

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Caracterização Química e Biológica da Planta Aromática e Medicinal

Salvia officinalis L. var. *purpurascens*

Tese de Doutoramento em Ciências da Terra e da Vida

Maria Filipa de Castro Carneiro Martins

Nome dos Orientadores:

Professora Doutora Berta Maria de Carvalho Gonçalves Macedo

Professora Doutora Ana Isabel Ramos Novo Amorim de Barros

Professora Doutora Carla Maria Alves Quintelas do Amaral Marinho



Vila Real, 2016

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Caracterização Química e Biológica da Planta Aromática e Medicinal
Salvia officinalis L. var. *purpurascens*

Maria Filipa de Castro Carneiro Martins

Tese apresentada à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Terra e da Vida, realizada sob a orientação científica de: Professora Doutora Berta Maria de Carvalho Gonçalves Macedo, Professora Doutora Ana Isabel Ramos Novo Amorim de Barros e Professora Doutora Carla Maria Alves Quintelas do Amaral Marinho.

As doutrinas apresentadas no presente trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor.

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Caracterização Química e Biológica da Planta Aromática e Medicinal
Salvia officinalis L. var. *purpurascens*

Tese de Doutoramento em Ciências da Terra e da Vida

Nome do candidato: Maria Filipa de Castro Carneiro Martins

Nome dos Orientadores:

Professora Doutora Berta Maria de Carvalho Gonçalves Macedo

Professora Doutora Ana Isabel Ramos Novo Amorim de Barros

Professora Doutora Carla Maria Alves Quintelas do Amaral Marinho

Composição do Júri:

Jorge Ventura Ferreira Cardoso

Ana Isabel Ramos Novo Amorim de Barros

António Castro Ribeiro

Berta Maria de Carvalho Gonçalves Macedo

Eunice Luis Vieira Areal Bacelar

Fernando Jorge Andrade Gonçalves

Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira

Vila Real, 2016

Agradecimentos

Agradeço à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, na pessoa do Magnífico Reitor, Sr. Professor Doutor António Fontainhas Fernandes, por me ter proporcionado o ingresso neste doutoramento, assim como ao corpo docente que me acompanhou.

As minhas palavras de apreço vão para as minhas Orientadoras: Professora Doutora Berta Gonçalves, do Departamento de Biologia e Ambiente, por ter-me incentivado a trilhar este caminho científico, pela oportunidade de realizar este trabalho e não menos importante, o apoio incondicional, a paciência e amizade que sempre me concedeu; à Professora Doutora Ana Barros e Professora Doutora Carla Amaral, pelos auxílios prestados, pela constante ajuda e valiosos ensinamentos, disponibilidade, assim como, pela leitura crítica e atenta desta tese.

Ao Professor Doutor Aureliano Malheiro, pela disponibilidade demonstrada sempre que por mim foi solicitado, no apoio e fornecimento dos dados meteorológicos.

À Professora Doutora Alexandra Esteves por tão gentilmente ter cedido os inóculos dos fungos pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do DeBA, e os inóculos das bactérias pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia.

Ao Professor Doutor António Crespi pela gentileza da cedência das plantas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* utilizadas nesta tese.

Ao Professor Doutor José Manuel Moutinho pela ajuda prestada na realização das medições fisiológicas.

A todos os funcionários dos Laboratórios do Departamento de Biologia e Ambiente, especialmente à Mestre Helena Ferreira e ao Fernando Ferreira, pela simpatia, paciência, disponibilidade e valioso apoio sempre evidenciado durante as diferentes fases desta tese.

À colega Irene Gouvinhas do Laboratório de Química pelas horas disponibilizadas de ajuda laboratorial. Aos Doutores Nelson Machado e Ivo Oliveira pelo apoio ao nível estatístico.

Finalmente, as últimas palavras mas, não menos importantes, vão para a minha família que desde sempre me encorajou nas horas mais difíceis. Ao meu marido pela amizade, carinho e confiança que teve ao longo destes anos. E, em especial, um agradecimento aos meus filhos Guilherme e Clarisse pela paciência e compreensão que demonstraram durante este período das nossas vidas, em especial quando utilizei algum do Vosso tempo para o desenvolvimento deste trabalho.

O meu MUITO OBRIGADA

Aos meus filhos Guilherme e Clarrisse

Resumo

Na etnobotânica Portuguesa estão descritas várias plantas aromáticas e medicinais (PAM) que apresentam propriedades antioxidantes e antimicrobianas. A atividade antioxidante é atribuída a substâncias biologicamente ativas, principalmente aos compostos fenólicos, que têm efeitos benéficos na saúde humana, particularmente na redução de risco das doenças cardiovasculares e de vários tipos de cancro. O estudo da atividade antimicrobiana é de extrema importância, dado que o aumento da resistência dos microrganismos patogénicos aos antibióticos causa graves problemas de saúde pública e elevados prejuízos económicos. A espécie *Salvia officinalis* L. é uma PAM da família Lamiaceae que contém muitos compostos de interesse farmacológico, alguns dos quais já identificados. Assim com base nestas evidências, a presente investigação teve como objetivo principal efetuar uma caracterização morfoanatômica, fisiológica e bioquímica de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*, a salva rubra, de folhas jovens e adultas ao longo dos ciclos vegetativos de 2011 e 2013, e relacionar a sua utilização com possíveis ações farmacológicas, tal como a sua importância como antioxidante e a sua atividade antimicrobiana. Neste estudo selecionaram-se plantas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* pertencentes à coleção de plantas aromáticas e medicinais existentes no Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Verificou-se que as folhas de salva rubra apresentam uma anatomia típica das plantas pertencentes à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida. Apresentam mesófilo heterogéneo, são dorsiventrais e com estomas reniformes de distribuição hipostomática. Em ambas as páginas dos dois tipos de folhas surgem tricomas glandulares e não glandulares. Pela análise dos resultados é possível constatar que em resposta à ontogenia foliar, a espécie *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* apresentou diferenças significativas ao nível da anatomia, fisiologia e bioquímica. De facto, as folhas adultas de coloração verde apresentaram uma maior área, bem como uma maior espessura da lâmina total e dos tecidos condutores. Adicionalmente, estas folhas registaram menores condutâncias estomáticas e taxas de transpiração, melhorando a eficiência intrínseca do uso da água ao longo dos ciclos vegetativos. Verificou-se ainda uma menor peroxidação lipídica das membranas celulares de folhas adultas, que contribuíram certamente para a diminuição da perda de eletrólitos. Por outro lado, as folhas jovens de coloração púrpura registaram maior concentração de pigmentos fotossintéticos e de ceras intra e epicuticulares solúveis. Relativamente ao efeito da data de colheita, determinou-se uma maior concentração de pigmentos fotossintéticos e

amido, bem como de ceras solúveis e de suculência foliar, mas menor área foliar e concentração de açúcares solúveis em setembro. Já quanto ao efeito do ano, verificou-se uma maior concentração de pigmentos fotossintéticos e de amido e ainda de suculência foliar no ano 2011, considerado o mais quente desde 1930. Em suma, as variações nos parâmetros estudados, quer na estação do ano quer do próprio ano de colheita, sugerem uma forte influência das condições climáticas.

