000.
- POVH, J.A. **Efeitos de reguladores vegetais no desenvolvimento de plantas de *Salvia officinalis* L. e na produção de óleo essencial**. 2004. 93p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- POVH, J.A.; ONO, E.O. Rendimento de óleo essencial de *Salvia officinalis* L. sob ação de reguladores vegetais. **Acta Scientiarum, Biological Science**, v. 28, p. 189-193, 2006.
- REICHLING, J.; BECKER, H.; VOMEL, A. Herbizide im Kamillenanbau (*Matricaria chamomilla* L.). **Planta Médica**, v. 32, p. 235-242, 1977.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4. ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682p.
- SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.
- SERAFINI, L.A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AEVEDO, J.L. (Eds). Guaíba, RS: Agropecuária. p. 333-377, 2001.
- SHEDEED, M.R.; EL-GAMASSY; K.M.; HASHIM; M.E.; KANDEEL, A.M. Physiological studies on the growth, oil yield and chemical constituents in basil plant, *Ocimum basilicum* L. **Annals of Agricultural Science**, Cairo, v. 35, p. 971-979, 1990.
- SHUKLA, A.; FAROOQI, A.H.A.E. Review: utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. **Current Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 12, p. 152-177, 1990.
- SINGH, P.; MISRA, A. Influence of giberellin and ethrel on growth, chlorophyll content, protein, enzyme activities and essential monoterpene oil in an efficient genotype of *Mentha spicata* var. MSS5. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science**, v. 22-23, p. 283-286, 2001.
- STAHL, E.; WOLLENSAH, A. Observations on the function of the glandular hairs of yarrow: 4th report: effects of selective herbicides on the glandular hairs tissue of the florest. **Journal of Plant Physiology**, v. 122, p. 93-96, 1986.
- STOWE, B.B. e YAMAKI, T. Gibberellins stimulants of plant growth. **Science**, v. 129, p. 807-811, 1959.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 705p.

- TECCHIO, M.A.; PAIOLI-PIRES, E.J.; RODRIGUES, J.D.; VIEIRA, C.R.Y.I.; TERRA, M.M.; BOTELHO, R.V. Aplicação de bioestimulante nas características ampelométricas da infrutescência da videira 'tieta'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 300-303, 2005.
- TOMKINS, J.P; HALL, M.H. Stimulation of alfafa bud and shoot development with cytokinins. **Agronomy Journal**, v. 83, p. 77-81, 1991.
- UMESHA, K.; BOJAPPA, K.M.; FAROOQI, A.A.; SUBBAIAH, T. Effect of gibberellic acid and cycocel on growth, yieed and quality of clocimum (*Ocimum gratissimum* L.). **Indian Perfumer**, v. 35, p. 53-57, 1991.
- VIEIRA, E.L.; CASTRO, P.R.C. **Ação de bioestimulante na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Cosmópolis: Stoller do Brasil, 2004. 74p.
- VIEIRA, E.L.; CASTRO, P.R.C. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, p. 222-228, 2001.

CAPÍTULO II

**REGULADORES E BIOESTIMULANTES VEGETAIS NO TEOR E COMPOSIÇÃO
DE ÓLEO ESSENCIAL EM PLANTAS DE
Salvia officinalis L.**

REGULADORES E BIOESTIMULANTES VEGETAIS NO TEOR E COMPOSIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL EM PLANTAS DE *Salvia officinalis* L.

RESUMO - O presente estudo objetivou avaliar o rendimento e a composição do óleo essencial em plantas de *Salvia officinalis* L. com a aplicação de reguladores e bioestimulantes vegetais em duas épocas de coleta. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sendo as plantas tratadas com os seguintes tratamentos: 1- controle (água); 2- IBA a 100 mg L⁻¹; 3- GA₃ a 70 mg L⁻¹; 4- benzilaminopurina (BAP) a 70 mg L⁻¹; 5- GA₃+cinetina+IBA - Stimulate[®] a 1% e 6- GA₄₊₇+N-(fenilmetil)-1-purina-6-amina - Promalin[®] a 100 mg L⁻¹. Foram realizadas quatro aplicações, sendo a primeira 25 dias após a emergência (D.A.E.), a segunda, a terceira e a quarta aplicações foram realizadas aos 10, 20 e 30 D.A.E., respectivamente. A produção de massa seca da parte aérea e rendimento do óleo essencial foi avaliada aos 90 e 120 D.A.E. Os resultados revelaram que o IBA foi o tratamento mais efetivo no aumento da produção de óleo essencial, porém GA₃, BAP e o bioestimulante Stimulate[®] também influenciaram positivamente no acúmulo de óleo essencial; o maior rendimento de óleo essencial foi obtido aos 120 D.A.E. Os reguladores e bioestimulantes vegetais, assim como a época de coleta, não alteraram os componentes químicos do óleo essencial.

Palavras-chave: Lamiaceae, ácido giberélico, auxina, cânfora, tujona

PLANT GROWTH REGULATORS AND BIOSTIMULANTS ON THE ESSENTIAL OIL CONTENT AND COMPOSITION IN *Salvia officinalis* L. PLANTS

ABSTRACT – This study aimed at evaluating essential oil yield and composition in *Salvia officinalis* L. plants under application of plant growth regulators and biostimulants at two harvesting times. The experiment was carried out in a greenhouse and plants were subjected to the following treatments: 1- control (water); 2- IBA 100 mg L⁻¹; 3- GA₃ 70 mg L⁻¹; 4- benzylaminopurine (BAP) 70 mg L⁻¹; 5- GA₃+kinetin+IBA - Stimulate[®] 1%; and 6- GA₄₊₇+N-(phenylmethyl)-1H-purine-6-amine - Promalin[®] 100 mg L⁻¹. Treatments were sprayed four times: the first, at 25 days after emergence (D.A.E.); the second, third and fourth, at 10, 20 and 30 D.A.E., respectively. Shoot dry matter and essential oil yield were assessed at 90 and 120 D.A.E. IBA was the most effective treatment in increasing essential oil yield; however, GA₃, BAP and the biostimulant Stimulate[®] also positively influenced the essential oil accumulation. The highest essential oil yield was obtained at 120 D.A.E. Plant

growth regulators, biostimulants and harvesting time did not alter the chemical components of the essential oil.

Key words: Lamiaceae, gibberellic acid, auxin, camphora, thujona

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais e aromáticas têm uma grande importância para a indústria farmacêutica e para a medicina tradicional em vários países. *Salvia officinalis* L. é uma planta medicinal muito popular que há décadas vem sendo estudada, devido aos seus componentes antioxidantes presentes nas folhas (Chipault et al., 1956; Farag et al., 1989; Lamaison et al., 1990; Schwarz e Ternes, 1992; Cuvelur et al., 1994; Hohmann et al., 1999; Baricevic e Bartol, 2000). É amplamente usada na medicina para tratamentos de vários grupos de doenças e muitas pessoas usam na preparação de alimentos (Chipault et al., 1952; Cuvelier et al., 1996). Dentre suas propriedades terapêuticas, destacam-se: a emenagoga, diaforética, germicida, antiinflamatória, antioxidante e adstringente (Evans, 1991; Hertwig, 1991; Costa, 1994).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que, aproximadamente, 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam as plantas medicinais para atendimento primário da saúde, especialmente a medicina tradicional, da qual a maior parte envolve o uso de extratos vegetais ou seus princípios ativos (Farnsworth et al., 1991).

Atualmente, na agricultura tem-se incluído além das plantas convencionais, as plantas cujos metabólitos secundários são valorizados por suas características aromáticas ou terapêuticas, ou matéria-prima natural para perfumarias e indústria química. A agroindústria tem investido em pesquisas de óleos essenciais em plantas para aumentar a qualidade do óleo (Sangwan et al., 2001).

O valor comercial das plantas medicinais e aromáticas tem refletido, qualitativa e quantitativamente, na produção de seu óleo. Pesquisas realizadas com algumas espécies cultivadas no Brasil demonstraram que o rendimento e a qualidade dos óleos obtidos equivalem e, em alguns casos, superam o padrão mundial. A região do Mediterrâneo e Estados Unidos são os principais produtores de *Salvia officinalis* L.; no Brasil foi aclimatada e tem sido cultivada, principalmente na região Sul (Serafini e Cassel, 2001).

Salvia officinalis L. contém óleo essencial constituído, principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos, sendo estes sintetizados nas células dos tricomas glandulares e armazenados no interior de uma cápsula situada no ápice do tricoma glandular; é obtido das

folhas e das unidades florais e, tradicionalmente extraído por arraste de vapor com rendimento variando de 0,5 a 1,1% (Duke, 2002). O óleo essencial de *S. officinalis* já foi caracterizado em vários estudos e verificado pouca variação dos componentes majoritários: **tujona** e **cânfora** e estes compostos constituintes do óleo essencial são biologicamente ativos e possuem ação tóxica e farmacológica (Duke, 2002).

Atualmente, existe crescente preocupação com relação à produção de espécies com propriedades aromáticas e medicinais, pois além da produção quantitativa de biomassa, é importante a obtenção de óleo com riqueza de princípios ativos nele contido. Por isso, diferentes aspectos de cultivo devem ser levados em consideração para que se possam produzir plantas com quantidades satisfatórias de óleo essencial, mas com as qualidades necessárias. Além disso, o conhecimento da composição química de óleos essenciais tem sido utilizado em estudos de taxonomia e filogenia, uma vez que, a variação na composição do óleo é extremamente dependente das características genéticas de cada espécie somadas as características ambientais (Gottlieb e Salatino, 1987; Martins, 1996).

Os reguladores vegetais são amplamente usados na agricultura devido à influência positiva no aumento e na qualidade das colheitas (Nickell, 1982), sendo amplamente testados em frutos e vegetais de importância econômica (Audus, 1972); embora o uso dos reguladores vegetais na agricultura tenha mostrado grande potencial no aumento da produtividade, sua utilização ainda não é prática usual em plantas aromáticas e medicinais (Reinchling et al., 1977; El-Keltawi e Croteau, 1986, 1987; Stahl e Wollensah, 1986).

Os reguladores vegetais podem influenciar nas respostas de muitos órgãos da planta, porém essa resposta depende de alguns fatores como: a espécie, parte da planta, estágio de desenvolvimento, concentração, interação entre outros reguladores e vários fatores ambientais estão ainda envolvidos em processos de desenvolvimento de um órgão ou tecido vegetal (Salisbury e Ross, 1992). A aplicação exógena de reguladores vegetais pode modificar o comportamento de uma planta, alterando sua produtividade, como o seu metabolismo secundário, aumentando ou diminuindo o teor de óleo essencial e seus constituintes (Shukla e Farooqi, 1990).

No Brasil são poucos os estudos sobre o efeito de diferentes reguladores vegetais, na produção de biomassa e de metabólitos secundários em plantas medicinais. Portanto, os esforços na busca de substâncias ativas que possam aumentar a produção das plantas medicinais e aromáticas visando à produção de óleos essenciais são de grande importância, principalmente, quando se considera a dependência da indústria farmacêutica nacional à importação de matéria-prima nesta área que chega a 80% (Ming, 1992).

Além do uso dos reguladores vegetais de modo isolados como substâncias ativas para a promoção do desenvolvimento vegetal, produtos como os bioestimulantes estão em destaque. Bioestimulante é a mistura de reguladores vegetais ou de um ou mais reguladores com outros compostos de natureza bioquímica diferente; esse produto químico pode, em função da sua composição, concentração e proporção das substâncias, promover o crescimento e desenvolvimento vegetal (Castro e Vieira, 2001).

A aplicação agrícola de reguladores e bioestimulantes vegetais está se tornando prática de grande destaque, aprimorando de forma significativa a produção de laranja 'Pêra' (Castro et al., 1998), feijão, milho, arroz e soja (Alleoni et al., 2000; Milléo et al., 2000; Vieira e Castro, 2001; Vieira e Castro, 2004; Braccini et al., 2005) e o número de bagas em videira (Tecchio, 2005), sendo os resultados obtidos até o momento com o uso dessa técnica, bastante promissora (Vieira e Castro, 2004).

Atualmente, no mercado são encontradas formas prontas de bioestimulantes e, dentre as opções disponíveis, o Stimulate® é um bioestimulante que apresenta em sua composição 0,009% de cinetina (citocinina), 0,005% de ácido giberélico (giberelina) e 0,005% de ácido indolilbutírico (auxina) e, de acordo com Castro et al. (1998), atua no crescimento e no desenvolvimento vegetal, estimulando a divisão celular, a diferenciação e o alongamento das células, com aumento também da absorção e utilização dos nutrientes, sendo especialmente eficiente quando aplicado com fertilizantes foliares. Outro bioestimulante é o Promalin® que é uma mistura de GA₄₊₇ + N-(fenilmetil)-1-purina-6-amina, mistura de duas giberelinas e uma citocinina, respectivamente.

Desse modo, os diversos estudos demonstram que a aplicação de reguladores vegetais pode promover alterações no acúmulo e composição química do óleo essencial, no entanto, o conhecimento do efeito dessas substâncias na fisiologia do desenvolvimento de várias espécies aromáticas e medicinais nativas ou cultivadas no Brasil se faz necessário, podendo corroborar, principalmente com a aclimatação de espécies exóticas.

Assim, o presente estudo objetivou avaliar a aplicação de reguladores e bioestimulantes vegetais sobre o rendimento e a composição do óleo essencial em plantas de *Salvia officinalis* L., em duas épocas de coleta.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido entre setembro de 2005 e fevereiro de 2006 em casa de vegetação do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, da Universidade Estadual

Paulista, UNESP, Botucatu, SP. A época da implantação deste experimento coincidiu com temperaturas mais quentes exigidas para esta espécie, de acordo com Martins et al. (1998).

O solo usado no presente experimento apresentava as seguintes características químicas: pH $\text{CaCl}_2 = 5,61$; M.O. = $22,66 \text{ g kg}^{-1}$; P = $22,8 \text{ mg dm}^{-3}$; H+Al = $34,1$, K = $5,12$, Ca = $43,56$, Mg = $17,65$, SB = $66,3$, CTC = $100,4 \text{ mmole dm}^{-3}$ e V% = 66 . A análise química do solo foi determinada pelo Departamento de Recursos Naturais, Setor: Ciência do Solo, da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu, SP.

As plantas foram obtidas de sementes já tratadas com thiram (dissulfeto tetrametil – tiuram) que foram semeadas diretamente em vasos com capacidade de 12 litros, com terra corrigida (calagem – $9,12 \text{ g vaso}^{-1}$ de calcáreo dolomítico) e adubada conforme a análise química do solo ($15,85 \text{ g vaso}^{-1}$ de superfosfato simples; nitrogênio $2,4 \text{ g vaso}^{-1}$; não houve necessidade de adição de potássio; 10% do volume do vaso de matéria orgânica, esterco de vaca). Além disso, foi realizada adubação de cobertura com solução completa de Hoagland (200 mL vaso^{-1}), uma vez por semana, 65 dias após a emergência. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas sempre que necessário. A temperatura máxima dentro da casa de vegetação, durante a condução do experimento 27°C e a mínima 16°C .

Procedeu-se aos tratamentos das plantas de *S. officinalis* com as seguintes substâncias: 1 – controle (água); 2 – ácido 4-(3-indolil)butírico (IBA) a 100 mg L^{-1} ; 3 – ácido giberélico (GA_3) a 70 mg L^{-1} ; 4 – benzilaminopurina (BAP) a 70 mg L^{-1} ; 5 – ácido giberélico (GA_3) + cinetina (Kt) + ácido indolilbutírico (IBA) – Stimulate[®] a 1% e 6 – $\text{GA}_4 + \text{GA}_7$ + N-(fenilmetil) – 1-purina-6-amina – Promalin[®] a 100 mg L^{-1} . Os tratamentos 2, 3 e 4 são reguladores vegetais; os tratamentos 5 e 6 são bioestimulantes.

Como fonte de ácido 4-(3-indolil)butírico (IBA) foi utilizado o produto p.a. da Vetec química Fina Ltda. e como fonte de benzilaminopurina (BAP) foi utilizado o produto p.a. da Sigma. O ácido giberélico (GA_3) foi utilizado na forma do produto comercial Pro-Gibb contendo 10% de GA_3 , da Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.; a mistura de ácido giberélico (GA_3) + cinetina (Kt) + ácido indolilbutírico (IBA) foi utilizada na forma do produto comercial Stimulate[®] contendo 90 mg L^{-1} de cinetina (Kt), 50 mg L^{-1} de IBA e 50 mg L^{-1} de GA_3 por litro do produto, fabricado pela Stoller do Brasil S.A.; a mistura de giberelinas (GA_{4+7}) + N-(fenilmetil)–1-purina-6-amina foi utilizada na forma do produto Promalin[®] contendo 1,8% de GA_{4+7} e 1,8% de N-(fenilmetil)–1-purina-6-amina, fabricado pela Abbot Laboratories.

A aplicação dos tratamentos foi realizada através de pulverização foliar, utilizando pulverizador manual, com pressão constante de 40 libras, equipado com lança contendo um

bico leque tipo 110°02, que proporcionou volume de 310 mL de calda por m²; nas soluções de tratamento foram adicionados espalhante adesivo não iônico, alquil-fenol-poliglicoléter, o produto comercial Extravon na dose de 0,5 mL L⁻¹ de solução, fabricado pela Ciba-Geigy Química S/A. Foram realizadas quatro aplicações, sendo a primeira 25 dias após a emergência (D.A.E.), a segunda, a terceira e a quarta aplicações foram realizadas aos 10, 20 e 30 D.A.E., respectivamente.

Para a análise do rendimento do óleo essencial toda a parte aérea das plantas (caules e folhas mais pecíolos) foi coletada em duas épocas, aos 90 e 120 D.A.E. Esse material foi seco para a determinação da massa seca total em estufa de circulação forçada de ar à 35°C (o óleo essencial é volátil em temperaturas superiores), até obtenção de massa seca constante. A seguir, o material seco foi submetido à hidrodestilação, utilizando-se aparelho tipo Clevenger, durante duas horas para extração do óleo, possibilitando o cálculo de seu rendimento, em mL 100g⁻¹ de massa seca (MS); o óleo foi acondicionado em vidro âmbar e armazenado em freezer, à temperatura de -20°C até o momento da análise qualitativa do óleo.