Relativamente aos compostos fenólicos analisados verificou-se uma clara diferenciação entre as folhas secadas e frescas, sendo estas últimas caracterizadas por uma menor quantidade de fenóis totais relativamente às amostras de folhas secadas. Verificou-se ainda que as amostras de folhas frescas apresentam uma maior uniformidade entre si, relativamente aos parâmetros em estudo (fenóis totais, *orto*-difenóis e flavonoides), quando comparadas com amostras secas, o que indica a existência de uma maior similaridade entre elas. A atividade antioxidante desta planta está associada à acumulação de numerosos compostos secundários e orgânicos, nomeadamente os *orto*-difenóis e flavonoides. Apesar de não ser possível inferir com precisão quais são os compostos responsáveis pela ação antioxidante, os *orto*-difenóis e os flavonoides devem ser parcialmente responsáveis por esta atividade.

A atividade antimicrobiana foi testada usando-se extratos etanólicos e hidroetanólicos, para avaliar a sua possível utilização farmacológica. Os extratos foram testados em leveduras das espécies *Candida albicans* (ATCC90028), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida oleophila* (isolado na UTAD), e 3 bactérias das espécies *Escherichia coli* (0157H7607914), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 679). Verificou-se que o extrato em estudo inibiu apenas modestamente as espécies testadas. As espécies mais susceptíveis foram a bactéria *Staphylococcus aureus* e *Candida parapsilosis*, e as mais resistentes revelaram ser as espécies *E. coli* e *C. albicans*. Estes resultados ainda que preliminares permitem antever alguma atividade antimicrobiana, provavelmente devido aos flavonoides e *orto*-difenóis, que foram encontrados em maiores quantidades nesta variedade.

Palavras-chave: *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*, anatomia foliar, trocas gasosas, metabolitos primários e secundários, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

Abstract

In Portuguese ethnobotanics, several medicinal and aromatic plants (MAP) have been described by their antioxidant and antimicrobial properties. Epidemiological studies have shown that MAP are rich in thousands of biologically active substances, namely phenolic compounds. Most of these may have the potential to provide substantial health effects, particularly in the reduction of cardiovascular diseases incidence and some types of cancer. The study of the antimicrobial activity is also of extreme importance, since microorganisms have developed resistance to antibiotics, which can cause serious public health problems. Antibiotic resistance has been called one of the World's most burning public health problem affecting both current and future generations. The species *Salvia officinalis* contains many compounds of pharmacological interest, some of them already identified. Based on these evidences, this investigation aimed to make a morphoanatomical, physiological and chemical characterization of *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*. Therefore, we studied the composition of young and adult leaves over the growing seasons of 2011 and 2013 and relate to their use with potential pharmacological actions, such as its importance as antioxidant and antimicrobial activities. In this study we selected plants of *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* from the collection of medicinal and aromatic plants existing in the Botanical Garden of the University of Trás-os-Montes e Alto Douro.

It was found that this sage leaves feature have a typical anatomy of plants belonging to the division Magnoliophyta, class Magnoliopsida. Have a heterogeneous mesophyll, dorsiventral and reniform stomata with hypostomatic distribution. In both pages of leaves, arise glandular and nonglandular trichomes.

It was also concluded that in response to leaf ontogeny, the species *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* showed significant differences in the anatomy, physiology and biochemistry.

From the analysis of the results, it was found that the adult leaves of this species showed a greater leaf area, a greater total lamina thickness and more vascular tissues. These leaves had a lower stomatal conductance and transpiration rates, improving the intrinsic water use efficiency of water during the growing seasons. It was also observed a lower lipid peroxidation of cell membranes of mature leaves, which certainly contributed to reducing the electrolyte leakage.

On the other hand, the young leaves had a higher concentration of photosynthetic pigments and soluble cuticular waxes. Concerning the harvesting date, it was observed a

higher concentration of photosynthetic pigments and starch, as well as a lower concentration in soluble waxes and leaf succulence in September. However, we found a less leaf area and lower concentration of soluble sugars in September. As for the effect of the year, there was a greater concentration of photosynthetic pigments, starch and further leaf succulence in 2011, considered the warmest year since 1930. In short, variations in the studied parameters, either on the season or the same year of harvest, suggest a strong influence of climatic conditions.

About the phenolic compounds analysis, there was found a clear difference between dry and fresh leaves, being the latest characterized by a smaller amount of total phenols compared to dry ones. It was also found that samples of fresh leaves are more intrinsically similar, with respect to parameters under study (total phenols, *ortho*-diphenols and flavonoids), when compared with dry samples. The antioxidant activity was associated with the accumulation of numerous secondary and organic compounds, including *ortho*-diphenols and flavonoids. Although it is not possible to infer with precision the compounds which are responsible for the antioxidant activity, these compounds must be partly responsible for this activity.

The antimicrobial activity was tested using ethanolic and hydroethanolic extracts to evaluate its possible pharmacological uses. The extracts were tested on yeasts of species *Candida albicans* (ATCC90028), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) and *Candida oleophila* (isolated in UTAD) and 3 bacteria of the species *Escherichia coli* (0157H7607914), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Listeria monocytogenes* (ATCC 679). It has been found that the extract under study inhibited only modestly the tested species. The most susceptible species were the bacteria *Staphylococcus aureus* and the yeast *Candida parapsilosis*, and the most resistant were species of *E. coli* and *C. albicans*. These results, still preliminary, allows us to suppose some antimicrobial activity, probably due to flavonoids and *ortho*-dyphenols, found in high concentrations in this variety.

Keywords: *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*, leaf anatomy, gas exchange, primary and secondary metabolites, antioxidant activity, antimicrobial activity.

ÍNDICE

Agradecimentos	vii
Índice de Figuras	i
Índice de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas, Siglas ou Acrónimos	ix
Capítulo I. Introdução	1
I.1 Enquadramento Temático	3
I.2 Objetivos	4
I.3 Plantas Aromáticas e Medicinais	4
I.3.1 Resenha Histórica	4
I.3.2 Situação Portuguesa	9
I.3.3 Utilidade das Plantas Aromáticas e Medicinais	10
I.4 A Espécie <i>Salvia officinalis</i> L.	13
I.4.1 Classificação Taxonómica	13
I.4.2 Distribuição Geográfica	14
I.4.3 Descrição Botânica	16
I.4.3.1 Ontogenia	19
I.4.3.2 Estruturas Secretoras	20
I.4.4 Fisiologia	23
I.4.5 Condições de Cultivo	24
I.4.6 Usos Populares e Medicinais	25
I.5 Metabolitos Ativos	26
I.5.1 Compostos Fenólicos	29
I.5.1.1 Flavonoides	32
I.5.1.2 Não Flavonoides	33
I.5.2 Terpenoides	33
I.5.3 Alcaloides	34
I.6 Composição Química de <i>Salvia officinalis</i> L.	36

I.7	Atividade Antioxidante -----	37
I.8	Atividade Antimicrobiana -----	39
I.8.1	Focos de Infecções Mais Comuns -----	40
I.8.1.1	Infecções Hospitalares-----	40
I.8.1.2	Infecções Alimentares -----	42
I.8.2	Microrganismos em Estudo - Domínio Eubactéria -----	43
I.8.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i> -----	44
I.8.2.2	<i>Escherichia coli</i> -----	46
I.8.2.3	<i>Listeria monocytogenes</i> -----	47
I.8.3	Microrganismos em Estudo - Género <i>Candida</i> -----	49
I.8.3.1	<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout (1923) -----	51
I.8.3.2	<i>Candida parapsilosis</i> (Ashford) Langeron & Talice (1932) -----	52
I.8.3.3	<i>Candida oleophila</i> Montrocher (1967) -----	53
I.8.4	Desenvolvimento de Resistência a Antibióticos e Antifúngicos-----	54
I.8.5	Extratos de Plantas Usados como Medicamentos-----	57
I.8.6	Compostos com Atividade Antimicrobiana-----	58
Capítulo II.	Material e Métodos -----	59
II.1	Caracterização do Material Vegetal-----	61
II.2	Localização e Caracterização Climática-----	62
II.2.1	Localização -----	62
II.2.2	Caracterização Climática -----	63
II.2.3	Caracterização Edáfica-----	66
II.3	Amostragem -----	66
II.4	Metodologia dos Parâmetros Morfoanatômicos, Fisiológicos, Químicos e Bioquímicos -----	66
II.4.1	Determinação de Parâmetros Morfoanatômicos -----	66
II.4.2	Quantificação de Ceras Cuticulares Solúveis-----	67
II.4.3	Determinação de Parâmetros do Estado Hídrico e Esclerofilia -----	68
II.4.4	Determinação de Parâmetros Fisiológicos -----	68
II.4.4.1	Determinação da Fluorescência da Clorofila <i>a in vivo</i> -----	68
II.4.4.2	Determinação das Trocas Gasosas -----	69

II.4.5	Determinação dos Parâmetros Químicos e Bioquímicos -----	70
II.4.5.1	Determinação de Açúcares Solúveis e Amido-----	70
II.4.5.2	Determinação de Proteínas Solúveis-----	70
II.4.5.3	Determinação da Peroxidação Lipídica-----	70
II.4.5.4	Determinação da Perda de Eletrólitos -----	71
II.4.5.5	Quantificação de Pigmentos Fotossintéticos-----	71
II.4.5.5.1	Clorofilas-----	71
II.4.5.5.2	Carotenoides -----	72
II.4.5.5.3	Método não Invasivo para a Estimativa da Clorofila Total-----	72
II.4.5.6	Quantificação dos Teores em Compostos Fenólicos -----	73
II.4.5.6.1	Preparação dos Extratos -----	73
II.4.5.6.2	Determinação do Conteúdo dos Compostos Fenólicos -----	74
II.4.5.7	Determinação da Atividade Antioxidante-----	76
II.5	Parâmetros Microbiológicos -----	78
II.5.1	Material Vegetal / Preparação do Extrato-----	78
II.5.2	Protocolos Padrão do NCCLS -----	79
II.5.2.1	Inibição do Crescimento - Medição Halo de Inibição-----	79
II.5.2.2	Inibição do Crescimento - Microdiluição em Caldo-----	79
II.5.3	Métodos de Avaliação da Atividade Microbicida-----	80
II.5.3.1	Preparação dos Meios de Cultura -----	80
II.5.3.1.1	Sabouraud Dextrose Agar -----	80
II.5.3.1.2	Yeast Malt Agar-----	80
II.5.3.1.3	Meio de Mueller Hinton II (MHII) -----	81
II.5.3.1.4	Meio de Mueller Hinton II com Fluconazole (MHIIF)-----	81
II.5.3.1.5	Nutrient Agar -----	81
II.5.3.1.6	Oxford Agar (<i>Listeria</i> Selective Agar, Oxford) -----	81
II.5.3.2	Material Microbiano e Preparação do Inóculo -----	82
II.5.3.2.1	Inoculação das Placas de <i>Mueller Hinton II</i> -----	82
II.5.3.2.2	Preparação/Aplicação dos Discos de Difusão-----	83
II.6	Análise Estatística -----	83
Capítulo III.	Resultados e Discussão -----	85
III.1	Parâmetros Morfoanatômicos-----	87
III.2	Parâmetros do Estado Hídrico e Esclerofilia -----	99

III.3	Parâmetros Fisiológicos -----	103
III.3.1	Trocas Gasosas -----	103
III.3.2	Fluorescência da Clorofila a <i>in vivo</i> -----	106
III.4	Parâmetros Bioquímicos -----	109
III.4.1	Pigmentos Fotossintéticos -----	109
III.4.2	Metabolitos -----	115
III.5	Análise de Componentes Principais (PCA) -----	129
III.6	Estudos da Atividade Antimicrobiana -----	133
Capítulo IV.	Conclusão e Perspetivas Futuras -----	145
Capítulo V.	Referências Bibliográficas -----	151
Anexo	-----	173

Índice de Figuras

Figura 1 - Gravura de Pedro Hispano, Papa João XXI, com o brasão de armas.....	7
Figura 2 - Centros de diversidade do género <i>Salvia</i> . Em cada área encontra-se o número referente às espécies existentes em cada região	15
Figura 3 - Distribuição mundial da <i>Salvia officinalis</i> L.	16
Figura 4 - <i>Salvia officinalis</i> L.....	17
Figura 5 - (A) Tricoma peltado (×800); Tricomas glandulares capitados (B, C, D, E): (B) Tipo I (×150), (C) Tipo II (×600), (D) Tipo III (SEM, ×1700), (E) Tipo IV (SEM ×700); (F) Tricomas peltados na página adaxial da folha e tricomas não glandulares (SEM ×6) de <i>Salvia officinalis</i>	21
Figura 6 - Elementos básicos do metabolismo primário relacionado com o metabolismo secundário das plantas	28
Figura 7 - Via de síntese dos compostos fenólicos	31
Figura 8 - Estrutura base dos flavonoides	32
Figura 9 - Estrutura do isopreno.....	34
Figura 10 - Estrutura química alcaloide: (A) Alcaloide verdadeiro (cafeína); (B) Protoalcaloide (colchicina); (C) Pseudoalcaloide (coniina)	35
Figura 11 - Estrutura química dos compostos fenólicos em <i>S. officinalis</i> L.: (A) Ácido Rosmarínico. (B) luteolina-7- <i>O</i> -glucósido.....	36
Figura 12 - <i>Staphylococcus aureus</i>	45
Figura 13 - <i>Escherichia coli</i>	47
Figura 14 - <i>Listeria monocytogenes</i>	48
Figura 15 - (A) Crescimento de leveduras da espécie <i>Candida albicans</i> em agar Sabourad dextrose. (B) Biofilme de <i>Candida albicans</i> formada <i>in vitro</i> observado em microscopia eletrónica de varrimento (MEV).....	52
Figura 16 - <i>Candida parapsilosis</i> : (A) colónias macroscópicas em meio Cornmeal Tween 80. (B) estrutura microscópica em SDA (Sabouraud Dextrose Agar)	53
Figura 17 - Espécie <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> localizada na coleção de plantas aromáticas e medicinais do Jardim Botânico da UTAD, com especial detalhe de coloração das folhas jovens e adultas	61
Figura 18 - Distrito de Vila Real.....	62