Para a análise da composição do óleo essencial a identificação das substâncias foi conduzida em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM, Shimadzu, QP-5000), dotado de coluna capilar de sílica fundida OV-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.), operando por impacto de elétrons (70eV.). A condição de análise ocorreu com injetor a 240°C; Detector a 230°C; com gás de arraste, Hélio; vazão: 1,7 mL min⁻¹; diluição: 2µL; split: 1/30; programa de temperatura: 50°C (5 min.) – 120°C, 3°C/minuto; 120°C – 280°C, 10°C/minuto. A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massa com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 libr.) e literatura (McLafferty e Stauffer, 1989) e índice de retenção (Adams, 2001). Os índices de retenção (IR) das substâncias foram obtidos através da co-injeção da amostra com série homóloga de n-alcenos (C₉H₂₀ – C₂₅H₅₂, Sigma – Aldrich, 99%) no seguinte programa de temperatura: 60°C – 240°C, 3°C/min. (Adams, 2001), aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (Van den Dool e Kratz, 1963).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, consistindo de seis tratamentos e três repetições e duas épocas de coleta, aos 90 e 120 D.A.E. Para o estudo qualitativo do óleo essencial os resultados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Scott-Knott (1974), utilizando-se ao nível de 5% de probabilidade e as demais características utilizando-se ao nível de 1% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teor de óleo essencial

Os resultados do teor de óleo essencial apresentados na Tabela 1 revelam que as plantas de *Salvia officinalis* L., tratadas com reguladores e bioestimulantes vegetais, assim como a época de coleta influenciaram no teor de óleo essencial.

Os maiores valores do teor de óleo aos 90 D.A.E. foram obtidos em plantas tratadas com IBA e Stimulate®, um bioestimulante que também apresenta IBA na sua composição. O aumento no teor do óleo em plantas tratadas com IBA deve estar relacionado com o efeito deste regulador vegetal na promoção do crescimento das plantas, principalmente, por promover o alongamento celular (Taiz e Zeiger, 2006). Os resultados apresentados neste trabalho assemelham-se aos descritos por Trease e Evans (1978), que descrevem que em plantas de *Mentha piperita* tratadas com auxina ocorreu aumento na produção de óleo. O mesmo resultado, também foi obtido por Mahmoud e Shetty (1996) em plantas de *Ocimum basilicum* L. com a aplicação de ácido indolil-3-acético (IAA) que promoveu aumento no teor de óleo essencial, mas inibição do crescimento da planta.

De acordo com Castro et al. (1998), o Stimulate® atua no crescimento e no desenvolvimento vegetal, estimulando a divisão celular, a diferenciação e o alongamento das células, com aumento também da absorção e da utilização dos nutrientes, sendo especialmente eficiente quando aplicado com fertilizantes foliares. No presente trabalho, o aumento no teor de óleo essencial promovido pelo Stimulate® pode estar relacionado com a interação entre os reguladores vegetais (GA₃ + cinetina + IBA). Estudos realizados por Povh e Ono (2006) demonstraram que a aplicação de Stimulate® a 2% em plantas de *Salvia officinalis* L. promoveu aumento no crescimento e rendimento do óleo essencial.

Aos 120 D.A.E. plantas de todos os tratamentos apresentaram aumento significativo no teor de óleo essencial comparado às plantas controle (Tabela 1). As plantas tratadas com IBA, novamente, apresentaram o maior teor de óleo essencial e àquelas tratadas com GA₃, BAP e Stimulate® também apresentaram aumento no teor de óleos essenciais em comparação à testemunha. Os resultados apresentados nesta coleta demonstram que os tratamentos com IBA, GA₃, BAP e Promalin® promoveram melhor produção de óleo em relação à coleta realizada aos 90 D.A.E. Isso mostra que a coleta do material vegetal para a extração do óleo essencial, posteriormente, leva ao maior acúmulo de óleo nos tecidos vegetais.

Também pode estar relacionado com o desenvolvimento da planta, já mais desenvolvida aos 120 D.A.E., uma vez que, a produção de óleos essenciais em plantas de *Salvia officinalis*, está diretamente associada à presença de estruturas secretoras

especializadas, os tricomas glandulares (Venkatachalam *et al.*, 1984) e o teor e a composição do óleo essencial podem variar durante o desenvolvimento dessas estruturas (Henderson *et al.*, 1970). Além disso, a produção de óleo está condicionada a diversos outros fatores. Segundo Correa Júnior *et al.* (1992), a produção de óleos essenciais pode ser influenciada por fatores endógenos ou genéticos, fatores externos como temperatura, pluviosidade, vento, solo, latitude e altitude que interferem de forma significativa na síntese dos metabólitos secundários e fatores técnicos, como forma de plantio, adubação, tratos culturais e época de colheita que também têm sua importância, tanto na produção de biomassa como no teor de princípios ativos.

De acordo com Simões (1999), a variação no teor do óleo essencial pode estar relacionada também com o ciclo vegetativo, ou seja, o teor e a concentração de cada um dos compostos do seu óleo essencial podem variar durante o desenvolvimento do vegetal.

O aumento no teor de óleo promovido pelo GA₃ pode ter ocorrido em resposta aos efeitos deste, sobre o crescimento das plantas, promovendo o alongamento do caulem, aumento no número de ramificações (Taiz e Zeiger, 2006) e promovendo a síntese de compostos secundários (Krishnamoorthy, 1979). As giberelinas são ativas na estimulação do alongamento caulinar (Stratford, 1978) e muitos estudos já demonstraram que o uso de giberelinas em espécies aromáticas e medicinais resulta em aumento notável dos entrenós, no acúmulo de matéria orgânica, aumento ou diminuição no teor de óleo essencial e alterações nos constituintes químicos do óleo (Krys'kov e Shkurat, 1961; Tronchet, 1961; Povh e Ono, 2007).

Os resultados encontrados neste trabalho assemelham-se aos encontrados por El-Khateeb (1989) que observou aumento no crescimento e na produção de óleo essencial com a aplicação de GA₃ na concentração de 50 mg L⁻¹ em plantas de *Rosmarinus officinalis* L. Umsha *et al.* (1991), estudando plantas de *Ocimum gratissimum* L., também verificaram aumento na produção de óleo essencial com a aplicação foliar de GA₃ na concentração de 100 mg L⁻¹. Povh e Ono (2006), em plantas de *Salvia officinalis* L., também observaram aumento na produção de óleo essencial com a aplicação exógena de GA₃.

No entanto, Mahmoud e Shetty (1996) relataram que a aplicação de GA₃ em *Ocimum basilicum* L. estimulou o crescimento vegetal, como a altura da planta, porém diminuiu o teor de óleo essencial. Em plantas de *Mentha piperita* a aplicação deste regulador vegetal também promoveu aumento no crescimento e acumulação do material orgânico, porém ocorreu diminuição do conteúdo de seu óleo essencial (Krys'kov e Shkurat, 1961). Esse fato pode ter ocorrido devido à utilização dos compostos orgânicos no crescimento, reduzindo a disponibilidade destes para a produção de óleos essenciais.

As plantas tratadas com BAP também apresentaram aumento significativo no teor de óleo essencial e esse resultado assemelha-se aos encontrados por El-Keltawi e Croteau (1987), que relatam que a aplicação foliar de citocinina promoveu aumento no crescimento e na produção de óleo em plantas de *Mentha piperita*, *M. spicata* e *Salvia officinalis*. Esses autores relatam ainda, que o aumento observado na produção de óleo pela planta pode ser atribuído, em parte, ao crescimento induzido pela citocinina. Já em plantas de *Ocimum basilicum* L. os autores Mahmoud e Shetty (1996) relataram que a aplicação de cinetina promoveu inibição do crescimento da planta, porém este regulador vegetal promoveu aumento no teor de óleo essencial.

Entretanto, Scavroni et al. (2006) descreveram para *Mentha piperita* L. aumento na produção de massa fresca com a aplicação exógena de citocinina (BAP a 50 mg L⁻¹), no entanto, menor teor de óleo essencial. Povh e Ono (2006) também descrevem redução no teor de óleo essencial com a aplicação de citocinina (BAP a 100 mg L⁻¹) em plantas de *Salvia officinalis*, podendo esta menor produção de óleos essenciais estar relacionada com a concentração de BAP utilizada, que não deve ter sido a ideal.

Frente às evidências de que os reguladores e bioestimulantes vegetais promovem alterações no teor de óleo essencial em plantas de *Salvia officinalis* L., descritas no presente trabalho, pode-se afirmar que essas substâncias influenciaram significativamente a produção de óleo essencial nas duas coletas realizadas, porém os maiores teores foram observados em plantas coletadas aos 120 D.A.E., indicando esta como a melhor época para a coleta destinada à extração do óleo. É importante ressaltar que plantas tratadas com IBA, apresentaram maior produção de óleo essencial nas duas épocas de coleta. Com base nos dados apresentados neste trabalho pode-se afirmar que o IBA é a substância com maior efeito no acúmulo do óleo essencial.

Tabela 1. Teor de óleo essencial de plantas de *Salvia officinalis* L. submetidas aos tratamentos com reguladores e bioestimulantes vegetais, em duas épocas de coleta (90 e 120 D.A.E.).

Tratamento ¹	Época de Coleta ²	
	90 D.A.E.	120 D.A.E.
Controle	0,70 B	0,80 D
IBA	0,80 A	1,07 A
GA₃	0,73 B	0,97 B
BAP	0,70 B	1,00 B
Stimulate®	0,80 A	0,97 B
Promalin®	0,73 B	0,90 C
CV(%)	4,5	

¹médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade.

²Significativo (< 0,0001) a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Composição do óleo essencial

Pela análise da composição do óleo essencial de plantas de *S. officinalis* foram identificados no estudo 10 compostos: *cis*-tujona, *trans*-tujona, cânfora, 1,8-cineol, α -humuleno, α -pireno, β -pireno, canfeno, borneol e acetado de bornila (Tabela 2).

De maneira geral, a análise qualitativa do óleo essencial de plantas de *Salvia officinalis* L. revela, em todos os tratamentos, que os compostos α -tujona e cânfora são majoritários e os compostos 1,8-cineol e β -tujona também representam teores relevantes na composição total do óleo essencial. Esses resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura como com Guillen et al. (1996) que relatam que os principais componentes do óleo de *S. officinalis* são: α -tujona, cariofileno, 1,8-cineol, α -humuleno e cânfora. Esse mesmo padrão é descrito por Drazic e Brkic (2001).

Aos 90 e 120 D.A.E. houve diferença significativa entre os tratamentos apenas para dois compostos minoritários da composição total do óleo essencial em plantas de *S. officinalis*: borneol e acetado de bornila. Plantas tratadas com o bioestimulante Promalin® apresentaram maior teor de borneol comparado aos demais tratamentos. O mesmo tratamento (Promalin®) promoveu também, aumento significativo no composto acetado de bornila, porém para este composto, o GA₃ também promoveu aumento significativo.

O borneol é o precursor direto da rota de biossíntese da cânfora, que é um composto majoritário encontrado no óleo de *S. officinalis*. Os resultados dos teores de borneol e cânfora parecem estarem de acordo com esta afirmação, uma vez que, principalmente aos 90 D.A.E., o teor de cânfora também foi maior no tratamento com Promalin®.

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, é possível sugerir que o Promalin®, um bioestimulante contendo giberelina e citocinina, possa estar diretamente relacionado com a promoção de aumento da parte aérea, principalmente alongamento do caule e expansão foliar promovida pela citocinina.

Segundo Croteau et al. (1981), a acumulação do óleo essencial depende das fases de desenvolvimento da planta. A origem da folha, sua expansão, total maturação e senescência tardia são importantes para a produção de óleo de valor comercial. A ontogenia também afeta a composição do óleo em *Salvia officinalis* L., assim, o teor de cânfora aumenta com a expansão da folha.

Os compostos majoritários do óleo não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Avaliando-se a média geral de cada composto, mostrado na Tabela 2, pode-se observar que aos 90 e 120 D.A.E. os compostos, respectivamente, representaram em média do volume final do óleo essencial de *S. officinalis*: 35,42% e 36,34% de *cis*-tujona, 8,53% e 7,59% de *trans*-tujona, 43,95% e 44,11% da soma dos isômeros *cis* e *trans*-tujona, 21,15% de cânfora e 14,35% de 1,8-cineol. Esses compostos são de extrema importância para diagnosticar a qualidade do óleo essencial para a espécie *Salvia officinalis* L., que de acordo com pesquisas realizadas com esta espécie cultivada no mundo todo, um óleo de alta qualidade deve conter alta percentagem de *cis* e *trans*-tujona e baixa proporção de cânfora.

Muitos autores descrevem padrões para a qualidade do óleo essencial de *Salvia officinalis* L. Assim, Guenther (1949) descreve que a alta qualidade de plantas de *S. officinalis* é uma combinação de vários fatores, como a coloração da folha (prata), teor de óleo essencial (>1,5%) e composição do óleo essencial; as plantas chegam ao máximo de produção no primeiro ano de crescimento. Putievsky et al. (1992) descrevem que a boa qualidade do óleo de *S. officinalis* deve conter alta porcentagem (>50%) de α - e β -tujonas e baixa proporção (<20%) de cânfora. Já Lawrence et al. (1971) e Croteau e Karp (1976) descrevem para o óleo essencial de *Salvia officinalis* L. a cânfora como o maior componente, correspondendo a cerca de 20% do óleo.

Vários estudos com *Salvia officinalis* L. cultivada no mundo todo revelam grande variação na constituição química do óleo essencial que é dependente da fertilização mineral do solo (Piccaglia e Marotti, 1993), intensidade de luz (Li et al., 1996), idade do órgão (Länger et al., 1993), condições climáticas (Máthé et al., 1992), sazonalidade (Putievsky et

al., 1986; Grella e Picci, 1988) e parte da planta (Perry et al., 1999). Por causa da ampla variação, os constituintes do óleo essencial de *S. officinalis*, algumas vezes, não se assemelham ao perfil do padrão definido pela ISO 9909 para óleo essencial oficial de *Salvia officinalis* L., que de acordo com Bruneton (1999) é: *cis*-tujona (18 a 43%), *trans*-tujona (3 a 8,5%), cânfora (4,5 a 24,5%), cineol (5,5 a 13%), humoleno (0-12%), α -pireno (1 a 6,5%), canfeno (1,5 a 7%), limoneno (0,5 a 3%), linalool (no máximo 1%) e acetato de bornila (2,5% no máximo).

A época de coleta não influenciou na resposta aos tratamentos com os reguladores vegetais (Tabela 3). De maneira geral, plantas controle apresentaram maior teor de *cis*-tujona (38,09%) e plantas tratadas com Promalin® apresentaram o menor teor (33,22%). Com relação aos outros componentes majoritários, plantas tratadas com IBA apresentaram maior valor médio de *trans*-tujona (9,00%); Stimulate® apresentou maior valor de cânfora (21,51%) e GA₃ maior valor de 1,8-cineol (14,46%).

É importante ressaltar que no cultivo de plantas aromáticas e medicinais, a preocupação não deve ser apenas com a produção de biomassa, mas também com a riqueza dos princípios ativos contidos. Por isso, o conhecimento da composição química de óleos essenciais tem sido utilizado nos estudos de óleo essencial. Além disso, diferentes aspectos de cultivo devem ser levados em consideração para que se possam produzir plantas medicinais com alta produtividade de óleos essenciais com as qualidades exigidas.

Portanto, com o resultado da análise qualitativa do óleo essencial extraído da parte aérea de plantas de *S. officinalis*, pode-se afirmar que o óleo apresentou alta qualidade em todos os tratamentos testados neste trabalho, em ambas as épocas de coleta para a efetiva extração, ou seja, aos 90 e 120 D.A.E.

Tabela 2. Composição do óleo essencial (%) de plantas de *Salvia officinalis* L. tratadas com reguladores e bioestimulantes vegetais aos 90 e 120 dias após a emergência (D.A.E.).

Componentes (%)	Tratamentos ¹													
	90 D.A.E.							120 D.A.E.						
	Controle	IBA	GA ₃	BAP	Stimulate®	Promalin®	média	controle	IBA	GA ₃	BAP	Stimulate®	Promalin®	média
<i>cis</i> -thujona	38,09	37,22	34,56	35,40	37,18	30,09	35,42 a	37,13	38,79	33,08	37,33	36,42	36,34	36,52 a
<i>trans</i> -thujona	8,39	10,73	5,05	8,21	8,45	10,36	8,53 a	8,08	7,26	8,22	6,82	7,60	7,57	7,59 a
Cânfora	19,16	19,77	22,71	21,43	20,65	23,18	21,15 a	21,61	20,90	21,59	20,52	23,01	22,31	21,66 a
1,8-cineol	14,55	13,50	15,81	13,97	13,66	14,70	14,35 a	13,55	12,94	14,95	14,38	13,57	13,70	13,85 a
A-humuleno	1,92	1,26	1,41	1,39	1,55	0,13	1,28 a	1,62	1,44	1,44	1,23	1,32	1,38	1,41 a
α -pineno	2,94	2,82	4,15	3,43	2,99	3,60	3,32 a	3,31	3,90	3,77	3,80	3,50	3,41	3,62 a
β -pineno	2,91	2,96	3,23	3,19	3,01	3,15	3,08 a	2,75	2,81	3,41	3,32	2,90	2,81	3,00 a
Caufeneno	4,59	4,82	5,73	5,72	5,10	6,25	5,37 a	5,04	5,26	5,95	5,92	5,46	5,89	5,59 a
Borneol	1,08 b	1,47 b	1,45 b	1,57 b	1,51 b	2,00 a	1,51	1,36 b	1,03 b	1,33 b	1,26 b	1,38 b	1,61 a	1,33
Acetato de bornila	0,14 b	0,37 b	0,79 a	0,40 b	0,42 b	0,73 a	0,48	0,37 b	0,35 b	0,82 a	0,39 b	0,37 b	0,61 a	0,49

¹médias seguidas da mesma letra entre as linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3. Composição do óleo essencial (%) de plantas de *Salvia officinalis* L. tratadas com reguladores e bioestimulantes vegetais aos 90 e 120 dias após a emergência (D.A.E.).