Figura 19 - Normais Climatológicas de temperatura e precipitação para Vila Real (1971/2000).....	63
Figura 20 - Totais pluviométricos (Precip), temperatura média das médias (T. méd), média das mínimas (T. min), média das máximas (T. max) mensais (A); Radiação Solar Total (B) para Vila Real, registados no ano 2011 (dados meteorológicos obtidos pela estação meteorológica automática do Campus da UTAD).....	64
Figura 21 - Totais pluviométricos (Precip), temperatura média das médias (T. méd), média das mínimas (T. min), média das máximas (T. max) mensais (A); Radiação Solar Total (B) para Vila Real, registados no ano 2012 (dados meteorológicos obtidos pela estação meteorológica automática do Campus da UTAD).....	65
Figura 22 - Totais pluviométricos (Precip), temperatura média das médias (T. méd), média das mínima (T. min), média das máximas (T .max) mensais (A); Radiação Solar Total (B) para Vila Real medidos no ano 2013 (dados meteorológicos medidos por estação meteorológica automática no Campus da UTAD)	65
Figura 23 - Estrutura do ácido (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-cromonil) fórmico (“Trolox”).....	76
Figura 24 - Princípio do método de Determinação da Capacidade Antioxidante com ABTS.....	76
Figura 25 - Cortes transversais em fresco de <i>S. officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> de uma folha adulta (A); folha jovem (B).....	87
Figura 26 - Cortes transversais de <i>S. officinalis</i> L. var. <i>purpurescens</i> em fresco de uma folha jovem evidenciando a lâmina ondulada e os numerosos tricomas (A); em fresco de uma folha adulta evidenciando o parênquima clorofilino em paliçada e o parênquima clorofilino lacunoso (B); Preparação definitiva da lâmina de uma folha adulta (C); Preparação definitiva da lâmina de uma folha jovem (D)	88
Figura 27 - Estomas reniformes de <i>S. officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> visto por MEV em folhas adultas (A); assim como em cortes em fresco (B); cortes definitivos (C) e de folhas jovens (D)	89
Figura 28 - Detalhe de um tricoma pluricelular (A); tricoma unicelular (B); tricoma capitado glandular com cabeça bicelular (C); tricoma capitado glandular com cabeça unicelular (D); localizados em cortes definitivos de folhas jovens de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i>	91
Figura 29 - Glândula (A); tricoma capitado glandular com cabeça unicelular (x), tricoma capitado não glandular pluricelular (y) (B, D) presente na página inferior de uma folha adulta; tricomas pluricelulares presentes na página superior de uma folha jovem de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> em MEV (C).....	91
Figura 30 - Concentração de ceras cuticulares solúveis de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo dos ciclos vegetativos 2011/2013. Colheita de 2011 (A); Colheita de 2013 (B); Colheita de 2011 e 2013 (C).....	98

Figura 31 - Correlação entre g_s ($\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$) e C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo dos anos em estudo	105
Figura 32 - Correlação entre C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) e g_s ($\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$) e A/g_s de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo dos anos em estudo	105
Figura 33 - Correlação entre E ($\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$) e F_v/F_m de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo dos anos em estudo	109
Figura 34 - (A) Correlação entre a concentração de Clorofila <i>a</i> (Cl_a) e Carotenoides totais; (B) Clorofila <i>b</i> e Carotenoides totais; (C) Clorofila Total e Carotenoides Totais de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i>	113
Figura 35 - Correlação entre a concentração de Carotenoides e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i>	114
Figura 36 - Correlação entre E ($\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$) e Clorofila Total (mg g^{-1}) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo dos anos em estudo	114
Figura 37 - Valores médios da perda de eletrólitos de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ciclo vegetativo, Colheita de 2011 (A), Colheita de 2013 (B) e 2011/2013 (C)	117
Figura 38 - (A) Correlação entre a composição fenólica e atividade antioxidante; (B) Correlação entre a composição de <i>orto</i> -difenois e atividade antioxidante; (C) Correlação entre a composição em flavonoides e atividade antioxidante de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo dos anos em estudo	129
Figura 39 - Análise de componentes principais usando o perfil em fenóis totais, flavonoides e <i>orto</i> -difenois assim como a atividade antioxidante de (A) amostras dos dois anos; (B) amostras de 2011; (C) amostras de 2013 de folhas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo dos anos em estudo	131
Figura 40 - Dendograma obtido através de análise de “Clusters”, recorrendo às quantificações de fenóis totais presentes em todas as amostras do extrato de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i>	132
Figura 41 - Crescimento de leveduras da espécie: (I) <i>Candida parapsilosis</i> ; (II) <i>Candida oleophila</i> ; (III) <i>Candida albicans</i> em agar Sabourad dextrose e discos embebidos em extratos de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i>	136
Figura 42 - Crescimento de leveduras das espécies <i>Candida albicans</i> (I) e <i>Candida parapsilosis</i> , (II) em agar Sabourad dextrose com fluconazole; <i>Candida albicans</i> (III) e <i>Candida parapsilosis</i> , (IV) em agar Sabourad dextrose sem fluconazole e discos embebidos em extratos de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i>	137

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação dos terpenos	34
Tabela 2 - Organização dos extratos de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo dos ciclos vegetativos de 2011/2013	73
Tabela 3 - Espessura dos diferentes tecidos (epiderme e cutícula superior - ES CS, parênquima clorofilino em paliçada - PCE, parênquima clorofilino lacunoso - PCL, epiderme e cutícula inferior - EI CI, lâmina total - LT, mesófilo e PCE/PCL) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ciclo vegetativo de 2011	93
Tabela 4 - Espessura dos diferentes tecidos (epiderme e cutícula superior - ES CS, parênquima clorofilino em paliçada - PCE, parênquima clorofilino lacunoso - PCL, epiderme e cutícula inferior - EI CI, lâmina total - LT, mesófilo e PCE/PCL) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ciclo vegetativo de 2013	93
Tabela 5 - Espessura dos diferentes tecidos (epiderme e cutícula superior - ES CS, parênquima clorofilino em paliçada - PCE, parênquima clorofilino lacunoso - PCL, epiderme e cutícula inferior - EI CI, lâmina total - LT, mesófilo e PCE/PCL) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo dos ciclos vegetativos de 2011/2013	95
Tabela 6 - Espessura do xilema (EX), espessura do floema (EF), largura da nervura principal (LN), área dos vasos xilêmicos (AVX) e perímetro dos vasos xilêmicos (PVX) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ciclo vegetativo de 2013.....	96
Tabela 7 - Área foliar (AF), área foliar específica (SLA), densidade do tecido foliar, conteúdo relativo de água (RWC) e suculência (S) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ano de 2011	100
Tabela 8 - Área foliar (AF), área foliar específica (SLA), densidade do tecido foliar, conteúdo relativo de água (RWC) e suculência (S) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ano de 2013	101
Tabela 9 - Área foliar (AF), área foliar específica (SLA), densidade do tecido foliar, conteúdo relativo de água (RWC), suculência (S), de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo dos anos de 2011/2013.....	102
Tabela 10 - Trocas gasosas - taxa de assimilação líquida de CO ₂ (A), condutância estomática para o vapor de água (g _s), concentração intercelular de CO ₂ (C _i), eficiência intrínseca do uso de água (A/g _s) e taxa de transpiração (E) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ano de 2011...	104

Tabela 11 - Rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}); Coeficientes de extinção fotoquímico (qP) e não-fotoquímico (qNP); Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m); de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ano de 2011.....	108
Tabela 12 - Concentração de pigmentos fotossintéticos (Clorofila <i>a</i> - Cl_a , Clorofila <i>b</i> - Cl_b , Clorofila total - Cl_{tot} , $Cl_{a/b}$, Carotenoides Totais - Car_{tot} , Cl_{tot}/Car_{tot}) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ciclo vegetativo de 2011	111
Tabela 13 - Concentração de pigmentos fotossintéticos (Clorofila <i>a</i> - Cl_a , Clorofila <i>b</i> - Cl_b , Clorofila total - Cl_{tot} , $Cl_{a/b}$, Carotenoides Totais - Car_{tot} , Cl_{tot}/Car_{tot}) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ciclo vegetativo de 2013	111
Tabela 14 - Concentração de pigmentos fotossintéticos (Clorofila <i>a</i> - Cl_a , Clorofila <i>b</i> - Cl_b , Clorofila total - Cl_{tot} , $Cl_{a/b}$, Carotenoides Totais - Car_{tot} , Cl_{tot}/Car_{tot}) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ciclo vegetativo de 2011 e 2013.....	112
Tabela 16 - Concentração de proteínas solúveis (PS) e peroxidação lipídica (PL) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ciclo vegetativo de 2013	116
Tabela 17 - Concentração de proteínas solúveis (PS) e peroxidação lipídica (PL) de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo de dois ciclo vegetativos (2011/2013)	116
Tabela 18 - Concentração de açúcares solúveis (AS), amido (AM), hidratos de carbono não estruturais (HNE) e razão AS/AM de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ciclo vegetativo de 2011	119
Tabela 19 - Concentração de açúcares solúveis (AS), amido (AM), hidratos de carbono não estruturais (HNE) e razão AS/AM de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo do ciclo vegetativo de 2013	119
Tabela 20 - Concentração de açúcares solúveis (AS), amido (AM), hidratos de carbono não estruturais (HNE) e razão AS/AM de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo dos ciclos vegetativos de 2011/2013.....	120
Tabela 21 - Atividade antioxidante, <i>orto</i> -difenóis, flavonoides, fenóis totais de folhas jovens (frescas e secas) e adultas (frescas e secas) de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i> ao longo dos ciclos vegetativos de 2011/2013	122
Tabela 22 - Pesos das distintas variáveis para a ponderação dos componentes principais PC1 e PC2 de folhas jovens e adultas de <i>Salvia officinalis</i> L. var. <i>purpurascens</i>	129

Tabela 23 - Resultados da inibição no crescimento das leveduras: *Candida parapsilosis*, *Candida oleophila*, *Candida albicans* e das bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Candida oleophila*, *Listeria monocytogenes*, na presença dos EHE (Extratos hidroalcoólicos) de folhas jovens frescas e secas e de folhas adultas frescas e secas ambas de junho e setembro de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* em meio MHII (Meio de Mueller Hinton II) e MHFII (Meio de Mueller Hinton II com fluconazole)..... 135

Tabela 24 - Resultados da inibição no crescimento das leveduras: *Candida parapsilosis*, *Candida oleophila*, *Candida albicans* e das bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Candida oleophila*, *Listeria monocytogenes*, na presença dos EE (Extratos alcoólicos) de folhas jovens frescas e secas e de folhas adultas frescas e secas ambas de junho e setembro de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* em meio MHII (Meio de Mueller Hinton II) e MHFII (Meio de Mueller Hinton II com fluconazole)..... 135

Lista de Abreviaturas, Siglas ou Acrónimos

A/g_s	-----	eficiência intrínseca do uso de água
A	-----	taxa de assimilação líquida de CO ₂
ABTS	-----	2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) sal diamónio
Abs	-----	absorvância
AF	-----	área foliar
ATCC	-----	American Type Culture Collection
C_i	-----	concentração intercelular de CO ₂
Cl_{a/b}	-----	razão entre o teor de clorofila <i>a</i> e o teor de clorofila <i>b</i>
Cl_a	-----	clorofila <i>a</i>
Cl_b	-----	clorofila <i>b</i>
DMSO	-----	dimetilsulfóxido
DP	-----	desvio padrão
E	-----	taxa de transpiração
EDTA	-----	etilenodiaminotetracético
EE	-----	extrato etanólico
EHE	-----	extrato hidro-etanólico
ETR	-----	taxa de transporte de eletrões
F_m	-----	fluorescência máxima
F_o	-----	fluorescência mínima
F_s	-----	fluorescência de equilíbrio
F_v/F_m	-----	eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II
F_v	-----	diferença entre a fluorescência máxima e a fluorescência mínima
GAE	-----	equivalentes de ácido gálico
g_s	-----	condutância estomática para o vapor de água
HIM	-----	halo de inibição médio
IRGA	-----	analisador de gás por radiação infravermelha
ITS	-----	Internal Transcribed Spacer
LMA	-----	massa por unidade de área de superfície foliar
MH	-----	Muller Hintton
MHFII	-----	meio de Mueller Hinton II suplementado com fluconazole
MHII	-----	meio de Mueller Hinton II

NCCLS	-----	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NPQ	-----	coeficiente de extinção não fotoquímico
PAM	-----	plantas aromáticas e medicinais
PCA	-----	análise de componentes principais
PCE	-----	parênquima clorofilino em paliçada
PCL	-----	parênquima clorofilino lacunoso
PSI	-----	fotossistema I
PSII	-----	fotossistema II
qP	-----	coeficiente de extinção fotoquímico
ROS	-----	espécie reativa de oxigénio
RWC	-----	conteúdo relativo de água
SLA	-----	área foliar específica
UTAD	-----	Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
UV	-----	radiação ultravioleta
YMA	-----	Yeast Agar Malte (extrato de levedura e malte agarizado)
λ	-----	comprimento de onda
Φ_{PSII}	-----	rendimento quântico efetivo

Capítulo I. Introdução

I.1 Enquadramento Temático

A frase "*Let food be thy medicine and medicine be thy food*" é antiga e reflete os princípios de Hipócrates, uma das figuras mais importante e primordial da saúde, considerado o pai da medicina. De acordo com Hipócrates, os alimentos tinham um papel muito importante na prevenção e no tratamento das doenças.