Época de coleta (D.A.E.) ¹	Componentes (%)									
	cis-thujona	trans-thujona	Cânfora	1,8-cineol	α -humuleno	α -pineno	β -pineno	Canfeno	Borneol	Acetato de bornila
	Controle									
90	38,09 A	8,39 A	19,16 A	14,55 A	1,92 A	2,94 A	2,91 A	4,59 A	1,08 A	0,14 A
120	37,13 A	8,08 A	21,61 A	13,55 A	1,62 A	3,31 A	2,75 A	5,04 A	1,36 A	0,37 A
Média	37,61	8,24	20,39	14,05	1,77	3,13	2,83	4,82	1,22	0,26
	IBA									
90	37,22 A	10,73 A	19,77 A	13,50 A	1,26 A	2,82 A	2,96 A	4,82 A	1,47 A	0,37 A
120	38,79 A	7,26 A	20,90 A	12,94 A	1,44 A	3,90 A	2,81 A	5,26 A	1,03 A	0,35 A
Média	38,01	9,00	20,34	13,22	1,35	3,36	2,89	5,04	1,25	0,36
	GA3									
90	34,56 A	8,21 A	21,43 A	13,97 A	1,39 A	3,43 A	3,19 A	5,72 A	1,57 A	0,79 A
120	33,08 A	8,22 A	21,59 A	14,95 A	1,44 A	3,77 A	3,41 A	5,95 A	1,33 A	0,82 A
Média	33,82	8,22	21,51	14,46	1,42	3,60	3,30	5,84	1,45	0,81
	BAP									
90	35,40 A	8,21 A	21,43 A	13,97 A	1,39 A	3,43 A	3,19 A	5,72 A	1,57 A	0,40 A
120	37,33 A	6,82 A	20,52 A	14,38 A	1,23 A	3,80 A	3,32 A	5,92 A	1,26 A	0,39 A
Média	36,37	7,52	20,98	14,18	1,31	3,62	3,26	5,82	1,42	0,40
	Stimulate®									
90	37,18 A	8,45 A	20,65 A	13,66 A	1,55 A	2,99 A	3,01 A	5,10 A	1,51 A	0,42 A
120	36,42 A	7,60 A	23,01 A	13,57 A	1,32 A	3,50 A	2,90 A	5,46 A	1,38 A	0,37 A
Média	36,80	8,03	21,83	13,62	1,44	3,25	2,96	5,28	1,45	0,40
	Promalin®									
90	30,09 A	10,36 A	23,18 A	14,70 A	0,13 A	3,60 A	3,15 A	6,25 A	2,00 A	0,73 A
120	36,34 A	7,57 A	22,31 A	13,70 A	1,38 A	3,41 A	2,81 A	5,89 A	1,61 A	0,61 A
Média	33,22	8,97	22,75	14,20	0,76	3,51	2,98	6,07	1,81	0,67
C.V.	12,18	39,07	10,44	10,64	24,65	20,37	14,41	14,66	22,51	32,87

¹médias seguidas da mesma letra, entre as colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

CONCLUSÕES

Plantas de *Salvia officinalis* L. tratadas com reguladores e bioestimulantes vegetais tiveram o teor do óleo essencial alterado, sendo que IBA foi o tratamento mais efetivo no aumento da produção de óleo essencial.

O maior rendimento de óleo essencial foi obtido aos 120 D.A.E. e os reguladores e bioestimulantes vegetais, assim como a época de coleta, não alteraram os componentes químicos do óleo essencial.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro concedido para a execução deste trabalho. Ao Laboratório de Produtos Naturais, IAC pela realização das análises quantitativas e qualitativas de óleo essencial. Ao Departamento de Produção Vegetal, Setor: Horticultura, da FCA, UNESP pela extração do óleo essencial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2001. 469p.
- ALLEONI, B.; BOSQUEIRO, M.; ROSSI, M. Estudo dos reguladores vegetais de stimulate no desenvolvimento e produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Publicatio UEPG**, v.6, p. 23-35, 2000.
- AUDUS, L.J. **Plant growth substances**. London: Leonard Hill, 1972. 533p.
- BARICEVC, D.; BARTOL, T. The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus V., Pharmacology. In: KINTZIOS, S.E. (Ed). **Sage: the genus Salvia**. Abingdon: Harwood Academic Publishers, 2000. p. 347-420.
- BRACCINI, A.L.; MONFERDINI, M.A.; ÁVILA, M.R.; SCAPIM, C.A.; BRAMBILLA, D.; ARAGÃO, R.M.; BRAMBILLA, T. Emergência das plântulas e componentes da produção de sementes em resposta a diferentes doses e formas de aplicação do bioestimulante Stimulate 10X na cultura da soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 27, Cornélio Procópio, 2005. **Resumos Expandidos...** Londrina: Embrapa Soja, 2005. p. 565-566.

- BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. London, UK: Intercept, 1999. 1119p.
- CASTRO, P.R.C., PACHECO, A.C., MEDINA, C.L. Efeitos de stimulate e de micro-citros no desenvolvimento vegetativo e na produtividade da laranjeira pêra. **Scientia Agrícola**, v. 55, p.338-341, 1998.
- CASTRO, P.R.C; VIEIRA, E.L. **Aplicação de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 132p.
- CHIPAULT, J.; MIZUMO, G.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, v. 17, p. 46-55, 1952.
- CHIPAULT, J.; MIZUMO, G.; LUNDBERG, W. The antioxidant properties of spices in foods. **Food Technology**, v. 10, p. 209-211, 1956.
- CORREA JÚNIOR, C; MING, LC; SCHEFFER, MC. **Cultivo de plantas medicinais condimentares e aromáticas**. 1 ed. Curitiba: Emater, 1991. 162 p.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994, 1031 p.
- CROTEAU, R.; KARP, F. Biosynthesis of monoterpenes: enzymatic conversion of nerly pyrophosphate to 1,8-cineole, α -terpienol, and cyclic monoterpene hydrocarbons by a cell-free preparation from sage (*Salvia officinalis*). **Archives of Biochemistry and Biophysical**, v. 176, p. 734-746, 1976.
- CROTEAU, R.; FELTON, M.; KARP, F.; KJONAAS, R. relationship of camphor biosynthesis to leaf development in sage (*Salvia officinalis*). **Plant Physiology**, v. 67, p. 820-824, 1981.
- CUVELIER, M, E.; BERSET, C.; RICHARD, H. antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 73, p. 645-652, 1996.
- CUVELIER, M.E.; BERSET, C.; RICHARD, H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 665-669, 1994.
- DRAZIC, S.; BRKIC, D. Variability of chemical properties of sage (*Salvia officinalis*). **Egyptian Journal of Horticulture**, v. 27, p. 459-478, 2001.
- DUKE, J.A. Biologically: active compounds important spices. In: CHARALAMBOUS, G. Spices, herbs and edible fungi. Amsterdam: Elsevir Publishers, 1994. **Egyptian Journal of Horticulture**, v. 27, n. 4, p. 459-478, 2002.
- EL-KELTAWI, N.E.; CROTEAU, R. Influence of ethephon and daminozid on growth and essential oil content of peppermint and sage. **Phytochemistry**, v. 25, p.1285-1288, 1986.

- EL-KELTAWI, N.E.; CROTEAU, R. Influence of foliar applied cytokinins on growth and essential oil content of several members of Lamiaceae. **Phytochemistry**, v. 26, p. 891-895, 1987.
- EL-KHATEEB, M.A. Effect of some growth regulators on the vegetative growth and essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. plant. **Bulletin Faculty of Agriculture, University of Cairo**, v. 40, p. 333-346, 1989.
- EVANS, W.C. **Farmacognosia**. México: Interamericana, 1991. 812p.
- FARAG, R.S.; BADEI, A.Z.M.A.; HEWEDI, F.M.; EL-BAROTY, G.S.A. Antioxidant activity of some spices essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 66, p. 792-799, 1989.
- FARNSWORTH, N.R.; SOEJARTO, D.D. Global importance of medicinal plants. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (Eds.). **Conservation of medicinal plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 25-51.
- FAROOQI, A.A.; DEVIAH, K.A.; VASUNDHARA, M. Effect of some growth regulators and pinching on growth, yield and essential oil content of davana (*Artemisia pallens* Wall). **Indian Perfumer**, v. 37, p. 19-23, 1993.
- GOTTLIEB, O.R.; SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, v. 39, p. 707-716, 1987.
- GRELLA, G.E.; PICCI, V. Variazioni stagionali dell'olio essenziale di *Salvia officinalis*. **Fitoterapia**, v. 59, p. 97-102, 1988.
- GUENTHER, E. **The essential oils: individual oils of the plant families Rutaceae and Labiatae**. New York: D. Van Nostrand., 1949. 400 p.
- GUILLEN, M.D.; CABO, N.; BURILLO, J. Characterization of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 70, p. 359-363, 1996.
- HENDERSON, W.; HART, J.W.; HOW, P.; JUDGE, J. Chemical and morphological studies on sites of sesquiterpene accumulation in *Pogostemon cablin* (patchouli). **Phytochemistry**, v. 9, p. 1219-1228, 1970.
- HERTWIG, I.F.V. **Plantas aromáticas e medicinais**. 2. ed. São Paulo: Cone, 1991. 414p.
- HOHMANN, J.; ZUPKÓ, I.; RÉDEI, D.; CSÁNYI, M.; FALKAY, G.; MÁTHÉ, I.; JANICSÁK, G. Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. **Planta Médica**, v. 65, p. 576-578, 1999.
- KRISHNAMOORTHY, H.N. **Gibberellins and plant growth**. New York: John Wiley and sons, 1979. 563p.

- KRYS'KOV, E.L.; SHKURAT, D.F. The reaction of the mint *Mentha piperita* to GA₃. **Botanichnyi Zhurnal**, v. 46, p. 707-710, 1961.
- LAMAISON, J.L.; PETIJEAN-FREYTET, C.; CARNAT, A. Teneurs en acide rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activité antioxydante chez les Apiacées, les Boraginacées et les Lamiacées médicinales. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 48, p. 103-108, 1990.
- LÄNGER, R.; MECHTLER, C.; TANZLER, H.O.; JURENITSCH, J. Differences of the composition of the essential oil within an individual of *Salvia officinalis*. **Planta Médica**, v. 59, p. 635-636, 1993.
- LAWRENCE, B.M.; HOGG, J. W.; TERHUNE S.J. *Les huiles essentielles et leurs constituants*. IV. Quelques nouveaux constituants à l'état de traces dans l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. **Parfums Cosmétiques Savons de France**, v. 1, p. 256-259, 1971.
- LI, Y.I.; CRAKER, L.E.; POTTER, T. Effect of light level on essential oil production of sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*). Proceedings Int. Symp. Medicinal and Aromatic Plants, **Acta Horticulture**, v. 426, p. 419-426, 1996.
- MAHMOUD, S.E.D.M.; SHETTY, K. Response of growth and essential oil content of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) to some natural hormones. **Acta Horticulture**, v. 426, p. 629-634, 1996.
- MARTINS, E.R. **Morfologia interna e externa, caracterização isozimática e óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth.** Viçosa, MG: UFV, 1996. 97p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1998. 220p.
- MÁTHÉ JR, I.; OLÁH, L.; MÁTHÉ, A.; MIKLÓSSY, V.V.; BERNÁTH, J.; BLUDEN, G.; PATEL, A.V.; MÁTHÉ, I. Changes in the essential oil production of *Salvia officinalis* under climatic conditions of the temperature belt. **Planta Médica**. v.58, p.680, 1992.
- MCLAFFERTY, F.W.; STAUFFER, D. **The wiley/NBS registry of mass spectral data**, New York: Wiley, 1989.v. 1-6.
- MILLÉO, M.V.R.1; VENÂNCIO, W.S.1; MONFERDINI, M.A. Avaliação da eficiência agrônômica do produto Stimulate aplicado no tratamento de sementes e no sulco de plantio sobre a cultura do milho (*Zea mays* L.). **Arquivos Instituto Biológico**, v. 67, p. 1-145, 2000.
- MING, L.C. **Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na população de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia Alba* (Mill) N. E. Br. – Verbenaceae.** 1992. 206p. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de concentração Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- NICKELL, L.G. **Plant growth regulators**. Berlin: Springer, 1982. 173p.
- PERRY, N.B.; ANDERSON, R.E.; BRENNAN, N.J.; DOUGLAS, M.H.; HEANEY, A.J.; MCGIMPSEY, J.A.; SMALLFIELD, B.M. Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons, and sites. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 2048-2054, 1999.
- PICCAGLIA, R.; MAROTTI, M. Characterization of several aromatic plants grown in northern Italy. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 8, p. 115-122, 1993.
- POVH, J.A.; ONO, E.O. Efeito do ácido giberélico na composição do óleo essencial de *Salvia officinalis* L. **Publicatio, UEPG**, v. 13, p. 7-10, 2007.
- POVH, J.A.; ONO, E.O. Rendimento de óleo essencial de *Salvia officinalis* L. sob ação de reguladores vegetais. **Acta Scientiarum, Biological Science**, v. 28, p. 189-193, 2006.
- PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; DUDAI, N. The influence of season and harvest frequency on essential oil and herbal yields from a pure clone of sage (*Salvia officinalis*) grown under cultivated conditions. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 326-329, 1986.
- REICHLING, J.; BECKER, H.; VOMEL, A. Herbizide im Kamillenanbau (*Matricaria chamomilla* L.). **Planta Medica**, v. 32, p. 235-242, 1977.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4.ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682p.
- SANGWAN, N.S.; FARROQI, A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plant. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.
- SCAVRONI, J.; VASCONCLOS, M.C.; VALMORBIDA, J.; FERRI, A.F.; MARQUES, M.O.M.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Rendimento e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* L. submetida a aplicações de giberelina e citocinina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 40-43, 2006.
- SCHWARZ, K.; TERNES, W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. **Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung und Forschung**, v. 195, p. 99-103, 1992.
- SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507-512, 1974.
- SERAFINI, L.A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AEVEDO, J.L. (Eds). Guaíba, RS: Agropecuária. pp. 333-377, 2001.
- SHUKLA, A.; FARROQI, A.H.A.E. Review: utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. **Current Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 12, p. 152-177, 1990.

- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Ed. Da Universidade Federal de Santa Catarina, 1999. 821p.
- STAHL, E.; WOLLENSAH, A. Observations on the function of the glandular hairs of yarrow: 4th report: effects of selective herbicides on the glandular hairs tissue of the florest. **Journal of Plant Physiology**, v. 122, p. 93-96, 1986.
- STRATFORD, G.A. **Essential of plant physiology “plant hormone”**. London: Heineman educational books Idt., 1978. 560p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 705p.
- TECCHIO, M.A.; PAIOLI-PIRES, E.J.; RODRIGUES, J.D.; VIEIRA, C.R.Y.I.; TERRA, M.M.; BOTELHO, R.V. Aplicação de bioestimulante nas características ampelométricas da infrutescência da videira ‘tieta’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 300-303, 2005.
- TREASE, E.G.; EVANS, C.W. **Pharmacognosy**. 11.ed. London: Baillare Tindall, 1978, 812p.
- TRONCHET, A. The effects of GA treatment on plants of *Lepidium sativum*, *Mercurialis annua* and *Ocimum basilicum*. **Bulletin of the Society of History Natural**, v. 4, p. 85-86, 1961.
- UMESHA, K.; BOJAPPA, K.M.; FAROOQI, A.A.; SUBBAIAH, T. Effect of gibberellic acid and cycocel on growth, yieed and quality of clocimum (*Ocimum gratissimum* L.). **Indian Perfumer**, v. 35, p. 53-57, 1991.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D.J.A. Generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatograpy. **Journal of Cromatography**, v. 11, p. 463-467, 1963.
- VENKATACHALAM, K.V.; KJONAAS, R.; CROTEAU, R. Development and essential oil content of secretory glands of sage (*Salvia officinalis*). **Plant Physiology**, v. 76, p. 148-150, 1984.
- VIEIRA, E.L.; CASTRO, P.R.C. **Ação de bioestimulante na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Cosmópolis: Stoller do Brasil, 2004. 74p.
- VIEIRA, E.L.; CASTRO, P.R.C. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, p. 222-228, 2001.

CAPÍTULO III

**SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Salvia officinalis*
L. SOB AÇÃO DE REGULADORES VEGETAIS E BIOESTIMULANTES**

**SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Salvia officinalis*
L. SOB AÇÃO DE REGULADORES VEGETAIS E BIOESTIMULANTES**

RESUMO - Este estudo objetivou avaliar o efeito de reguladores vegetais e bioestimulantes no teor de substâncias fenólicas e atividade antioxidante de plantas de *Salvia officinalis* L. O experimento foi instalado em casa de vegetação sendo as plantas tratadas com os seguintes tratamentos: 1- controle (água); 2- IBA a 100 mg L⁻¹; 3- GA₃ a 70 mg L⁻¹; 4- benzilaminopurina (BAP) a 70 mg L⁻¹; 5- GA₃+cinetina+IBA – Stimulate[®] a 1% e 5- GA₄₊₇+N-(fenilmetil)-1-purina-6-amino – Promalin[®] a 100 mg L⁻¹. Os tratamentos foram aplicados quatro vezes, sendo a primeira, 25 dias após a emergência (D.A.E.), a segunda, a terceira e a quarta aplicação aos 10, 20 e 30 D.A.E., respectivamente. Em cada coleta (sete coletas), determinaram-se: os teores de flavonóides totais, fenóis totais e atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas e atividade antioxidante (CE₅₀). Analisando-se os resultados obtidos foi possível verificar aos 82 D.A.E. que plantas tratadas com IBA promoveram maior acúmulo nos teores de fenóis totais e flavonóides; plantas tratadas com IBA, GA₃ e Promalin[®] apresentaram menor CE₅₀, portanto, maior atividade antioxidante. Com relação às atividades enzimáticas, os tratamentos que apresentaram aumento foram o controle, GA₃ e BAP, para peroxidases e IBA, GA₃ e Stimulate[®], para polifenoloxidase.

Palavras-chave: atividade antioxidante, DPPH, flavonóides, plantas medicinais

**PHENOLIC SUBSTANCES AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Salvia officinalis* L.
SUBJECTED TO PLANT GROWTH REGULATORS AND BIOSTIMULANTS**

ABSTRACT – This study aimed at evaluating the effect of plant growth regulators and biostimulants on phenolic substance levels and antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. plants. The experiment was carried out in a greenhouse and plants were subjected to the following treatments: 1- control (water); 2- IBA 100 mg L⁻¹; 3- GA₃ 70 mg L⁻¹; 4- benzylaminopurine (BAP) 70 mg L⁻¹; 5- GA₃+kinetin+IBA – Stimulate[®] 1%, and 5- GA₄₊₇+N-(phenylmethyl)-1H-purine-6-amine – Promalin[®] 100 mg L⁻¹. Treatments were sprayed four times: the first, at 25 days after emergence (D.A.E.); the second, third and fourth, at 10, 20 and 30 D.A.E., respectively. In each harvesting (a total of seven), total flavonoid and phenol levels were assessed, besides peroxidase, polyphenol oxidase and antioxidant (CE₅₀) activities. At 82 D.A.E., IBA-treated plants had higher flavonoid and phenol levels; besides, plants treated with IBA, GA₃ and Promalin[®] presented lower CE₅₀ and, therefore, higher

antioxidant activity. As regards enzymatic activities, there was an increase in peroxidases when plants were subjected to GA₃ and BAP, as well as in controls, whereas polyphenol oxidase was higher in IBA-, GA₃- and Stimulate®-treated plants.