As plantas aromáticas e medicinais (PAM) apesar de apurarem e realçarem o sabor dos cozinhados, possuem propriedades e nutrientes indispensáveis ao organismo, são a fonte de muitas substâncias químicas essenciais ao tratamento de muitos distúrbios físicos.

Muito do que sabemos sobre o valor medicinal das plantas provém da sabedoria tradicional, transmitida ao longo das gerações. Vários desses “medicamentos” estão disponíveis comercialmente há mais de um século.

Nos últimos anos, os estudos sobre as PAM têm-se multiplicado rapidamente entre a comunidade científica. A sua aplicação em praticamente todas as áreas da saúde tem gerado publicações específicas e bastante direcionadas.

É possível extrair componentes químicos de todas as partes das plantas, incluindo folhas, caules, flores, frutos, sementes e raízes. Uma boa parte dos medicamentos atualmente disponíveis têm origem vegetal, o que leva a uma procura cada vez mais intensa de novos princípios ativos nas espécies vegetais. Em concreto as PAM oferecem uma série de novas possibilidades. Alguns princípios ativos estão sujeitos a novas aplicações, enquanto outras plantas começam agora a revelar o seu potencial médico. A sua utilização tem vindo a aumentar nos últimos anos, devido à valorização do seu valor nutritivo, pelo seu reduzido valor calórico e pelos seus efeitos benéficos na prevenção de doenças e no bem-estar e saúde. Estudos recentes relacionam a utilização destas plantas com a redução do risco do desenvolvimento de algumas doenças crónico-degenerativas.

A salva rubra, *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* da família Lamiaceae, e plantas semelhantes, contém muitos compostos de interesse farmacológico. É utilizada frequentemente como infusão ou condimento.

O facto de existirem bastantes trabalhos de caracterização e estudos antimicrobianos relativos às espécies de *Salvia officinalis*, planta aromática e medicinal, os quais indicam o seu interesse farmacológico e o pouco estudo existente desta variedade de *Salvia*, foi o que largamente nos motivou para proceder ao seu estudo mais exaustivo.

I.2 Objetivos

Conhecer e caracterizar os parâmetros foliares morfoanatômicos, fisiológicos e químicos das folhas jovens (coloração púrpura) e adultas (coloração cinza-esverdeada) ao longo do seu ciclo vegetativo; efetuar um estudo comparativo entre diferentes parâmetros foliares, assim como avaliar a sua capacidade antimicrobiana em espécies bacterianas e fúngicas bastante frequentes, tanto no ambiente hospitalar como ambiental, viriam a constituir-se como os objetivos deste trabalho de investigação. Assim, agronomicamente este estudo vem abrir a possibilidade de rentabilizar regiões do território nacional não suscetíveis de serem aproveitadas para outro tipo de culturas, uma vez que esta variedade pode ser produzida em solos marginais sem grandes custos.

I.3 Plantas Aromáticas e Medicinais

I.3.1 Resenha Histórica

A estreita ligação Homem-Planta é já bastante antiga. Desde tempos muito remotos que o Homem aprendeu a utilizar as plantas para seu proveito (Joaquim, 2007; Rodrigues, 2007; Kaefer *et al.*, 2008; Abranche, 2010; Pereira-Müller, 2012). A utilização de plantas inicia-se com o seu aparecimento que, logo criou um contacto direto com a natureza, desenvolvendo por imitação dos costumes dos outros animais e com a experiência acumulada de ingestões acidentais ou voluntárias de algumas espécies vegetais a sua aplicação no seu quotidiano (Suarez, 2007; Bueno, 2008), armazenando assim, um vasto conhecimento acerca de como usar muitas e variadas plantas (Rodrigues, 2007).

Os povos primitivos estavam familiarizados com as plantas do lugar onde viviam, conheciam as suas propriedades medicinais, a sua toxicidade, utilizavam-nas frequentemente nos ritos mitológicos, indumentárias e serviam muitas vezes como reforço de palavras mágicas, tão usadas na época (Suarez, 2007). Queimavam plantas de odor agradável para pedir proteção aos Deuses, constituindo, as de perfume desagradável, um meio de afugentar os animais, os inimigos ou mesmo para afastar os Deuses maléficos. Aos aromas, sempre foi associada a ideia de purificação. As plantas aromáticas empregues como oferendas, sempre serviram para relacionar o homem com os Deuses, particularmente em momentos difíceis e perigosos, como o nascimento, uma viagem, uma guerra ou até mesmo na morte (Proença da Cunha *et al.*, 2011).

A medicina tradicional chinesa e asiática data a flora medicinal de 10000 anos a.C.. Entre os textos escritos mais antigos conhecidos, *Pen Ts'ao* "a Grande Fitoterapia" do chinês Shen Nung, a qual remonta a 2800 a.C. (Suarez, 2007; Czelusniak *et al.*, 2012; Pereira-Müller, 2012), é a mais importante, discorre sobre o poder curativo das ervas, descrevendo mais de 250 plantas quanto ao sabor, funções, benefícios e precauções, além de uma lista de mais de 150 doenças. Há quem lhe atribua a descoberta do chá (Pereira-Müller, 2012).

O registo mais antigo que se conhece sobre a sua utilização, foi encontrado num túmulo do Neolítico (entre 5000 e 2500 anos a.C.) no qual se encontraram vestígios de um homem envolvido em plantas aromáticas, identificadas por restos de grãos de pólen (Proença da Cunha *et al.*, 2011).

No mundo ocidental conhecem-se herbários desde a época dos Assírios, Babilónios, Fenícios e Sumérios (Suarez, 2007; Abranche, 2010). No antigo Egito faraónico a Mitologia estava presente nas relações homem, doença e tratamentos. *Thot* era considerado como o Deus fundador da Medicina, tendo-a ensinado aos sacerdotes (Proença da Cunha *et al.*, 2011). A Deusa *Isis* seria, para além de protetora das mulheres e das crianças, também da cultura das plantas medicinais e aromáticas e das leis da vida e da saúde (Suarez, 2007; Proença da Cunha *et al.*, 2011).

Num documento escrito, o famoso papiro decifrado em 1873 pelo egiptólogo alemão Georg Ebers (1700 a.C.), existe a seguinte afirmação introdutória: "Aqui começa o livro relativo à preparação dos remédios para todas as partes do corpo humano". Provou-se que o papiro de Ebers representa o primeiro tratado médico egípcio conhecido, da primeira metade do século XVI antes da era cristã, em que parte do seu texto é destinado ao tratamento das doenças internas e, a restante, dá indicações sobre a constituição dos medicamentos a empregar, muitos dos quais são plantas aromáticas (Bueno, 2008; Proença da Cunha *et al.*, 2011). Este famoso papiro cita aproximadamente 700 plantas com fins medicinais, entre elas o alho, que se dava aos escravos que construía as pirâmides, de modo a preservá-los das enfermidades (Suarez, 2007).

Na medicina grega e romana, Hipócrates (460-377 a.C.), Teofrasto (372-287 a.C.), Dioscórides e *Plinio "el Viejo"* (século 1 d.C.), Claudio Galeno (131-200 d.C.) ocuparam-se do estudo das plantas medicinais e da sua aplicação (Suarez, 2007).

Os Romanos beneficiaram muito dos conhecimentos gregos quanto à aplicação dos perfumes e dos óleos aromatizados que normalmente eram aplicados após o banho. Acreditavam nas virtudes dos banhos aromatizados com plantas, que usavam para restaurar o

vigor sexual e diminuir os efeitos do vinho tomado em excesso (Proença da Cunha *et al.*, 2011).

Plínio, "el Viejo", ou *Gaius Plinius Secundus*, único autor do Império Romano, escreveu a "*Naturalis Historia*" um vasto compêndio das ciências antigas composta por 37 volumes, dos quais oito são dedicados às plantas (Bueno, 2008; Pereira-Müller, 2012).

Os Árabes interessaram-se muito pela química, tendo desenvolvido, muito especialmente, a destilação das plantas aromáticas. Ainda há poucos anos em Portugal se usava o alambique em cobre, de origem árabe, na destilação dos mostos vinícolas (Proença da Cunha *et al.*, 2011).

Os Gregos utilizavam as ervas, conhecidas pelas suas propriedades aromáticas, e constituíam a base do tratamento médico (Pereira-Müller, 2012). A partir do pensamento hipocrático, que estabelecia relação entre ambiente e estilo de vida das pessoas, os processos de cura deixaram de ser vistos apenas do ponto de vista espiritual e místico. Atribuída como um fenómeno natural, a origem das doenças passou então a ser estudada de um modo mais cuidado. Hipócrates considerado o "Pai da Medicina" reuniu na sua obra "*Corpus Hippocratum*" a síntese dos conhecimentos médicos do seu tempo, indicando para cada enfermidade o remédio vegetal e o tratamento adequado (Joaquim, 2007; Abranche, 2010).

Galeno, a quem se ficou a dever algumas das formas farmacêuticas precursoras das que ainda hoje são usadas (Joaquim, 2007), e Teofrasto um dos primeiros a dedicar-se exclusivamente ao mundo vegetal, que com a sua obra "*De Historia Plantarum e De Causis Plantarum*", deixa descrições botânicas muito precisas, acompanhadas de indicações sobre os efeitos tóxicos e as propriedades curativas que foram importantes para a terapêutica (Bueno, 2008). Contudo, quem posteriormente se destaca no campo das PAM é Pedanius Dioscórides que, recolhe abundante informação sobre plantas das regiões do norte de África, ao acompanhar os exércitos romanos. Escreve o tratado "*De Materia Medica*" que representa um marco histórico no conhecimento de numerosos fármacos, muitos dos quais ainda usados. Nele, se descrevem cerca de 600 produtos de origem vegetal, animal e mineral, com indicações sobre o seu uso médico (Bueno, 2008; Proença da Cunha *et al.*, 2011).

Já na Idade Média (século V ao XV), a medicina e os estudos das plantas medicinais estagnaram por um longo período. O interesse pelo mundo material diminuiu, passando o homem a ser visto como o centro do Universo, em contraposição ao divino e sobrenatural. Muitos escritos gregos foram esquecidos ou mesmo perdidos (Abranche, 2010). Neste

período, no mundo árabe, destaca-se Avicena ao escrever o “*Cânon*”, como o maior impulsionador da medicina da natureza e das plantas (Suarez, 2007).

De destacar o ensino de medicina feito no Mosteiro de Santa Cruz em Coimbra. Nele forma-se S. Frei Gil de Santarém (1115 ou 1187-1265) a quem se atribui um receituário que inclui muitas plantas aromáticas (arruda, funcho, losna, etc.). Pelo Mosteiro passa Pedro Julião (1205-1277) que depois estuda em Paris onde é conhecido por Pedro Hispano, médico notável (Figura 1) que ascendeu ao papado com o nome de João XXI. A ele se atribui a obra “*Thesaurus Pauperum*” onde são referidas muitas plantas aromáticas orientais tais como, o cálamo-aromático, o cravinho, o gengibre, a canela, a noz-moscada, o sândalo, a zedoária, entre outras (Proença da Cunha *et al.*, 2011).



Figura 1 - Gravura de Pedro Hispano, Papa João XXI, com o brasão de armas (Fonte: Cardoso *et al.*, 2009)

Com o Renascimento, a botânica deu um grande salto, as plantas voltaram a ser catalogadas e deu-se lugar à experimentação (Pereira-Müller, 2012).

Nesta época quem destacadamente se notabilizou foi Garcia de Orta (Joaquim, 2007), natural de Castelo de Vide, médico pessoal de D. João II, que se estabeleceu como médico em Goa, onde editou em 1563, a sua obra mais importante, os “*Coloquios dos simples e drogas he cousas medicinais da Índia, e assi dalguas frutas achadas nella onde se tratam algumas cousas tocantes a medicina, pratica, e outras cousas boas, pera saber*”. Livro que aborda um grande número de “drogas” orientais de origem vegetal, apresentando a primeira descrição rigorosa, feita por um europeu, das características botânicas (tamanho e forma da planta), a origem e as propriedades terapêuticas de muitas plantas medicinais (Pereira-Müller, 2012).

A divulgação dos “Colóquios” de Garcia de Orta acaba por ser feita pelo notável botânico francês Charles de l’Écluse, também conhecido por Clúsio, que numa versão mais resumida, em latim, torna aquela obra acessível a toda a Europa culta dessa época.

Posteriormente em 1581, quando se encontrava em Inglaterra, Clúcio conhece o “*Tractado de las Drogas y Medicinas de las Índias Orientales*”, publicado pelo português Cristóvão da Costa e que ele, igualmente, acaba por traduzir para latim e publicar, pela primeira vez, em 1582 (Proença da Cunha *et al.*, 2011).

Da era dos boticários passou-se à era dos farmacêuticos de síntese, época essa que durou até ao início do século XIX (Joaquim, 2007).

Se por um lado o conhecimento sobre as plantas e as suas virtudes levaram à sua investigação científica e, por conseguinte, permitiram o avanço da Medicina, por outro lado foi no seio das comunidades rurais e dos povos indígenas que se estabeleceu a mais íntima relação Homem-Planta, relação esta muitas vezes fulcral para o desenvolvimento das populações e para a sobrevivência individual (Rodrigues, 2007; Pereira-Müller, 2012).