Key words: antioxidant activity, DPPH, flavonoids, medicinal herbs

INTRODUÇÃO

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas quimicamente reativas derivadas do oxigênio, geradas espontaneamente pelo metabolismo dos organismos vivos, no entanto, o acúmulo destas moléculas nos sistemas biológicos causa diversos danos por afetar a integridade e a função celular. As ROS são consideradas agentes oxidantes que danificam todos os tipos de estruturas celulares por serem capazes de reagir diretamente com biomoléculas como: carboidratos, lipídeos, proteínas e DNA causando alteração na permeabilidade das membranas celulares, redução na atividade enzimática e algumas mutações (Resende et al. 2003; Kosar et al., 2005; Zhao et al., 2005). Os danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio têm sido freqüentemente associados à patogênese e problemas de saúde, como envelhecimento, artrite, câncer, inflamação e doenças cardíacas em humanos (Abe e Berk, 1998; Velloso et al., 2007).

Algumas substâncias apresentam atividade antioxidante por impedirem a oxidação prejudicial de substâncias químicas nas reações metabólicas, neutralizando radicais livres que prejudicam as células; entre elas podem-se citar as vitaminas C e E e os carotenóides (Haslam, 1996; Valko et al., 2004; El-Agamey et al., 2004; Omoni e Aluko, 2005; Velloso et al., 2007).

O uso de antioxidantes naturais vem atraindo atenção não apenas dos pesquisadores, mas também da população em geral, devido a difusão da idéia de que são mais seguros e saudáveis que as moléculas sintéticas. Como consequência disso tais produtos vêm sendo cada vez mais usados na produção de conservantes para a indústria alimentícia e produtos para a indústria farmacêutica (Block et al., 1992).

A atividade antioxidante dos produtos de origem vegetal é dependente, entre outras características estruturais, da presença de um grupamento fenólico e tal estrutura permite a estes compostos neutralizar radicais livres, quelar metais reativos e agir como “*quencher*” de oxigênio no estado singleto e tripleto (Atoui, 2005). Desta maneira, os flavonóides, fenilpropanóides e outros compostos aromáticos são os principais alvos da busca por antioxidantes naturais (Bolzani et al., 1995; Mossi et al., 2005; Velloso et al., 2007).

Algumas famílias vegetais são caracterizadas por produzirem elevadas quantidades de substâncias antioxidantes e uma das mais representativas é a família Lamiaceae; nesta família destacam-se *Rosmarinus officinalis* e *Salvia officinalis*. Estas espécies têm sido amplamente estudadas e muitos de seus componentes antioxidantes já foram identificados e a maior parte deles é formada por compostos fenólicos (Das e Pereira, 1990; Pokorny, 1991; Schwarz e Ternes, 1992).

Salvia officinalis L. é uma planta originária do sul da Europa conhecida popularmente como sálvia, usada, principalmente como planta aromática e medicinal (Martins et al., 1998). Os principais produtores mundiais são os países da região do Mediterrâneo, além dos Estados Unidos. No Brasil, a espécie foi aclimatada e tem sido cultivada, com sucesso nos estados da região Sul (Serafini e Cassel, 2001).

Os compostos fenólicos mais comuns presentes em *S. officinalis* relatados em diversos trabalhos são: ácido rosamarínico, ácido carnosínico, ácido salvianólico e seus derivados carnosol, rosmanol, epirosmanol, rosmadial e metil-carnosatos (Lu e Foo, 2001), estes apresentam atividade antimicrobiana e removedora de radicais livres (Masaki et al., 1995; Tepe et al., 2005).

Em oposição à ação dos compostos fenólicos, existem as enzimas peroxidases (doador: hidrogênio peróxido óxidoreductase, POD, EC 1.11.1.7) que catalisam reações redox em vegetais, usando como substrato tanto o peróxido de hidrogênio como o oxigênio como aceptores de hidrogênio. Estas enzimas são encontradas no citoplasma (forma solúvel), na parede celular (forma insolúvel), em membranas e organelas das células vegetais. As PODs agem formando um complexo enzima–doador de hidrogênio, atuando na catálise de reações oxidativas, peroxidativas e de hidroxilação. Oxidam diferentes doadores de hidrogênio, tais como: fenólicos, aminas, leucobases e compostos heterocíclicos. Elevados índices de atividade das PODs podem ser relacionados a estádios de deterioração oxidativa e senescência dos tecidos, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indolil-3-acético (IAA), ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos e regulação do alongamento de células (Gaspar et al., 1982; Kao, 2003).

As polifenoloxidasas (PPO, EC 1.14.18.1) são enzimas que agem sobre os compostos fenólicos oxidando-os a quinonas na presença de O₂, pertencem ao grupo das óxidos redutases e contém cobre como grupo prostético. Os substratos usuais das PPOs incluem os ésteres dos ácidos cinâmicos, como o ácido clorogênico, as catequinas, a 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA) e a tirosina. Nestes substratos estão envolvidas em reações de oxidação de compostos fenólicos e carotenóides, degradação de auxinas, clorofila e ácido ascórbico, bem como na biossíntese de lignina. Portanto, a sua atividade relaciona-se com modificações nos

atributos sensoriais (escurecimento, endurecimento e sabores estranhos) e no valor nutritivo (perda de atividade vitamínica do ácido ascórbico) dos produtos hortícolas. Têm função relacionada aos processos de desenvolvimento e de senescência dos tecidos (Gaspar et al., 1997).

Reguladores vegetais são substâncias sintéticas que quando aplicadas exogenamente possuem ação semelhante ao dos grupos de hormônios vegetais conhecidos. A aplicação comercial de reguladores vegetais adquiriu grande importância e significado na horticultura e produção de plantas e estes compostos são normalmente utilizados para aumentar a produção, alterar hábitos de crescimento ou estruturas. Os reguladores vegetais alteram o balanço hormonal endógeno atuando como um componente presente em baixa quantidade ou atenuar os efeitos de componentes que estão em quantidades elevadas (Castro e Vieira, 2001).

Além dos reguladores vegetais, outras substâncias ativas são utilizadas na agricultura como os estimulantes ou bioestimulantes vegetais que são misturas de diversos reguladores vegetais ou da destes com compostos de natureza bioquímica diferente que podem aumentar ou incrementar a produção (Vieira e Castro, 2004).

Poucos estudos sobre o efeito da aplicação de reguladores vegetais e bioestimulantes sobre a produção de compostos fenólicos, atividade antioxidante e atividade enzimática de plantas medicinais e aromáticas. Portanto, esforços na busca de substâncias que possam aumentar a produção das plantas medicinais e aromáticas, aumentando a produção de compostos biológicos e de propriedades antioxidantes são de grande importância.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo determinar a influência de reguladores vegetais e bioestimulantes em diferentes épocas de colheita nos teores de fenóis totais e flavonóides, além da atividade antioxidante (CE_{50}) e da atividade das enzimas peroxidases e polifenoloxidasas em plantas de *Salvia officinalis* L. cultivadas em casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido entre setembro de 2005 e fevereiro de 2006 em casa de vegetação instalada no Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP. A época da implantação deste experimento coincidiu com temperaturas mais quentes exigidas para esta espécie, de acordo com Martins et al. (1998).

O solo usado no presente experimento apresentava as seguintes características químicas: pH $CaCl_2$ = 5,61; M.O. = 22,66 g kg^{-1} ; P = 22,8 mg dm^{-3} ; H+Al = 34,1, K = 5,12, Ca =

43,56, Mg= 17,65, SB= 66,3, CTC= 100,4 mmole dm⁻³ e V%= 66. A análise química do solo foi determinada pelo Departamento de Recursos Naturais, Setor: Ciência do Solo, da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu, SP.

As plantas foram obtidas de sementes já tratadas com Thiram (dissulfeto tetrametil – tiuram) que foram semeadas diretamente em vasos com capacidade de 12 litros, com terra corrigida (calagem – 9,12 g vaso⁻¹ de calcáreo dolomítico) e adubada (15,85 g vaso⁻¹ de superfosfato simples; 2,4 g vaso⁻¹ de nitrogênio; não houve a necessidade de adição de potássio e 10% do volume do vaso de matéria orgânica, esterco de vaca). Foi realizada ainda adubação de cobertura com solução nutritiva completa de Hoagland (200 mL vaso⁻¹) uma vez por semana, 65 dias após a emergência (D.A.E.). As plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas sempre que necessário. A temperatura máxima dentro da casa de vegetação, durante a condução do experimento, foi 27°C e a mínima 16°C.

As plantas foram tratadas com os seguintes tratamentos: 1– controle (água); 2– ácido 4-(3-indolil)butírico (IBA) a 100 mg L⁻¹; 3– ácido giberélico (GA₃) a 70 mg L⁻¹; 4– benzilaminopurina (BAP) a 70 mg L⁻¹; 5– GA₃ + cinetina (Kt) + IBA – Stimulate[®] a 1% e 6– GA₄₊₇ + N-(fenilmetil)-1-purina-6-amina – Promalin[®] a 100 mg L⁻¹.

Para o IBA foi utilizado o produto p.a. da Vetec Química Fina Ltda.; o ácido giberélico (GA₃) foi utilizado na forma do produto comercial Pro-Gibb contendo 10% de GA₃, da Sumitomo do Brasil; a benzilaminopurina (BAP) utilizada foi na forma do produto p.a. da Sigma; a mistura de GA₃ + cinetina + IBA foi utilizada na forma do produto comercial Stimulate[®] contendo 90mg L⁻¹ de cinetina (Kt), 50 mg L⁻¹ de IBA e 50 mg L⁻¹ de GA₃ por litro do produto, fabricado pela Stoller do Brasil S.A; a mistura de GA₄₊₇ + N-(fenilmetil)-1-purina-6-amina foi utilizada na forma do produto comercial Promalin[®] contendo 1,8% de GA₄+GA₇ e 1,8% de N-(fenilmetil)-1-purina-6-amina, fabricado pela Sumitomo do Brasil.

A aplicação dos tratamentos foi realizada com pulverizador manual, com pressão constante de 40 libras, equipado com lança contendo um bico tipo leque 110°02, que proporcionou volume de 310 mL de calda por m². À solução contendo os tratamentos foi adicionado espalhante adesivo não iônico alquil-fenol-poliglicoléter, Extravon[®] na dose de 0,5 mL L⁻¹ de solução, fabricado pela Ciba- Geigy Química S/A.

Foram realizadas quatro aplicações, sendo a primeira 25 dias após o emergência (D.A.E.) e a segunda, a terceira e a quarta aplicação aos 10, 20 e 30 D.A.E., respectivamente.

Para realizar as avaliações bioquímicas em plantas de *S. officinalis*, em cada coleta (sete coletas), as folhas foram lavadas e secas com papel filtro. Para a determinação do teor de flavonóides totais e atividade das enzimas peroxidases (POD) e polifenoloxidases (PPO) as

amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C, para posterior análise. Para determinação de fenóis totais e atividade antioxidante (AAO), as amostras de folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 60°C durante 72 horas, até que se obtivesse massa constante.

Teor de flavonóides totais

A análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico adaptado de Santos e Blatt (1998) e Awad et al. (2000). Amostras de tecido fresco foram maceradas em 20 mL da mistura metanol 70% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), levadas para banho de ultrassom por 30 minutos, filtradas e centrifugadas por 20 minutos a 10.000 rpm. Do sobrenadante, 4 mL foram homogeneizados com 0,2 mL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10% e o volume completado com ácido acético 10% (v/v). A mistura foi homogeneizada e após 30 minutos a absorbância foi verificada a 425 nm usando espectrofotômetro UV-Vis (Pharmacia Biotech – Ultrospec 2000).

O teor de flavonóides totais foi determinado em comparação com uma curva de referência (quercetina) ($y = 0,01353 x + 0,02885$; $R^2 = 0,988$) e expressos em μg de flavonóides (equivalente quercetina) $\text{g}^{-1} \text{m.f.}^{-1}$.

Teor de fenóis totais

O teor de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Denis (Horwitz, 1995) e a curva de referência preparada com catecol ($y = 0,2887 x - 0,1574$; $R^2 = 0,971$). Para análise nas plantas de sálvia, amostras de 100 mg de material seco e moído foram homogeneizadas com 3,5 mL de acetona 70% (v/v) e 1,5 mL de água destilada. Após 20 minutos em banho ultrassônico, o material foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. Alíquotas de 20 μL da amostra resultante do sobrenadante foram homogeneizadas com 150 μL do reagente Folin-Denis e 600 μL de carbonato de sódio 15% e o volume foi completado pra 5 mL com água destilada. A absorção foi verificada após 45 minutos a 20°C a 784 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Pharmacia Biotech – Ultrospec 2000). O teor de fenóis foi expresso em μg de fenóis (equivalente catecol) $\text{g}^{-1} \text{m.f.}^{-1}$.

Atividade da peroxidase (POD) (E C 1.11.1.7)

Amostras de 0,2 g de folhas de *S. officinalis* (massa fresca) foram pesadas e homogeneizadas em 5 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M e pH=6,7, foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos a 4°C, obtendo-se dessa maneira o extrato bruto. O sobrenadante foi utilizado como fonte da enzima peroxidase pelo método

espectrofotométrico proposto por Allain et al. (1974) com algumas modificações (Lima, 1994).

O sistema de reação continha 1,0 mL do extrato enzimático (extrato bruto), 0,5 mL de solução de H₂O₂ 30%, 0,5 mL de solução de diclorofenol e aminoantipirina (163 mg de diclorofenol + 81,3 mg de aminoantipirina em 100 mL de H₂O).

Os tubos foram mantidos em banho-maria a 30°C por 5 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 2 mL de etanol absoluto. Procedeu-se a leitura imediatamente, em espectrofotômetro a 505 nm.

A atividade da enzima peroxidase foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$A = L \cdot VT / 6,58 \cdot T$$

Onde:

A = atividade da peroxidase

L = leitura

VT = volume total da reação (2 mL)

T = tempo de reação (5 minutos)

Atividade da enzima polifenoloxidase (PPO) (EC 1.14.18.1)

Amostras de 0,5 g de folhas de *S. officinalis* (massa fresca) foram pesadas e homogeneizadas em 5 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M e pH=6,7, que foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos a 4°C, obtendo-se dessa maneira o extrato bruto. O sobrenadante foi utilizado como fonte da enzima polifenoloxidase pelo método espectrofotométrico proposto por Cano et al. (1997) modificado. A 0,3 mL do extrato bruto foram adicionados 1,75 mL de tampão fosfato 0,1M (pH 6,0) e 0,05 mL de catecol 0,1M. Essa mistura foi incubada por 30 minutos em banho-maria a 30°C, interrompendo-se a reação pela adição de 0,7 mL de ácido sulfúrico 5%. Realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 395nm. A atividade enzimática foi expressa em $\Delta A_{395} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

Atividade antioxidante (DPPH)

O método de determinação da atividade antioxidante usando DPPH é um dos mais usados e consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (Brand-Williams et al., 1995; Sánchez-Moreno et al., 1998). A porcentagem de atividade antioxidante (%AAO) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada

de concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será sua CE₅₀ e maior será sua atividade antioxidante (Souza et al., 2007).

O procedimento do ensaio foi descrito por Mensor et al. (2001), em que a cada solução da amostra (2,5 mL) (extrato metanólico) foi adicionada 1 mL de solução de DPPH (0,3 mM) nas diferentes concentrações (250 – 5 µg mL⁻¹). Após o tempo de reação de 30 minutos, a absorbância foi verificada a 518nm (espectrofotômetro UV/VIS - Pharmacia Biotech – Ultrospec 2000) e convertida em porcentagem de atividade antioxidante (AAO) usando a seguinte fórmula:

$$AAO\% = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle}\}$$

Onde:

AAO%= atividade antioxidante

Abs_{amostra}= leitura da amostra

Abs_{branco}= leitura do branco

Abs_{controle}= leitura do controle

O controle foi feito com 2,5 mL de etanol e 1 mL da solução de DPPH e um branco foi realizado com 2,5 mL de extrato e 1 mL de etanol, para todas as concentrações. A concentração eficiente, isto é, a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀), foi determinada usando o “Microsoft Excel”, a partir de uma curva de regressão, plotando-se na abscissa as concentrações da amostra (250, 150, 50, 10 e 5 µg mL⁻¹) e na ordenada, a proporção da atividade antioxidante (AAO%), obtendo-se a equação da reta. A resolução desta equação (substituindo o valor de Y por 50) resultou no valor de CE₅₀ (Mensor, 2001) e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 x 7 (6 tratamentos e 7 épocas de coleta) com três repetições, sendo as coletas realizadas a intervalos de 14 dias, ou seja, aos 40, 54, 68, 82, 96, 110 e 124 dias após a emergência (D.A.E.).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F) e na presença de interação entre os fatores, procedeu-se os desdobramentos necessários. As médias dos tratamentos com as diferentes substâncias dentro de cada época de coleta foram comparadas pelo teste Scott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade e para avaliar o efeito das épocas de coleta para cada substância utilizou-se a análise de regressão polinomial.

Para a análise estatística foi utilizado o pacote computacional SISVAR (Ferreira, 1999). Na escolha do melhor modelo de regressão foram adotados os seguintes critérios: regressão significativa, desvios da regressão não significativa, coeficiente de determinação e análise de resíduos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teor de flavonóides totais

Os resultados do teor de flavonóides totais apresentados nas Tabela e Figura 1 revelam que as plantas de *Salvia officinalis* L. tratadas com reguladores vegetais e bioestimulantes, assim como a época de coleta influenciaram no teor deste composto.

De maneira geral, os maiores valores do teor de flavonóides totais podem ser observados para todos os tratamentos aos 82 D.A.E. (Tabela 1), sendo IBA o tratamento que promoveu o maior aumento. No início do ciclo de desenvolvimento, aos 40 D.A.E. os tratamentos com IBA, GA₃, BAP e Stimulate® apresentaram os maiores valores para teor de flavonóides, aos 54 D.A.E. todos os tratamentos apresentaram aumento significativo comparado as plantas controle e aos 68 D.A.E. apenas as plantas tratadas com IBA apresentaram aumento significativo.

As equações de regressão ajustadas para o teor de flavonóide ao longo das sete coletas para cada tratamento (Figura 1) indicam tendência de ajuste de equações quadráticas, em todos os tratamentos testados, ocorrendo aumento do início do ciclo de desenvolvimento de folhas de *S. officinalis* até aos 82 D.A.E. e apresentando tendência de redução após esse período. Os resultados revelam ainda que, plantas tratadas com IBA apresentaram maior acúmulo de flavonóides totais, 161,06 µg de flavonóides g⁻¹ M.F.⁻¹ aos 82 D.A.E. Ao final do ciclo, 124 D.A.E., as plantas tratadas com IBA, GA₃ e Promalin®, apresentaram menor redução no teor de flavonóide e maiores valores deste composto.

Os resultados do presente trabalho revelam que plantas de *S. officinalis* apresentaram maior teor de flavonóides com a aplicação exógena de IBA, uma auxina. Existe relação que entre os flavonóides e IAA, uma vez que, os flavonóides parecem proteger esse hormônio (Wagner et al., 1988). Diversos trabalhos mostram a ação de flavonóides específicos (quercetina e rutina) inibindo a atividade da IAA-oxidase em altas concentrações, mas que podem acelerar a catálise do IAA em baixas concentrações (Mathesius, 2001).

Os flavonóides que inibem a atividade da IAA-oxidase poderiam agir como um substrato alternativo para a peroxidase, protegendo o IAA da oxidação (Kefeli e Dashek, 1984), favorecendo o crescimento. Os flavonóides também podem inibir a oxidação do IAA pela remoção de peróxido de hidrogênio, o qual é produzido na ação oxidativa que precede a atividade da peroxidase e é necessário para a oxidação do IAA (Galston et al., 1950).

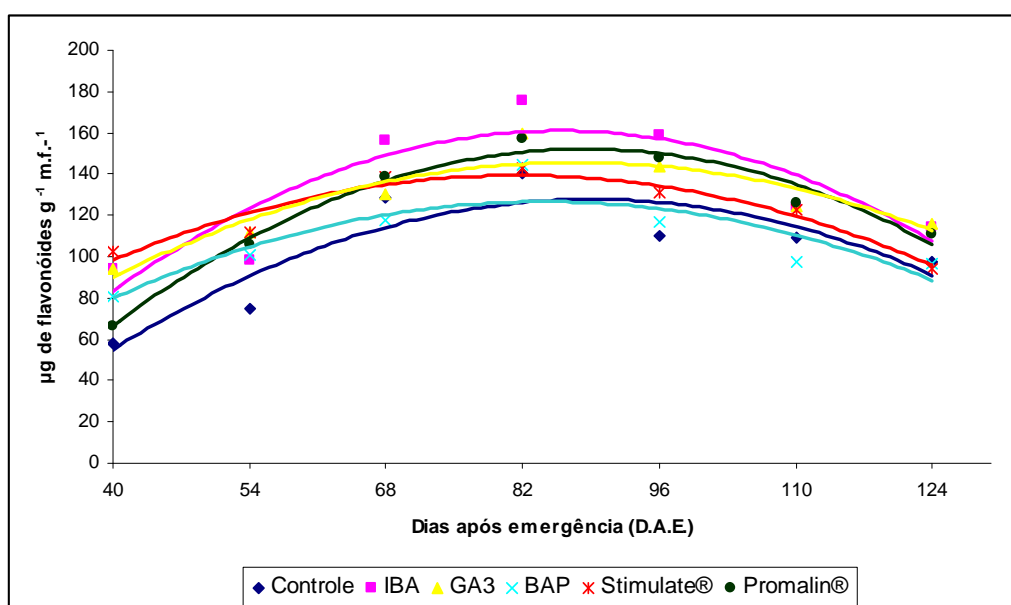
Assim, os maiores níveis de flavonóides nos tratamentos com IBA poderiam estar relacionados com o possível papel antioxidante dessas substâncias. Esse efeito pode ser devido, principalmente, às espécies reativas de oxigênio (ROS), envolvendo radical

superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo o peróxido o maior contribuinte para as ROS (Apel e Hirt, 2004). Starzyinsk e Mareczek (2003) encontraram correlação positiva entre o conteúdo de flavonóides em brócolis e a atividade antiradical livre, medida via DPPH (1,1-difenil-2-picritidrazil), indicando que os fenóis solúveis analisados tem papel importante como componente do sistema antioxidante.

Tabela 1. Teor de flavonóides (μg de flavonóides g^{-1} M.F. $^{-1}$) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais e bioestimulantes nas sete épocas de coleta.

Tratamentos ¹	D.A.E.						
	40	54	68	82	96	110	124
Controle	58,25 b	74,51 b	128,96 b	140,05 c	109,74 c	109,00 b	97,67 b
IBA	94,22 a	97,91 a	156,31 a	175,77 a	158,77 a	123,54 a	113,90 a
GA ₃	93,98 a	111,47 a	130,19 b	159,26 b	143,49 a	124,28 a	116,15 a
BAP	80,43 a	100,63 a	117,63 b	144,24 c	116,89 c	97,43 b	96,44 b
Stimulate®	102,85 a	111,72 a	138,32 b	142,76 c	131,42 b	122,56 a	93,98 b
Promalin®	66,38 b	105,80 a	139,06 b	157,54 b	147,68 a	126,00 a	111,22 a
Média	82,69	100,34	134,93	153,27	134,67	117,14	104,89
C.V. (%)	8,98						

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey ao nível de 1% de probabilidade



Tratamentos	Modelo ajustado ¹	R ²	Ponto Máximo	Máximo da função
Controle	$\hat{Y} = -0,0302X^2 + 5,3763X - 111,75$	0,794	89,10	127,52
IBA	$\hat{Y} = -0,0369X^2 + 6,3412X - 111,36$	0,781	85,92	161,06
GA ₃	$\hat{Y} = -0,0247X^2 + 4,3274X - 43,504$	0,858	87,60	146,04
BAP	$\hat{Y} = -0,0241X^2 + 4,0506X - 43,817$	0,758	84,04	126,38
Stimulate®	$\hat{Y} = -0,0241X^2 + 3,9155X - 19,921$	0,923	81,23	139,12
Promalin®	$\hat{Y} = -0,0366X^2 + 6,4686X - 133,77$	0,969	88,37	152,04

P < 0,001: para todos os modelos ajustados

$$^1 \hat{Y} = a + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$$

Figura 1. Teor de flavonóides (μg de flavonóides g^{-1} M.F. $^{-1}$) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais: IBA, GA₃ e BAP e bioestimulantes: Stimulate® e Promalin®, em função das sete coletas realizadas a intervalos de 14 dias.

Teor de fenóis totais

Na análise do teor de fenóis totais apresentados nas Tabela e Figura 2, pode-se observar que plantas de *Salvia officinalis* L. tratadas com reguladores vegetais e bioestimulantes, assim como a época de coleta influenciaram no teor destas substâncias.

De maneira geral, os maiores valores para as substâncias fenólicas foram observados aos 82 D.A.E. para todos os tratamentos e aos 40, 54 e 68 D.A.E., os tratamentos com IBA e GA₃ apresentaram os maiores valores de fenóis totais (Tabela 2).

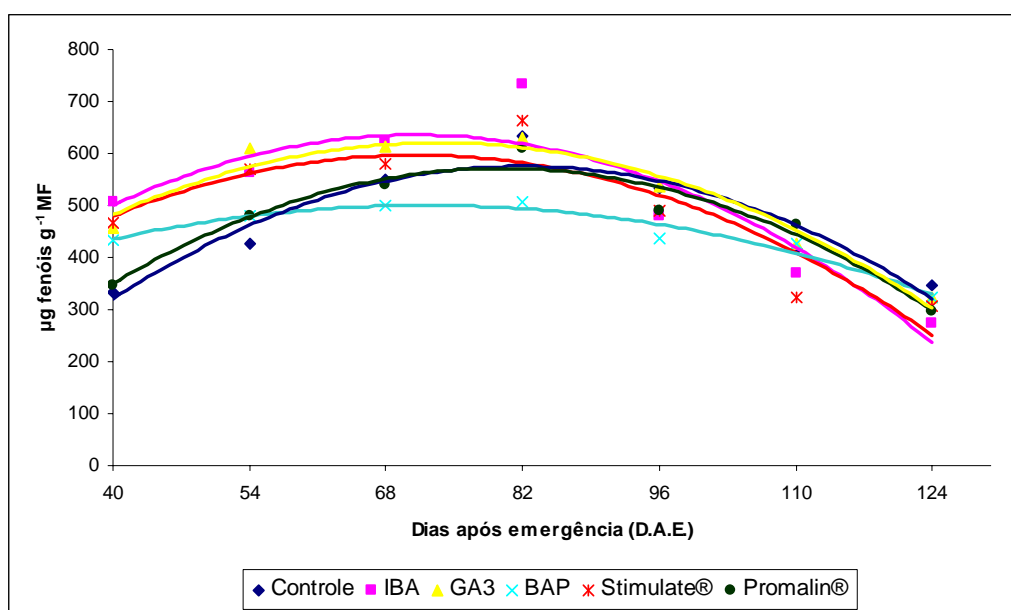
As equações de regressão ajustadas para fenóis totais ao longo das sete coletas para cada tratamento (Figura 2), indicam tendência de ajuste de equações quadráticas para todos os tratamentos, como observado também para teor de flavonóides totais que também é uma substância fenólica. O valor máximo para produção de substâncias fenólicas pode ser observado em plantas tratadas com IBA (653,68 $\mu\text{g fenóis g}^{-1} \text{ M.F.}^{-1}$) aos 71 D.A.E., aproximadamente, após este período houve tendência de redução destas substâncias para todos os tratamentos.

Uma das funções dos fenóis está relacionada com a modulação do desenvolvimento vegetal, pela regulação do catabolismo do ácido indolilacético (IAA) e outra função importante está relacionada com o aumento da rigidez da parede celular e, conseqüentemente, a formação das ligações fenólicas com compostos da parede e a perda da extensibilidade, diminuindo o crescimento celular (Volpert et al., 1995; Kroon e Williamson, 1999; Arnaldos et al., 2001). No presente trabalho, o maior teor de fenóis encontrado nas plantas de *S. officinalis* ocorreu com a aplicação exógena de IBA, podendo este aumento estar relacionado com o balanço da concentração de auxina endógena, pelo efeito dos fenóis no catabolismo do IAA.

Tabela 2. Teor de fenóis totais (μg fenóis g^{-1} M.F.⁻¹) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais e bioestimulantes nas sete épocas de coleta.

Tratamentos ¹	D.A.E.						
	40	54	68	82	96	110	124
Controle	332,59 b	426,12 b	549,78 b	631,87 b	531,76 a	417,46 b	345,41 a
IBA	505,78 a	564,67 a	623,21 a	732,32 a	479,11 b	370,00 a	273,71 a
GA ₃	458,33 a	609,01 a	613,51 a	628,40 b	536,96 a	426,12 b	324,97 a
BAP	434,43 b	479,46 b	499,87 b	506,48 c	437,89 b	404,99 b	299,34 a
Stimulate®	465,26 a	568,83 a	581,64 a	664,43 b	490,54 b	323,24 a	305,23 a
Promalin®	348,18 b	480,85 b	539,04 b	610,39 b	488,81 b	463,18 b	296,92 a
Média	424,10	521,49	567,84	628,89	494,18	400,83	307,60
C.V. (%)	7,83						

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade



Tratamentos	Modelo ajustado ¹	R ²	Ponto Máximo	Máximo da função
Controle	$\hat{Y} = -0,1447X^2 + 23,736X - 397,94$	0,900	82,02	575,45
IBA	$\hat{Y} = -0,1421X^2 + 20,167X - 79,853$	0,842	71,00	653,68
GA ₃	$\hat{Y} = -0,1244X^2 + 18,256X - 48,958$	0,952	73,38	620,82
BAP	$\hat{Y} = -0,0634X^2 + 9,1291X - 171,63$	0,947	72,00	157,00
Stimulate®	$\hat{Y} = -0,1228X^2 + 17,429X - 21,617$	0,828	71,39	596,78
Promalin®	$\hat{Y} = -0,1397X^2 + 22,296X - 318,55$	0,939	75,84	568,87

P < 0,001: para todos os modelos ajustados

¹ $\hat{Y} = a + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$

Figura 2. Teor de fenóis totais (μg fenóis g^{-1} M.F.⁻¹) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais: IBA, GA₃ e BAP e bioestimulantes: Stimulate® e Promalin®, em função de sete coletas, realizadas a intervalos de 14 dias.

Atividade das peroxidases (POD)

O peróxido de hidrogênio é um constituinte do metabolismo oxidativo que pode reagir com radicais superóxidos e formar radicais oxigênio-livre e radicais hidroxilas, na presença de traços de Fe ou Cu. Os radicais hidroxilas produzidos iniciam reações próprias de propagação conduzindo à peroxidação de lipídeos das membranas e destruição de proteínas (Bowler et al., 1992). Radicais livres e peroxidação de lipídeos são considerados como os maiores contribuintes da senescência (Dhindsa et al., 1981) causando danos celulares e peroxidação dos lipídeos. Esses efeitos podem ser reduzidos ou prevenidos pelo metabolismo oxidativo envolvendo enzimas antioxidantes como a peroxidase (Chang e Kao, 1998).

Na Tabela e Figura 3 podem ser observados os resultados obtidos para a atividade da peroxidase em folhas de *S. officinalis* sob ação de reguladores vegetais e bioestimulantes em sete épocas de coleta. Pode-se notar que os maiores valores obtidos para atividade das peroxidases em folhas de *S. officinalis*, ocorreu nas plantas controle e naquelas tratadas com GA₃ aos 82 D.A.E. (Tabela 3). Aos 54 e 68 D.A.E. plantas controle e naquelas tratadas com IBA e GA₃ apresentaram maior atividade das peroxidases. Após os 82 D.A.E., a atividade da peroxidase sofreu redução em todos os tratamentos, aos 96 D.A.E. os valores mais elevados ocorreram nas plantas controle e tratadas com GA₃ e Stimulate® e aos 124 D.A.E. as plantas controle, e tratadas com IBA, GA₃ e BAP apresentaram maior atividade das peroxidases.

As equações de regressão ajustadas para a atividade da peroxidase ao longo das sete coletas para cada tratamento (Figura 3) indicam tendência de ajuste de equações quadráticas para todos os tratamentos. Pode ser observado aumento da atividade da peroxidase do início do ciclo de desenvolvimento de folhas de *S. officinalis* até aos 82 D.A.E. e após esse período foi observada redução desta atividade. A maior atividade desta enzima pode ser observada pelo ponto máximo da equação, aproximadamente aos 79, 88 e 90 D.A.E. com atividade máxima de 0,545, 0,841 e 0,590 para controle, GA₃ e BAP, respectivamente.

A atividade da peroxidase pode ser alterada por fatores externos como luz ou outras radiações, estresse (saís e temperatura), senescência, regulador vegetal, entre outros. Segundo Gaspar et al. (1994), a peroxidase está relacionada com a regulação ou alteração dos níveis endógenos de auxina. A complexidade das respostas desta enzima tem causado problemas em entender a função específica *in vivo* e seu papel no crescimento da planta e sua adaptação no ambiente (Rival et al., 1997).

Os resultados revelam que houve influência dos reguladores vegetais e bioestimulantes na atividade das enzimas peroxidases, com maior atividade aos 82 D.A.E. para todos os tratamentos, podendo estar relacionado com o período de máxima divisão celular durante o desenvolvimento das folhas de plantas de *S. officinalis*. Geralmente, durante a iniciação de

órgãos e em regiões de ativa divisão celular, a atividade da peroxidase aumenta, por ser provavelmente, essencial no metabolismo do ácido indolilacético (IAA), modificando o balanço hormonal na planta, modulando a morfogênese (Mäder, 1975; Bouazza et al., 1993).

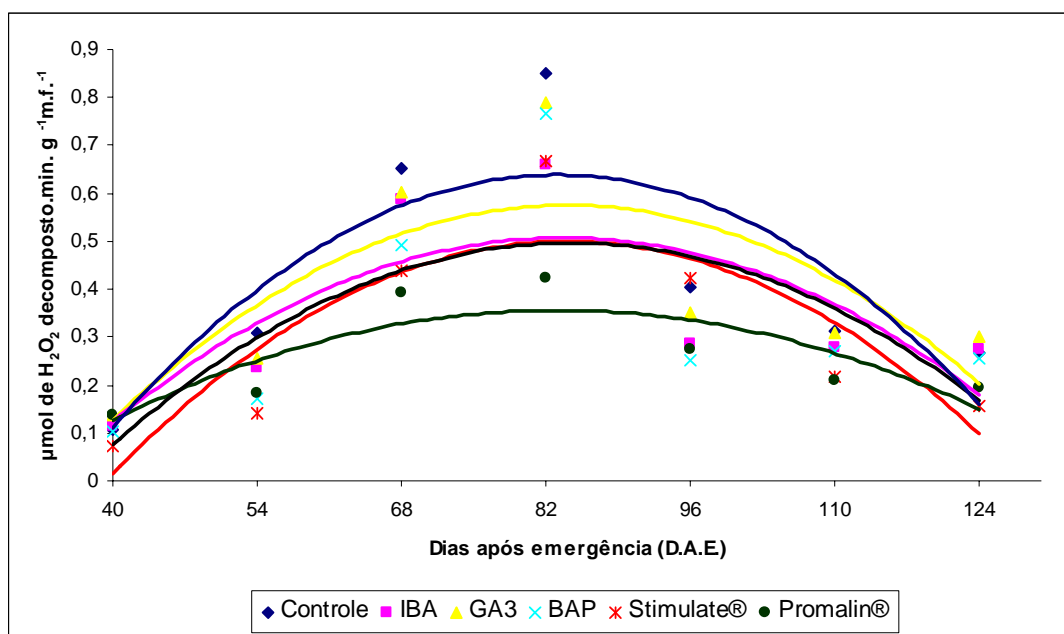
De acordo com a literatura, no presente trabalho o aumento na atividade das peroxidases foi observado aos 82 D.A.E. e após este período, a redução nesta atividade poderia estar relacionada com a fase de maior alongamento celular. De acordo com Piza (2000), a atividade da peroxidase, geralmente, é alta durante a fase de máxima divisão celular, diminuindo durante o alongamento. Andersen et al. (1986) afirmaram que a enzima peroxidase poderia ser usada como marcador da organogênese por participar da regulação endógena de IAA, agindo como IAA-oxidase, principalmente, nas fases de intenso crescimento ou formação de órgãos das plantas.

As peroxidases são enzimas que participam de reações oxidativas e estão relacionadas com o controle da concentração de auxina endógena (Pedreño et al., 1990). A peroxidase, por atuar como uma IAA-oxidase, é formada como consequência da diminuição da auxina endógena e a aplicação de IBA pode prevenir esse efeito resultando numa menor atividade desta enzima. Nos resultados apresentados neste trabalho, a aplicação de IBA não resultou em aumento significativo na atividade das peroxidases e estes resultados estão de acordo com a literatura. Basu et al. (1998) descrevem que a atividade da peroxidase é significativamente reduzida em tecidos tratados com auxina.

Tabela 3. Atividade da enzima peroxidase (μmol de H_2O_2 decomposto min^{-1} M.F. $^{-1}$) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais e bioestimulantes nas sete épocas de coleta.

Tratamentos ¹	D.A.E.						
	40	54	68	82	96	110	124
Controle	0,108 a	0,310 a	0,653 a	0,852 a	0,403 a	0,311 a	0,268 a
IBA	0,115 a	0,236 a	0,588 a	0,661 b	0,286 b	0,280 a	0,275 a
GA ₃	0,137 a	0,255 a	0,601 a	0,791 a	0,351 a	0,310 a	0,303 a
BAP	0,102 a	0,170 b	0,491 b	0,766 a	0,250 b	0,270 a	0,256 a
Stimulate®	0,073 a	0,141 b	0,440 b	0,668 b	0,424 a	0,217 a	0,155 b
Promalin®	0,137 a	0,184 b	0,391 b	0,422 c	0,275 b	0,211 a	0,193 b
Média	0,112	0,216	0,527	0,693	0,332	0,267	0,242
C.V. (%)	17,25						

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade



Tratamentos	Modelo ajustado ¹	R ²	Ponto Máximo	Máximo da função
Controle	$\hat{Y} = -0,0003X^2 + 0,0474X - 1,3278$	0,686	79,00	0,545
IBA	$\hat{Y} = -0,0002X^2 + 0,0337X - 0,9033$	0,565	84,30	0,516
GA ₃	$\hat{Y} = -0,0002X^2 + 0,0390X - 1,0605$	0,588	87,50	0,841
BAP	$\hat{Y} = -0,0002X^2 + 0,0359X - 1,0205$	0,507	89,75	0,590
Stimulate®	$\hat{Y} = -0,0003X^2 + 0,0421X - 1,2652$	0,755	70,17	0,412
Promalin®	$\hat{Y} = -0,0001X^2 + 0,0206X - 0,4977$	0,700	103,0	0,563

P < 0,001: para todos os modelos ajustados

¹ $\hat{Y} = a + b_1X + b_2X^2 + b_3X^3$

Figura 3. Atividade da enzima peroxidase (μmol de H_2O_2 decomposto min^{-1} M.F. $^{-1}$) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais: IBA, GA₃ e BAP e bioestimulantes: Stimulate® e Promalin®, em função de sete coletas, realizadas a intervalos de 14 dias.

Atividade das polifenoloxidasas (PPO)

Em relação a atividade das polifenoloxidasas os resultados podem ser observados na Tabela e Figura 4. Aos 40 D.A.E. pode-se observar que os tratamentos com GA₃, Stimulate® e Promalin® apresentaram as maiores atividades desta enzima. Aos 54 D.A.E. o BAP e Stimulate® representaram as maiores atividades, já aos 68 D.A.E. apenas o GA₃ apresentou aumento significativo da atividade da polifenoloxidase. Todos os tratamentos apresentaram maior atividade da polifenoloxidase aos 82 D.A.E., no entanto, plantas tratadas com IBA, GA₃ e Stimulate® representaram os maiores valores. Após os 82 D.A.E. houve redução nos valores e aos 96 D.A.E. plantas tratadas com BAP e Promalin® apresentaram os maiores valores. Aos 110 e 124 D.A.E. GA₃, BAP, Stimulate® e Promalin® apresentaram maiores valores de atividade da polifenoloxidase.

As equações de regressão ajustadas para atividade da polifenoloxidase ao longo das sete coletas para cada tratamento, como pode ser observado na Figura 4, indicam tendência de ajuste de equações quadráticas para todos os tratamentos testados. Pode ser observado aumento da atividade da polifenoloxidase do início do ciclo de desenvolvimento das folhas de *S. officinalis* até os 82 D.A.E. e após este período, redução nesta atividade, em todos os tratamentos. A maior atividade da enzima polifenoloxidase, foi obtida em plantas tratadas com Stimulate®, IBA e GA₃, com ponto de máximo, aproximadamente aos 82, 89 e 85 D.A.E. e máxima função de 378,25, 359,66 e 358,11 $\Delta A_{395} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$, respectivamente.

O aumento da atividade da PPO aconteceu, possivelmente, devido à maior disponibilidade de substratos fenólicos. Em células intactas, os fenóis e a PPO encontram-se em diferentes compartimentos celulares (Renard et al., 2001), quando a enzima PPO entra em contato com o substrato (substâncias fenólicas), ocorre escurecimento do tecido (Whitaker e Lee, 1995). No presente trabalho o maior aumento da atividade da PPO pode estar relacionada com a disponibilidade de substrato, uma vez que o teor de fenóis totais também aumentou, segundo equação quadrática e foi superior para todos os tratamentos aos 82 D.A.E. (Figura 2) e o maior aumento de substrato ocorreu em plantas tratadas com IBA, que também apresentou aumento significativo na atividade da enzima PPO aos 82 D.A.E.

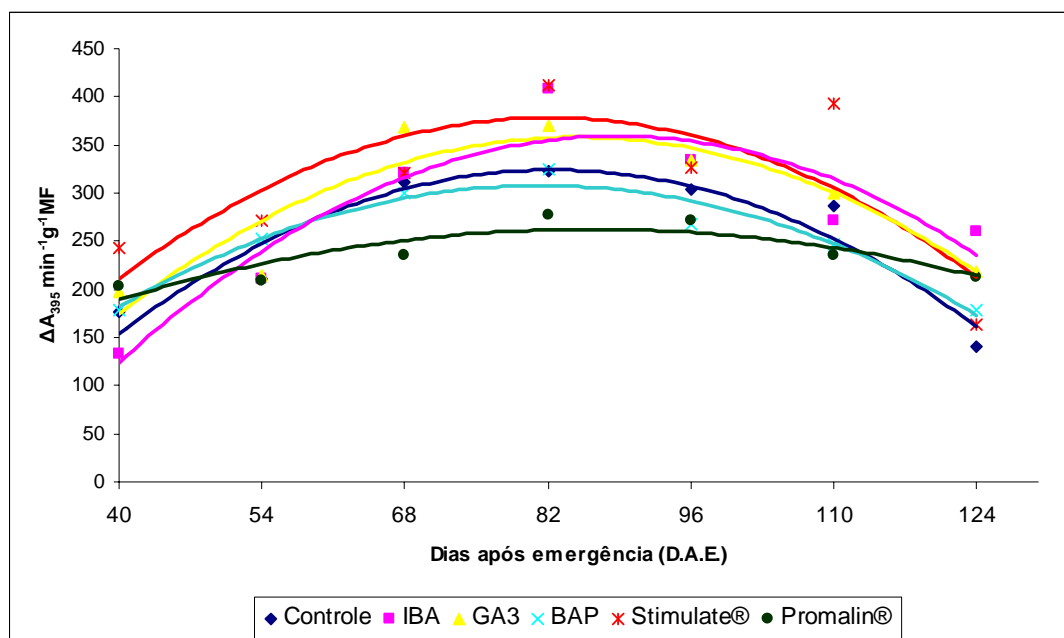
As polifenoloxidasas (PPO) apresentam numerosas funções fisiológicas e na forma de múltiplas isoenzimas aniônicas ou catiônicas, atuam sobre diferentes substratos, em reações, tais como: oxidação de fenólicos e carotenóides, degradação de auxinas, de clorofila e de ácido ascórbico, bem como na biossíntese de lignina. Portanto, a sua atividade relaciona-se com modificações nos atributos sensoriais (escurecimento, endurecimento, sabores estranhos) e no valor nutritivo (perda de atividade vitamínica do ácido ascórbico) dos produtos hortícolas. Têm função relacionada aos processos de desenvolvimento e de senescência dos

tecidos. Por outro lado, as PPO tem papel importante no desenvolvimento do sabor e cor dos alimentos, diminuição do amargor e adstringência. Apresenta-se, geralmente, elevada em tecidos infectados e tem grande importância para as plantas, com envolvimento nos mecanismos de defesa ou na senescência (Agrios, 1997).

Tabela 4. Atividade da enzima polifenoloxidase ($\Delta A_{395} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ M.F.}$) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais e bioestimulantes nas sete épocas de coleta.

Tratamentos ¹	D.A.E.						
	40	54	68	82	96	110	124
Controle	176,29 b	210,74 b	310,74 b	322,96 b	304,07 a	285,92 b	140,00 b
IBA	132,22 b	211,11 b	320,00 b	408,90 a	334,81 a	271,48 b	260,37 b
GA ₃	197,77 a	214,44 b	367,41 a	370,00 a	333,70 a	299,63 a	219,26 b
BAP	178,52 b	251,85 a	300,37 b	325,56 b	267,04 b	247,78 a	178,89 a
Stimulate®	243,33 a	271,85 a	320,37 b	411,85 a	326,29 a	392,22 a	162,96 a
Promalin®	202,59 a	209,63 b	236,30 c	277,78 c	271,85 b	235,19 a	211,85 a
Média	188,45	228,27	257,53	352,84	306,29	288,70	195,56
C.V. (%)	10,63						

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade



Tratamentos	Modelo ajustado ¹	R ²	Ponto Máximo	Máximo da função
Controle	$\hat{Y} = -0,0944X^2 + 15,577X - 318,14$	0,892	82,51	324,45
IBA	$\hat{Y} = -0,0994X^2 + 17,634X - 422,43$	0,862	88,70	359,66
GA ₃	$\hat{Y} = -0,0910X^2 + 15,437X - 296,57$	0,841	84,82	358,11
BAP	$\hat{Y} = -0,0739X^2 + 12,024X - 180,79$	0,946	81,35	308,30
Stimulate®	$\hat{Y} = -0,0945X^2 + 15,513X - 258,40$	0,644	82,08	378,25
Promalin®	$\hat{Y} = -0,0342X^2 + 5,9038X - 7,8294$	0,784	86,31	262,62

P < 0,001: para todos os modelos ajustados

¹ $\hat{Y} = a + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$

Figura 4. Atividade da polifenoloxidase ($\Delta A_{395} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ M.F.}$) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais: IBA, GA₃ e BAP e bioestimulantes: Stimulate® e Promalin®, em função de sete coletas, realizadas a intervalos de 14 dias.

Atividade antioxidante (AAO)

A atividade antioxidante, Tabela e Figura 5 (CE₅₀), foi determinada em folhas de *S. officinalis* sob ação de diferentes reguladores vegetais e bioestimulantes em sete coletas a intervalos de 14 dias. Pode-se observar diferença significativa tanto para tratamento quanto para época de coleta (P<0,001).

A atividade antioxidante pode ser definida como uma propriedade da célula em remover radicais livres formados por processos oxidantes. Os agentes oxidantes formam as ROS (espécies reativas de oxigênio) que são moléculas quimicamente reativas derivadas do oxigênio e existem evidências que o acúmulo de ROS nos sistemas biológicos causa danos oxidativos para o tecido, afetando a integridade e função das células (Zhao et al., 2005).

Antioxidantes são compostos que inibem ou atrasam a oxidação de outras moléculas pela inibição da iniciação ou propagação em cadeia de reação de oxidação e diversas moléculas podem ser consideradas antioxidantes, como vitamina C, carotenóides, substâncias fenólicas, dentre elas os flavonóides (Tepe et al., 2007).

Desse modo, no presente trabalho a atividade antioxidante encontrada pode ser atribuída, em parte, aos compostos analisados, como os fenóis totais e flavonóides, uma vez que, diversos autores descrevem as substâncias fenólicas como principais agentes antioxidantes encontrados em *S. officinalis*. Muitos desses efeitos antioxidantes são atribuídos à presença do ácido carnósico, carnosol e ácido rosmarínico (Chipault et al., 1955; Couvelier et al., 1996)

Como apresentada na Tabela 5, os tratamentos apresentaram maior atividade antioxidante aos 82 D.A.E. e todos os tratamentos com reguladores vegetais e bioestimulantes apresentaram aumento significativo em relação às plantas controle.

Algumas espécies do gênero *Salvia* apresentaram significativa atividade antioxidante usando o método DPPH, tais como *S. landulifolia* (CE₅₀ 80 µg mL⁻¹), *S. officinalis* (CE₅₀ 41 µg mL⁻¹), *S. sclarea* (CE₅₀ 45 µg mL⁻¹) e *S. triloba* (CE₅₀ 50 µg mL⁻¹) (Lamaison, 1990). Malencinc et al. (2000) verificaram em *S. reflexa* o maior índice, CE₅₀ 106,20 µg mL⁻¹. No presente trabalho o CE₅₀ encontrado diferiu do descrito na literatura, variando nos diferentes tipos de tratamentos utilizados e, também, nas épocas de coleta. De acordo com Souza et al. (2007), quanto maior o CE₅₀, menor é atividade antioxidante.

De maneira geral, houve diferença significativa, com relação ao efeito dos tratamentos em cada época de coleta. Os resultados revelam que aos 40 D.A.E. todos os tratamentos apresentaram a menor atividade antioxidante durante o ciclo de desenvolvimento de plantas de *S. officinalis*, porém plantas tratadas com Stimulate®, seguidas de IBA, GA₃ e BAP apresentaram aumento significativo na atividade antioxidante em relação ao controle. Já aos

54 D.A.E., IBA apresentou o maior aumento, seguido de Stimulate® e, por último, o Promalin®. Aos 68 D.A.E. todos os tratamentos com reguladores vegetais e bioestimulantes apresentaram incrementos na atividade antioxidante, e plantas tratadas com IBA e Stimulate® seguidos de GA₃, BAP e Promalin® promoveram os maiores incrementos.

A maior atividade antioxidante foi observada (Tabela 5), em todos os tratamentos, aos 82 D.A.E. Os maiores incrementos no CE₅₀, ocorreu em plantas tratadas com IBA, GA₃ e Promalin®. Aos 96 D.A.E. todos os tratamentos apresentaram perda na capacidade antioxidante, porém as plantas tratadas com reguladores vegetais e bioestimulantes apresentaram maior atividade antioxidante que plantas controle. Aos 110 D.A.E. não houve diferença significativa entre os tratamentos e aos 124 D.A.E. IBA, Stimulate® e Promalin®, seguido de GA₃ e por último BAP, apresentaram maior efeito.

As equações de regressão ajustadas para atividade antioxidante ao longo das sete coletas para cada tratamento (Figura 5), indicam tendência de ajuste de equações quadráticas para todos os tratamentos, como observado também no teor de flavonóides e fenóis totais. Para todos os tratamentos a maior atividade antioxidante foi observada entre os 82 e 96 D.A.E., sugerindo este ser o melhor período para obtenção da capacidade máxima de atividade antioxidante. Os maiores valores para atividade antioxidante foram observados em plantas tratadas com IBA (25,64 µg mL⁻¹) aos 86 D.A.E., aproximadamente, com Promalin® (35,48 µg mL⁻¹) aos 90 D.A.E. e GA₃ (40,89 µg mL⁻¹) aos 88 D.A.E. Estes dados sugerem que o IBA, Promalin® e GA₃ foram os tratamentos mais efetivos para a atividade antioxidante.

O aumento da atividade antioxidante promovido pelo IBA, pode ser estar relacionado com o efeito que estas substâncias apresentaram no aumento no teor de fenóis totais (Tabela e Figura 2). Os tratamentos com GA₃ e Promalin®, assim como o IBA, apresentaram os maiores teores de flavonóides totais (Tabela e Figura 1).

Em particular, a família Lamiceae inclui amplo número de espécies que apresentam atividade antioxidante. Dentre elas, *Rosmarinus officinalis* e *Salvia officinalis* L. tem sido amplamente estudadas e muitos de seus componentes antioxidantes já foram identificados e estabelecidos que muitos dos efeitos antioxidantes são promovidos pelos compostos fenólicos (Das e Pereira, 1990; Pokorny, 1991; Schwarz e Ternes, 1992).

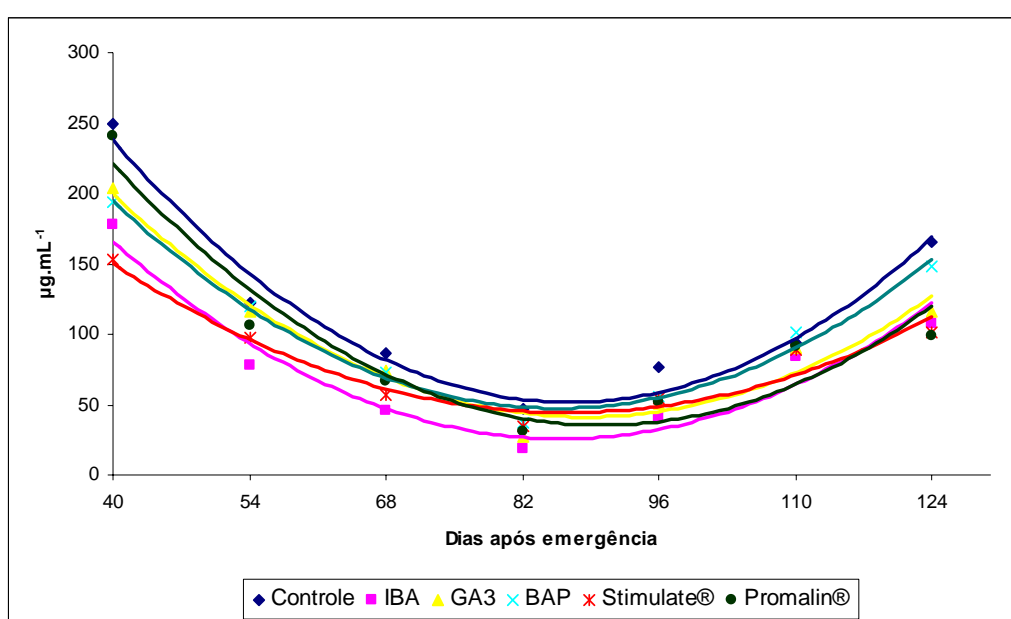
Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que protegem à planta contra danos oxidativos, infecção de patógenos, entre outros (Dixon et al., 1989). Em *S. officinalis* estes compostos tem sido identificados em diversos trabalhos e cita-se, principalmente, o ácido rosamarínico, ácido carnosínico, ácido salvianólico e seus derivados carnosol, rosmanol, epirosmanol, rosmadial e metil-carnosatos (Lu e Foo, 2001; Masaki et al., 1995).

Assim, neste trabalho o maior aumento da atividade antioxidante (CE_{50}) promovido em plantas tratadas com IBA, GA_3 e Promalin® pode ser atribuída em parte aos compostos analisados, como os fenóis e flavonóides totais, já que diversos autores descrevem o ácido rosmarínico (composto fenólico) como o principal agente antioxidante encontrado para *S. officinalis* (Santos-Gomes et al., 2002; Tepe et al., 2007). A interação entre a atividade antioxidante de extratos vegetais e teor de fenóis tem sido previamente relatada por Maillard e Berset (1995).

Tabela 5. Atividade antioxidante ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais e bioestimulantes nas sete épocas de coleta.

Tratamentos ¹	D.A.E.						
	40	54	68	82	96	110	124
Controle	249,80 d	122,33 d	87,00 c	46,47 b	76,67 b	93,33 a	165,00 d
IBA	178,00 b	78,00 a	45,33 a	18,67 a	40,33 a	84,00 a	107,00 a
GA ₃	203,66 c	115,97 d	74,33 b	27,33 a	50,33 a	90,67 a	115,67 b
BAP	193,67 c	120,33 d	73,00 b	37,00 b	55,67 a	100,67 a	147,67 c
Stimulate®	153,33 a	97,00 b	56,67 a	34,33 b	54,00 a	88,33 a	101,00 a
Promalin®	240,67 d	106,67 c	67,00 b	30,33 a	52,00 a	91,33 a	98,86 a
Média	203,19	106,72	67,22	32,36	54,83	91,39	122,53
C.V. (%)	7,6						

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade



Tratamentos	Modelo ajustado ¹	R ²	Ponto Mínimo	Mínimo da Função
Controle	$\hat{Y} = 0,0849X^2 - 14,740X + 691,65$	0,964	86,81	51,87
IBA	$\hat{Y} = 0,0664X^2 - 11,416X + 516,32$	0,932	85,96	25,64
GA ₃	$\hat{Y} = 0,0676X^2 - 11,954X + 569,36$	0,958	88,42	40,89
BAP	$\hat{Y} = 0,0712X^2 - 12,178X + 567,81$	0,984	85,52	47,08
Stimulate®	$\hat{Y} = 0,0487X^2 - 8,4435X + 410,02$	0,935	86,69	44,04
Promalin®	$\hat{Y} = 0,0741X^2 - 13,348X + 636,59$	0,911	90,07	35,48

P < 0,001: para todos os modelos ajustados

¹ $\hat{Y} = a + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$

Figura 5. Atividade antioxidante (CE_{50}) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de plantas de *Salvia officinalis* L., submetidas aos tratamentos com reguladores vegetais: IBA, GA₃ e BAP e bioestimulantes: Stimulate® e Promalin®, em função de sete coletas, realizadas a intervalos de 14 dias.

CONCLUSÕES

Plantas de *Salvia officinalis* L. tratadas com reguladores e bioestimulantes vegetais tiveram o teor de flavonóides, fenóis totais e atividade antioxidante (CE₅₀) modificados, sendo que o IBA promoveu o maior aumento nestas características, desde que a planta seja coletada em média aos 81 D.A.E. Portanto, o IBA foi o tratamento mais efetivo no aumento da produção destes metabólitos secundário e, conseqüentemente, induzido a maior atividade antioxidante.

A atividade enzimática foi maior nos tratamentos com GA₃ e BAP, desde que a planta seja coletada em média aos 84 D.A.E., para peroxidase e nos tratamentos com IBA, GA₃ e Stimulate®, em média aos 85 D.A.E., para polifenoloxidase.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro concedido para a execução deste trabalho. Ao Laboratório de Bioquímica, do Departamento de Química e Bioquímica, IBB, UNESP pela realização das análises bioquímicas deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, J.I.; BERK, B.C. Reactive Oxygen Species as Mediators of Signal Transduction in Cardiovascular Disease. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 8, p. 59-64, 1998.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.
- ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 120, p. 470-475, 1974.
- ALUKO, R.E.; MCINTOSH, T. Limited enzymatic proteolysis increases the level of incorporation of canola proteins into mayonnaise. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v 6, p. 195-202, 2005.
- ANDERSEN, W.C. A revised medium for shoot multiplication of Rhododendron. **Journal American Society Horticultural Science**, v. 109, p. 343-347, 1986.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-99, 2004.

- ARNALDOS, T.L.; MUÑOZ, R.; FERRER, M.A.; CALDERÓN, A.A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria X Ananassa*, c.v. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 315-322, 2001.
- ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, p. 27-36, 2005.
- AWAD, A.M.; JAGER, A. de; WESTING, L.M. van. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterization of variation. **Scientia Horticulturae**, v. 83, p. 249-263, 2000.
- BASU, P.S.; CHATTOPADHYAY, K.K.; BHATTACHARYYA, R.N. Relation of naphthalene acetic acid and 2,4-dichlorophenoxy acetic-acid induced growth of wheat coleoptile with IAA metabolism. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 36, p. 109-712, 1998.
- BLOCK, G.; PETERSON, B.; SUBAR, A. Fruits, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition and Cancer**, v. 18, p. 1-29, 1992.
- BOLZANI, V.S.; GUNATILAKA, A.A. L.; KINGSTON, D.G. I. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1683-1688, 1995.
- BOUAZZA, A.; KAMBOUR, S.; GASPAR, T. Peroxidases during the course of callusing and organ differentiation from root explants of *Chicorium intybus*. **Biologia Plantarum**, v. 35, p. 481-489, 1993.
- BOWLER, C.; Van MONTAGUE, M.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 83-116, 1992.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- CANO, M.P.; HERMANDEZ, A.; ANCOS, B. High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 85-88, 1997.
- CASTRO, P.R.C.; VIEIRA, E.L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. 132p.
- CHANG, W.H.; KAO, C.H. H₂O₂ metabolism during senescence of rice leaves: changes in enzyme activities in light and darkness. **Plant Growth Regulator**, v. 25, p.11-15, 1998.
- CHIPAULT, J. R.; MIZUNO, G. R.; LUNDBERG, W. O. Antioxidant properties of spices in oil-in-water emulsion. **Food Research**, v. 20, p. 443-448, 1955.
- CUVELIER, M, E.; BERSET, C.; RICHARD, H. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 73, 645-652, 1996.

- DAS, N.P.; PEREIRA, T.A. Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure-activity relationships. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 67, p. 255-258. 1990.
- DHINDSA, R.S.; MATAWE, W. Drought tolerance in two mosses correlated with defense against lipid peroxidation. **Journal of Experimental Botany**, v. 32, p. 79-91, 1981.
- DIXON, N.M.; KELL, D.B. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 7, p. 109-136, 1989.
- EL-AGAMEY, A.; LOWE, G. M.; MCGARVEY, D. J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D. M.; TRUSCOTT, T. M.; YOUNG, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant-pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, p. 37-48, 2004.
- FERREIRA, D.F. **Sistema de análise de variância (SISVAR)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1999. ver 4.3 (Build 43).
- GALSTON, A.W.; BONNER, J.; BAKER, R.S. Flavoprotein and peroxidase as constituents of the indolacetic oxidase of peas. **American Journal of Botany**, v.37, p.677-78, 1950.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; HAUSMAN, J. F. et al. Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation. In: LUMDSEN, P. J.; NICHOLAS, J. R.; DAVEIS, W. J. **Physiology, growth and development of plants in culture**. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht, 1994. p. 289-298.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; HAUSMAN, J.F. Indissociable chief factors in the inductive phase of adventitious rooting. In: ALTMAN, A.; WAISEL, Y. (eds). **Biology of Root Formation and Development**. Plenum Press, New York, 1997. p. 55-63.
- GASPAR, Th.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPPIN, H. **Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants**. Genève: University of Genève. 1982. 324p.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1995.
- HORWITZ, H. **Official method of analysis of the association of official agricultural chemists**. 8.ed. Washington: Association of Agricultural Chemists, 1995. 844p.
- KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.39, p.83-89, 2003.
- KOSAR, M.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 91, p. 525-533, 2005.
- KROON, P.A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plants and foods: current and future perspectives. **Journal of Science Food Agricultural**, v. 79, p. 355-61, 1999.

- LAMAISON, J.L.; PETIJEAN-FREYTET, C.; CARNAT, A. Teneurs en acide rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activité antioxydante chez les Apiacées, les Boraginacées et les Lamiacées médicinales. **Annals Pharmaceutical Fragrance**, v. 48, p. 103-108, 1990.
- LIMA, G.P.P. **Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas e atividade da peroxidase e redutase de nitrato em calos de arroz (*Oryza sativa* L. cv. IAC 4440)**. 1994. 85p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry**, v. 75, p. 197–202, 2001.
- MÄDER, M.; MÜNCH, P.; BOPP, M. Regulation und bedeutung der peroxidase-musteränderungen in sprossdifferenzierenden kallusulturen von *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, v. 123, p. 257-265, 1975.
- MAILLARD, M.N., BERSET, C. Evolution of antioxidant activity during kilning role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1789-1793, 1995.
- MALENCINC, Dj.; GASIC, O.; POPOVIC, M.; BOZA, P. Screening for antioxidant properties of *Salvia reflexa* Hornem. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 546-548, 2000.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1998. 220p.
- MASAKI, H.; SAKAKI, S.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts, **Biological Pharmacological Bulletin**, v. 18, p. 162-166, 1995.
- MATHESIUS, U. Flavonoids induced in cells inducing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidases. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p.419-426, 2001.
- MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 12-130, 2001.
- MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; CARVALHO, A. Z.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, V.; MAZUTTI, M.; FILHO, I. N.; ECHEVERRIGARAY, S. Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using highpressure CO₂. **Fitoterapia**, v. 75, p. 168-178, 2004.
- OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Trends in Food Science e Technology**, v. 16, p. 344-350, 2005.

- PEDREÑO, M.A.; ROS BARCELÓ, A.; GARCÍA-CARMONA, F.; MUÑOZ, R. Oxidation of dihydroxyfumaric acid in the absence of H₂O₂ by cell-wall bound peroxidases from lupin: A possible general model. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.28, p.37-42, 1990.
- POKORNY, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science e Technology**, v. 9, p. 223-227. 1991.
- RENARD, C. M. G. C.; BARON, A.; GUYOT, S.; DRILLEAU, J. F. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, p. 115-125, 2001.
- RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.
- RIVAL, A.; BERNARD, F.; MATHIEU, Y. Changes in peroxidase activity during in vitro rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Scientia Horticulturae**, v. 71, p. 103-112, 1997.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.
- SANTOS, M.D.; BLATT, C.T.T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. De mata e cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, p.135-140, 1998.
- SANTOS-GOMES, P.C.; SEABRA, R.M.; ANDRADE, P.B.; FERNANDES-FERREIRA, M. Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.), **Plant Science**, v. 162, p.981-987, 2002.
- SCHWARZ, K.; TERNES, W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. **Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung und Forschung**, v. 195, p. 99-103. 1992.
- SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, v.30, p.507-512, 1974.
- SERAFINI, L.A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AEVEDO, J.L. (Eds). Guaíba, RS: Agropecuária. p. 333-377, 2001.
- SOUZA, C.M.M. SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante em cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, p.351-355, 2007.
- STARZYNSK, A.; MARECZEK, A. Physiological changes in the antioxidant system of broccoli flower buds senescing during short-term storage, related to temperature and packaging. **Plant Science**, v.165, p.1387-1395, 2003.

- TEPE, B., EMINAGAOGLU, O.H., AKPULAT, A., AYDIN, E., Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn e Bornm.) Bornm. **Food Chemistry**, v.100, p.985-989, 2007.
- VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J.; Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37-56, 2004.
- VELLOSA, J.C.R.; BARBOSA, V.F.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Pesquisa de produtos naturais: plantas de radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, p. 119-130, 2007.
- VIEIRA, E.L.; CASTRO, P.R.C. **Ação de bioestimulante na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Cosmópolis: Stoller do Brasil, 2004. 74p.
- VOLPERT, R.; OSSWALD, W.; ETYSNER, E.F. Effects of cinnamic acids derivatives in indole acetic acid oxidation by peroxidase. **Phytochemistry**, v. 38, p. 19-32, 1995.
- WAGNER, G.R.; YOUNGMAN, R.Y.; ESTNER, E.F. Inhibitors of chloroplast photo-oxidation by flavonoids and mechanism of the antioxidative action. **Journal of Phytochemistry and Photobiology**, v. 1, p. 451-460, 1988.
- WHITAKER, J.R., LEE, C.Y. Recent advances in chemistry of enzymatic browning: an overview. **Food Technology**, v. 44, p. 116-122, 1995
- ZHAO, G.R.; XIANG, Z.J.; YUAN, Y.J.; GUO, Z.X. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. **Food Chemistry**, v. 99, p. 767-774, 2005.

3- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os diferentes reguladores vegetais e bioestimulantes utilizados neste trabalho promoveram aumento no desenvolvimento de plantas de *Salvia officinalis* L. Os resultados obtidos mostram a eficiência destas substâncias no desenvolvimento, principalmente, na formação da parte aérea, rendimento de óleo essencial, sem perda na qualidade de seus constituintes químicos, além de aumento na atividade antioxidante.

O regulador vegetal IBA demonstrou ser o melhor tratamento para aumentar a produtividade de *S. officinalis*, promovendo aumento no desenvolvimento, teor de óleo essencial, fenóis totais, flavonóides e atividade antioxidante.

Reguladores vegetais e bioestimulantes podem promover variações anatômicas no limbo de plantas de *Salvia officinalis* L. Alguns autores relatam que durante o processo de desenvolvimento foliar pode ocorrer alterações no mesofilo foliar além de alterações na formação e distribuição dos tricomas glandulares. Assim, a presença de reguladores vegetais e bioestimulantes pode resultar em alterações morfológicas no mesofilo foliar. Portanto, estudos envolvendo análise da anatomia foliar poderão corroborar para o conhecimento dessas possíveis alterações em plantas de *Salvia officinalis* L. submetidas a tratamentos com diferentes reguladores vegetais e bioestimulantes.

4- CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo com plantas de *Salvia officinalis* L. tratadas com diferentes reguladores vegetais e bioestimulantes, levaram a concluir que:

- 1– Os reguladores vegetais, IBA e BAP, promoveram maiores incrementos na produtividade vegetal, principalmente na formação da parte aérea;
- 2– IBA foi o tratamento mais efetivo no aumento da produção de óleo essencial e a melhor época de coleta para obtenção de maior rendimento foi aos 120 D.A.E. para todos os tratamentos, sem alteração nos componentes químicos do óleo;
- 3– O IBA promoveu ainda aumento nos teores de fenóis totais e flavonóides e, também, na atividade antioxidante, aos 81 D.A.E. e
- 4- A atividade enzimática foi maior aos 84 D.A.E. em plantas tratadas com GA₃ e BAP para peroxidase e IBA, GA₃ e Stimulate® promoveram maior atividade da polifenoloxidase.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIDILLE, M. D. H.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, p. 891-896, 2005.
- AKISUE, G. Um novo aparelho extrator de óleo essencial. **Academia Brasileira de Ciências**, v. 44, p. 158-160, 1972.
- ALCARAZ, M.J.; JIMÉNEZ, M.J. Flavonoids as anti-inflammatory agents. **Fitoterapia**, v. 59, p.25-38, 1988.
- ALLEONI, B.; BOSQUEIRO, M.; ROSSI, M. Estudo dos reguladores vegetais de stimulate no desenvolvimento e produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Publicatio UEPG**, v.6, n.1, p. 23-35, 2000.
- AMELUNXEN, F. Electronenmikroskopische untersuchungen an den drüsenhaaren von *Mentha piperita* L. **Planta Medica**, v. 2, p. 121-139, 1964.
- AMELUNXEN, F. Electronenmikroskopische untersuchungen an den drüsenhaaren von *Mentha piperita* L. **Planta Medica**, v.1 3, p. 457-473, 1965.
- AREIAS, F; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; FERRERES, F.; SEABRA, R.M. flavonoids and phenolic acids of sage: influence of some agricultural factors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 6081-6084, 2000.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, 89, p. 27-36, 2005.
- AUDUS, L.J. **Plant growth substances**. London: Leonard Hill, 1972. 533p.
- BARICEVC, D.; BARTOL, T. The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus V., Pharmacology. In: **Sage: the genus Salvia**. KINTZIOS, S.E. (Ed). Abingdon: Harwood Academic Publishers, 2000. p. 347-420.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa da Universidade Federal de Viçosa, 1986. 326p.
- BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, R.F.; ORTUÑO, AA.; DEL RIO, J.AA. Uses and proprieties of *Citrus* flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.45, p. 4505-4515, 1997.
- BENDL, E.; KROYER, G.; WASHÜTTL, J.; STEINER, I. Untersuchungen über die gefriertrocknung von thymian und salbei. **Nutrition**, v. 12, p. 793-795, 1988.
- BRACCINI, A.L.; MONFERDINI, M.A.; ÁVILA, M.R.; SCAPIM, C.A.; BRAMBILLA, D.; ARAGÃO, R.M.; BRAMBILLA, T. Emergência das plântulas e componentes da produção de sementes em resposta a diferentes doses e formas de aplicação do bioestimulante Stimulate 10X na cultura da soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL

- DO BRASIL, 27, Cornélio Procópio, 2005. **Resumos Expandidos...** Londrina: Embrapa Soja, 2005. p.565-566.
- BRIESKORN, C.H.; KAPADIA, Z. Constituents of *Salvia officinalis*, XXIII: 5-methoxysalvigenin in leaves of *Salvia officinalis*. **Planta Medica**, v. .35, p.376-378, 1979.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. London, UK: Intercept, 1999. 1119p.
- CASTRO, H. G.; FERREIRA, A. F.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**, 2. ed. Viçosa: Gráfica Suprema e Editora, 2004. p. 48-66.
- CASTRO, P.R.C., PACHECO, A.C., MEDINA, C.L. Efeitos de stimulate e de micro-citros no desenvolvimento vegetativo e na produtividade da laranjeira pêra. **Scientia Agrícola**, v.55, 1998.
- CASTRO, P.R.C.; PACHECO, A.C.; MEDINA, C.L. Efeitos de Stimulate e de micro-citros no desenvolvimento vegetativo e na produtividade da laranjeira 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Scientia Agrícola**, v.55, p. 338-341,1998.
- CASTRO, P.R.C.; VIEIRA, E.L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. 132p.
- CECY, C. **Farmacognosia**. Curitiba: Fundação Caetano Munhons da Rocha, 1989. 52p.
- CHIPAULT, J.; MIZUMO, G.; LUNDBERG, W. The antioxidant properties of spices in foods. **Food Technology**, v. 10, p. 209-211, 1956.
- CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.R.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices, **Food Research**, v. 17, p. 46-55. 1952.
- CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809-816, 2005.
- CLAUS, E.P. **Pharmacognosy**. 4.ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1961.
- CORREA JÚNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais condimentares e aromáticas**. 1ªed. Curitiba: Emater, 1991. 162 p.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994, 1031 p.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Caloust Gulbenkian, 1986. 853 p.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p.
- CROTEAU, R.; FELTON, M.; KARP, F.; KJONAAS, R. relationship of camphor biosynthesis to leaf development in sage (*Salvia officinalis*). **Plant Physiology**, v. 67, p. 820-824, 1981.

CROTEAU, R.; KARP, F. Biosynthesis of monoterpenes: enzymatic conversion of nerly pyrophosphate to 1,8-cineole, α -terpienol, and cyclic monoterpene hydrocarbons by a cell-free preparation from sage (*Salvia officinalis*). **Archives of Biochemistry and Biophysical**, v. 176, p. 734-746, 1976.

CROTEAU, R.; KARP, F. Demonstration of a cyclic pyrophosphate intermediate in the enzymatic conversion of neryl pyrophosphate to borneol. **Archives of Biochemistry and Biophysical**, v.184, p.77-86, 1977.

CUPPETT, S. L.; HALL III, C. A. Antioxidant activity of the Labiatae. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 42, p. 245-271, 1998.

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

CUVELIER, M.E.; BERSET, C.; RICHARD, H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). **Journal os Agricultural and Food Chesmistry**, v. 42, p. 665-669, 1994.

DAS, N.P.; PEREIRA, T.A. Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure-activity relationships. **Journal America Oil Chemistry Society**, v. 67, p. 255-258. 1990.

DECKER, E.A. The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine and pyrroloquinoline quinine as nonessential dietary antioxidants. **Nutrition Review**, v.53, p.49-58, 1995.

DEY, P.M.; HARBONE, J.B. **Plant biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1997. 554p.

DJARMATI, Z.; JANKOV, R.M.; KJORDJEVIC, A.; RIBAR, B.; LAZAR, D. ENGEL, P. Carnosic acid 12-methyl ether- γ -lactone, a ferruginol-type diterpene from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry**, v. 31, p.1307-1309, 1992.

DRAZIC, S.; BRKIC, D. Variability of chemical properties of sage (*Salvia officinalis*). **Egyptian Journal of Horticulture**, v. 27, p. 459-478, 2001.

DUKE, J.A. Biologically: active compounds important spices. In: CHARALAMBOUS, G. Spices, herbs and edible fungi. Amsterdam: Elsevir Publishers, 1994. **Egyptian Journal of Horticulture**, v. 27, p. 459-478, 2002.

EID, M.N.A.; ABMED, S.S. Preliminary studies on the effect of gibberellic acid and cycocel on the growth and essential oil content of *Ocimum basilicum* L. **Egyptian Journal of Horticulture**, v.3, p.83-87, 1976.

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G. M.; MCGARVEY, D. J.; MORTESSEN, A.; PHILLIP, D. M.; TRUSCOTT, T. M.; YOUNG, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidantpro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, p. 37-48, 2004.

- EL-KELTAWI, N.E.; CROTEAU, R. Influence of ethephon and daminozid on growth and essential oil content of peppermint and sage. **Phytochemistry**, v. 25, p.1285-1288, 1986.
- EL-KELTAWI, N.E.; CROTEAU, R. Influence of foliar applied cytokinins on growth and essential oil content of several members of Lamiaceae. **Phytochemistry**, v. 26, p .891-895, 1987.
- EL-KHATEEB, M.A. Effect of some growth regulators on the vegetative growth and essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. plant. **Bulletin Faculty of Agriculture, University of Cairo**, v. 40, n. 2, p. 333-346, 1989.
- EL-SAHHAR, K.F.; FOUAD, M.K.; FAHMI, R.; RAID, F. Effect of gibberellic acid (GA₃) on some botanical and chemical characteristics of basil (*Ocimum basilicum* L.). **Annals of Agricultural Science Cairo**, v. 29, n. 1, p. 401-414, 1984.
- EVANS, W.C. **Farmacognosia**. México: Interamericana, 1991. 812p.
- FARAG, R.S.; BADEI, A.Z.M.A.; HEWEDI, F.M.; EL-BAROTY, G.S.A. Antioxidant activity of some spices essential oils on linoleic acid oxidantion in aqueous media. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 66, p. 792-799, 1989.
- FARNSWORTH, N.R.; SOEJARTO, D.D. Global importânce of medicinal plants. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (Eds.). **Conservation of medicinal plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 25-51.
- FAROOQI, A.A.; DEVIAH, K.A.; VASUNDHARA, M. Effect of some growth regulators and pinching on growth, yield and essencial oil content of davana (*Artemisia pallens*_Wall). **Indian Perfumer**, v. 37, p. 19-23, 1993.
- FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problem of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1925-1941, 2000.
- GOTTLIEB, O.R. Evolução e função de óleos essenciais. In: SIMPÓSIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 1., 1985, São Paulo. **Anais...**São Paulo: USP, 1985. p. 175-191.
- GOTTLIEB, O.R. Phytochemistry and evolution of angiosperms. **Anais Brasileiro de Ciência**, v. 56, p. 43-50, 1984.
- GOTTLIEB, O.R.; SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, v. 39, p. 707-716, 1987.
- GRANEIRO, J. Quelques problèmes rencontrés au cour de l' obtention, du contrôle et de l'étude de la composition d' une huile essentielle. **Rivista Italiana Essenze Profumi Pianta officinali**, v. 58, p. 14-109. 1976.
- GRELLA, G.E.; PICCI, V. Variazion stagionali dell'olio essenziale di *Salvia officinalis*. **Fitoterapia**, v. 59, p. 97-102, 1988.

- GUENTHER, E. **The essential oils:** individual oils of the plant families Rutaceae and Labiatae. New York: D. Van Nostrand., 1949. 400 p.
- GUILLEN, M.D.; CABO, N.; BURILLO, J. Characterization of the essential oil of some cultivated aromatic plants of industrial interest. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 70, p. 359-363, 1996.
- HAIKAL, M.; BADR, M. Effect of some GA₃ and CCC treatments on the growth and oil quantity and quality of chamomile. **Egyptian Journal of Horticulture**, v. 9, p. 117-123, 1982.
- HARLEY R.M. **Summary statistics for Brazil: Labiatae.** Versão 22 de janeiro de 1994. 9 p. Mimiografado.
- HASLAM, E., 1996, Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215.
- HEDGE, I.C. A global survey of the biogeography of the Labiatae. In. HARLEY, R.M.; REYNOLDS, T. (Eds). **Advances in Labiatae Science.** London: Royal Botanic Gardens Kew, 1992. p. 7-17.
- HENDERSON, W.; HART, J.W.; HOW, P.; JUDGE, J. Chemical and morphological studies on sites of sesquiterpene accumulation in *Pogostemon cablin* (patchouli). **Phytochemistry**, v. 9, p. 1219-1228, 1970.
- HERTWIG, I.F.V. **Plantas aromáticas e medicinais.** 2. ed. São Paulo: Cone, 1991. 414 p.
- HOHMANN, J.; ZUPKÓ, I.; RÉDEI, D.; CSÁNYI, M.; FALKAY, G.; MÁTHÉ, I.; JANICSÁK, G. Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. **Planta Médica**, v. 65, p. 576-578, 1999.
- HOWE, H.F.; WESTLEY, L.C. **Ecological relation ship of plants and animals.** Oxford: University Press, 1988. p. 29-87.
- HUKERI, V.I.; KALYANI, G.A.; KAKRANI, H.K. Hypoglycemic activity of favonoids of *Phyllanthus fraternus* in rats. **Fitoterapia**, v. 59, p. 68-70, 1988.
- ISMAIL, A.; MARJAN; Z.M.; FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v. 87, p. 581-586, 2004.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant systematics:** a phylogenetic approach. Sunderland: Sinauer Associates, 1999. 464p.
- KARL, C.; PEDERSEN, P.A.; MÜLLER, G. The occurrence of viridiflorol in *Salvia officinalis*. **Planta Médica**, v. 44, p. 188-189, 1982.
- KHOSA, R.L.; PANDEY, V.B.; SINGH, J.P. Experimental studies on *Zizyphus rugosa* (Lam) bark. **Indiam Drugs**, v.20, p.241. In: Chemical Abstract, Washington, v.99, n.13, p.57, 1983.

- KOLLER, O.C. **Citricultura:** laranja, limão e tangerina. Porto Alegre: Rígel, 1994. 446 p.
- KOONO, S. Growth and ripening of soybean. **Technical Bulletin Food Fertility Technology Centre**, v. 32, p. 1-22. 1977.
- KRYS'KOV, E.L.; SHKURAT, D.F. The reaction of the mint *Mentha piperita* to GA₃. **Botanichnyi Zhurnal**, v. 46, p. 707-710, 1961.
- LAMAISON, J.L.; PETIJEAN-FREYTET, C.; CARNAT, A. Teneurs en acide rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activité antioxydante chez les Apiacées, les Boraginacée et les Lamiacées médinales. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 48, p. 103-108, 1990.
- LÄNGER, R.; MECHTLER, C.; TANZLER, H.O.; JURENITSCH, J. Differences of the composition of the essential oil within an individuum of *Salvia officinalis*. **Planta Médica**, v.59, p. 635-636, 1993.
- LAWRENCE, B.M.; HOGG, J.W.; TERHUNE S.J. *Les huiles essentielles et leurs constituents*. IV. Quelques nouveaux constituents á l' état de traces dans l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. **Parfums Cosmetiques Savons de France**, v. 1, p. 256-259, 1971.
- LEJA, M.; MARECZEK, A.; BEN, J. Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage. **Food Chemistry**, v. 80, p. 303-307, 2003.
- LI, Y.I.; CRAKER, L.E.; POTTER, T. Effect of light level on essential oil production of sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*). Proceedings Int. Symp. Medicinal and Aromatic Plants. **Acta Horticulturae**, v. 426, p. 419-426, 1996.
- MACCIONI, A.M.; ANCHISI, C.; SANNA, .A; SARDU, C.; DESSI, S. Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 24, p. 53-59, 2002.
- MADSEN, H.L.; BERTELSEN, G.; SKIBSTED, L.H. Antioxidative activity of spices and spices extracts. In: RISCH, S.J.; HO, C.T. (eds). **Spices, Flavour Chemistry and Antioxidant Properties**. Washington, DC: American Chemical Society, (ACS), 1997. p 176-187.
- MAHMOUD, S.E.D.M.; SHETTY, K. Response of growth and essential oil content of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) to some natural hormones. **Acta Horticulturae**, v. 426, p. 629-634, 1996.
- MANCINI-FILHO, J.; MOREIRA, A.V.B. Efeito dos compostos fenólicos de especiarias sobre lipídios polinsaturados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 130-133, 2003.
- MANOLOVA, N.; SERKEDJIEVA, J.; IVANOVA, V. Anti-influenza activity of the plant preparation 'Broncho Pam'. **Fitoterapia**, v. 56, p. 223-226, 1995.

- MARTINS, E.R. **Morfologia interna e externa, caracterização isozimática e óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth.** Viçosa, MG: UFV, 1996. 97p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, 1998. 220p.
- MASAKI, H.; SAKAKI, S.; ATSUMI, T. SAKURAI, H. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. **Biological Pharmacological Bulletin**, v. 18, p. 162-166, 1995.
- MÁTHÉ JR, I.; OLÁH, L.; MÁTHÉ, A.; MIKLÓSSY, V.V.; BERNÁTH, J.; BLUDEN, G.; PATEL, A.V.; MÁTHÉ, I. Changes in the essential oil production of *Salvia officinalis* under climatic conditions of the temperature belt. **Planta Médica**. v. 58, p. 680, 1992.
- MELO, E.A; MANCINI FILHO, J.; GUERRA, N.B. Characterization of antioxidant compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum* L.). **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 38, p. 15-19, 2005.
- MILLÉO, M.V.R.1; VENÂNCIO, W.S.1; MONFERDINI, M.A. Avaliação da eficiência agronômica do produto Stimulate aplicado no tratamento de sementes e no sulco de plantio sobre a cultura do milho (*Zea mays* L.). **Arquivos Instituto Biológico**, v. 67, p. 1-145, 2000.
- MING, L.C. **Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na população de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia Alba* (Mill) N. E. Br. – Verbenaceae.** 1992. 206p. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de concentração Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- MISRA, M. The effect of gibberellic acid (GA₃) on the growth, photosynthetic pigment content and oil yield of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) plants grown in shade condition. **Acta Physiology of Plant**, v. 17, p. 367-370, 1995.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**, v. .26, p. 211-219, 2004.
- MÜLLER, J.; KÖLL-WEBER, M.; KRAUS, W. Effect of drying on the essential oil of *Salvia officinalis*. **Planta Médica**, v. 58, p. 678, 1992.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatografy A**, v. 1054, p. 95- 111, 2004.
- NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, p. 273-300. 1990.
- NEWALL, C.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. Sage. In: NEWALL, C.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. (Eds). **Herbal medicines: a guide for health-care professionals.** London: The Pharmaceutical Press, 1996. p. 347-372.

- NICKELL, L.G. **Plant growth regulators**. Berlin: Springer, 1982. 173p.
- OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Trends in Food Science e Technology**, v. 16, p. 344-350, 2005.
- PERRY, N.B.; ANDERSON, R.E.; BRENNAN, N.J.; DOUGLAS, M.H.; HEANEY, A.J.; MCGIMPSEY, J.A.; SMALLFIELD, B.M. Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons, and sites. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 2048-2054, 1999.
- PICCAGLIA, R.; MAROTTI, M. Characterization of several aromatic plants grown in northern Italy. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 8, p. 115-122, 1993.
- PITAREVIC, I.; KUFTINEC, J.; BLAZEVIC, N.; KUSTRAK, D. Seasonal variation of essential oil yield and composition of Dalmatian sage, *Salvia officinalis*. **Journal of Natural Products**, v. 47, p. 409-412, 1984.
- POVH, J.A.; ONO, E.O. Rendimento de óleo essencial de *Salvia officinalis* L. sob ação de reguladores vegetais. **Acta Scientiarum, Biological Science**, v. 28, p. 189-193, 2006.
- POVH, J.A.; ONO, E.O. Efeito do ácido giberélico na composição do óleo essencial de *Salvia officinalis* L. **Publicatio, UEPG**, v. 13, p. 7-10, 2007.
- POVH, J.A. **Efeitos de reguladores vegetais no desenvolvimento de plantas de *Salvia officinalis* L. e na produção de óleo essencial**. 2004. 93p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- PRATT D.E.; BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity in soybeans. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 1720-1722, 1979.
- PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; DUDAI, N.; CARMELI, D.; ESHEL, A. Variation in essential oil of *Artemisia judaica* chemotypes related to phenological and environmental factors. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 7, p. 253-257, 1992.
- PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; DUDAI, N. The influence of season and harvest frequency on essential oil and herbal yields from a pure clone of sage (*Salvia officinalis*) grown under cultivated conditions. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 326-329, 1986.
- RAMARATHNAM, N.; et al. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 75-82, 1995.
- REICHLING, J.; BECKER, H.; VOMEL, A. Herbicide im Kamillenanbau (*Matricaria chamomilla* L.). **Planta Medica**, v. 32, p. 235-242, 1977.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4. ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682p.
- SANGWAN, N.S.; FARROQI, A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plant. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.

- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutritional**, v. 130. p. 2073-2085, 2000.
- SCAVRONI, J.; VASCONCLOS, M.C.; VALMORBIDA, J.; FERRI, A.F.; MARQUES, M.O.M.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Rendimento e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* L. submetida a aplicações de giberelina e citocinina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 40-43, 2006.
- SCHWARZ, K.; TERNES, W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. **Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung und Forschung**, v. 195, p. 99-103, 1992.
- SERAFINI, L.A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AEVEDO, J.L. (Eds). Guaíba, RS: Agropecuária. p. 333-377, 2001.
- SHEDEED, M.R.; EL-GAMASSY; K.M., HASHIM; M.E., KANDEEL, A.M. Physiological studies on the growth, oil yield and chemical constituents in basil plant, *Ocimum basilicum* L. **Annals of Agricultural Science Cairo**, v. 35, p. 971-979, 1990.
- SHUKLA, A.; FAROOQI, A.H.A.E. Review: utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. **Current Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 12, p. 152-177, 1990.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Ed. Da Universidade Federal de Santa Catarina, 1999. 821p.
- SINGH, P.; MISRA, A. Influence of giberellin and ethrel on growth, chlorophyll content, protein, enzyme activities and essential monoterpene oil in an efficient genotype of *Mentha spicata* var. MSS5. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science**, v. 22-23, p. 283-286, 2001.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.
- STAHL, E.; WOLLENSAH, A. Observations on the function of the glandular hairs of yarrow: 4th report: effects of selective herbicides on the glandular hairs tissue of the florest. **Journal of Plant Physiology**, v. 122, p. 93-96, 1986.
- STTAFORD, H.A. **Flavonoid metabolism**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 298p.
- TADA, M.; HARA, T. CHIBA, K.A. A quinone methide from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1475-1477, 1997.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 705p.

- TECCHIO, M.A.; PAIOLI-PIRES, E.J.; RODRIGUES, J.D.; VIEIRA, C.R.Y.I.; TERRA, M.M.; BOTELHO, R.V. Aplicação de bioestimulante nas características ampelométricas da infrutescência da videira 'tieta'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 300-303, 2005.
- TEKEL'OVA, D. *Salvia officinalis* L. Part 1. **Ceske farmaceuticke**, v. 42, p. 111-116, 1993.
- TERNES, W.; SCHWARZ, K.; Antioxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* IV. Determination of carnosic acid in different foodstuffs. **Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung und Forschung**, v. 201, p. 548-550, 1995.
- TREASE, E.G.; EVANS, C.W. **Pharmacognosy**. 11. ed. London: Baillare Tindall, 1978. 812p.
- TRONCHET, A. The effects of GA treatment on plants of *Lepidium sativum*, *Mercurialis annua* and *Ocimum basilicum*. **Bulletin of the Society of History Natural**, v. 4, p. 85-86, 1961.
- TYLER, V.E.; BRADY, L.R.; ROBERTS, J.E. **Pharmacognosy**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1988. 519p.
- UMESHA, K.; BOJAPPA, K.M.; FAROOQI, A.A.; SUBBAIAH, T. Effect of gibberellic acid and cycocel on growth, yieed and quality of clocimum (*Ocimum gratissimum* L.). **Indian Perfumer**, v. 35, p. 53-57, 1991.
- VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J.; Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37-56, 2004.
- VENKATACHALAM, K.V.; KJONAAS, R.; CROTEAU, R. Development and essential oil content of secretory glands of sage (*Salvia officinalis*). **Plant Physiology**, v. 76, p. 148-150, 1984.
- VIEIRA, E.L.; CASTRO, P.R.C. **Ação de bioestimulante na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Cosmópolis: Stoller do Brasil, 2004. 74p.
- VIEIRA, E.L.; CASTRO, P.R.C. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, p. 222-228, 2001.
- WANG, M.; LI, J.; RANGARAJA, M.; SHAO, Y.; LaVOIE, E.; HUANG, T-C.; HO, C-T. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p. 4869-4873, 1998.
- WAREING, P.F.; PHILIPS, I.D.J. **Growth and differentiation in plants**. 3rd edition, Oxford, Pergamon Press. 1985.

YOUSSEF, A.A.; TALAAT, I.M.. Physiological effect of brassinosteroid and kinetin on the growth and chemical constituents of lavender plant. **Annals of Agricultural Science Cairo**, v. 43, p. 261-272, 1998.

ZLATEV, S.R.; ILIEV, L.; ZLATEVA, M.; VASILEV, G. Effect of some cytokinins on the green mass and essential oil yield of peppermint. *Rast Nuk*, v. 15, p. 51-56, 1978. In: SHUKLA, A.; FAROOQI, A.A. Utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. **Current Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 12, p. 152-157, 1990.