Com o passar dos anos as plantas aromáticas passaram a fazer parte de técnicas de prevenção e de tratamento das doenças, principalmente de feridas e contusões, como mostram documentos chineses e indianos com mais de 5000 anos (Proença da Cunha *et al.*, 2011).

Conhecida desde a Antiguidade, a planta de nome comum salva, era considerada pelos nossos antepassados como uma planta quase milagrosa, capaz de curar todas as doenças (Grieve, 1995; Clebsch, 2003; Roldán, 2004; Vienna *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2007; Bueno, 2008; Bouaziz *et al.*, 2009; Ben Taarit *et al.*, 2010). Pliny o Elder, cientista e historiador romano, foi o primeiro a usar o termo latino *Salvia*. O nome deriva de *salvare*, curar, e *salvus*, ileso ou íntegro (Grieve, 1995; Baricevic *et al.*, 2000; Clebsch, 2003; Vienna *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2007) e “*officinalis*” expressa o seu uso médico (Ben Hamed *et al.*, 2006).

Os antigos gregos cultivavam a salva como planta medicinal e os Druidas usavam-na para curar febres, tosse, bronquite e reumatismo. Na Europa, o cultivo da salva teve início na Idade Média, quando os monges beneditinos introduziram esta espécie nos jardins dos seus mosteiros (Lamendin *et al.*, 2004). É uma planta de grande reputação para a expulsão do mal. É eficaz após a mordida de uma serpente e excelente a dissipar os espíritos malignos. Foi muito utilizada no antigo Egito para aumentar a fertilidade de mulheres (Lamendin *et al.*, 2004; Bueno, 2008).

A crença nos seus poderes curativos era tão grande que deu origem a um ditado provençal segundo o qual “*Qu’ a de sauvin din soun jardin, a pas besoun de medicin*”: “Quem tem salva no seu jardim, não precisa de medicina/médicos/medicamentos” (Lamendin

et al., 2004) e até o rei Luís XIV bebia todas as manhãs duas taças de infusão de salva (Lamendin *et al.*, 2004).

Mesmo na idade média tinha uma alta reputação: *Cur moriatur homo cui Salvia crescit in horto?* (Porque tem que morrer um homem quando a salva cresce num jardim?) o qual tem um provérbio correspondente em Inglaterra: “He that would live for ever, must eat Sage in May” (Grieve, 1995).

Esta planta medicinal é mencionada muitas vezes como *Salvia salvatrix* (salva, a salvadora). Acreditava-se que definhava ou prosperava, em função do progresso dos negócios do seu proprietário, tal como as regras da mulher, variavam em função do vigor da planta (Grieve, 1995).

Em Jura, distrito Francês, a salva servia de mitigação da dor corporal e mental.

Um dos mais importantes e maior conjunto de espécies de *Salvia* do mundo encontra-se no Reino Unido. Sr. Robin Middleton construiu um jardim pessoal há cerca de 15 anos atrás onde reuniu mais de 100 espécies e cultivares (Karaback *et al.*, 2009).

I.3.2 Situação Portuguesa

O setor produtivo de PAM em Portugal é, atualmente, minoritário, embora a sua produção tenha vindo a crescer nestes últimos anos. Segundo este estudo, em apenas oito anos, a área cultivada em modo de produção biológico quintuplicou, representando em 2011 mais de mil e trezentos hectares (GPP, 2013). A Flora Portuguesa é, neste contexto, particularmente importante pela sua riqueza em espécies aromáticas e medicinais (Figueiredo *et al.*, 2007; GPP, 2013). Na realidade, das cerca de 3800 espécies identificadas, que compõem a cobertura vegetal do Continente, Açores e Madeira, cerca de 500 foram já classificadas como aromáticas e/ou medicinais, podendo, parte delas, constituir uma alternativa para sistemas agrícolas sustentáveis ou para a rentabilização de terrenos marginais para a agricultura. Estas espécies distribuem-se maioritariamente pelas famílias Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Mirtaceae, Oleaceae, Liliaceae, Rosaceae, Rutaceae, Hipercaceae, Pinaceae, Cupressaceae, Lauraceae e Malvaceae. Acresce que algumas destas espécies constituem endemismos, por vezes com nichos ecológicos muito vulneráveis. A conservação desta diversidade biológica, atualmente indissociável da sua utilização sustentável, contribuiria para a fixação das populações no seu "habitat" tradicional, única forma de sustentar a tendência atual de agravamento de um dos fenómenos mais preocupantes que afetam o território nacional continental, a desertificação (Figueiredo *et al.*, 2007; Barata *et al.*, 2011).

Em Portugal existe ainda um vasto manancial de conhecimentos acerca dos usos populares e tradicionais das plantas. No entanto, a utilização das plantas em remédios caseiros é uma prática que vai diminuindo de intensidade e importância, mesmo nas comunidades rurais. A facilidade com que hoje em dia se tem assistência médica e o progressivo afastamento do modo de vida rural pela maioria da população leva a que as pessoas, e principalmente os mais jovens, não sintam necessidade, interesse e incentivo para aprender os saberes ancestrais dos usos dos recursos vegetais, ficando quase exclusivamente nos mais velhos. Deste modo, estes saberes tradicionais, que são parte integrante do património cultural de um povo, tendem a desaparecer com o tempo ou mesmo a extinguir-se a médio prazo caso nada se faça para o impedir (Rodrigues, 2007; GPP, 2013).

O reconhecimento de espécies potencialmente utilizáveis pelos produtores pode contribuir para uma gestão mais equilibrada do espaço rural, incentivando a conservação e manutenção do património agro e silvo-ambiental em particular no que respeita à proteção de recursos hídricos, à limitação de fenómenos de erosão e à salvaguarda da biodiversidade (Schippmann *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 2007; GPP, 2013).

I.3.3 Utilidade das Plantas Aromáticas e Medicinais

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

Embora durante muito tempo, estas plantas tenham sido preteridas face à aceitação do uso de produtos sintéticos, atualmente, as especulações em torno dos perigos que estes possam oferecer à saúde humana e ao ambiente, têm estado na origem de certa reabilitação da credibilidade dos medicamentos de base natural, designadamente de plantas. Mais de três quartos da população mundial utilizam plantas ou extratos vegetais em cuidados da saúde. Cerca de 30% das espécies das plantas identificadas foram, em algum momento, utilizadas para fins medicinais (Joy *et al.*, 1998; Joy *et al.*, 2001).

Na Europa ocidental, o uso de medicamentos à base de plantas ainda é encarado com algum ceticismo e muitas vezes associado a fins pouco ortodoxos (Joy *et al.*, 1998; Joy *et al.*, 2001).

Das 250 mil espécies de plantas superiores existentes na Terra, mais de 80 mil apresentam características medicinais e, destas, até agora, apenas uma pequena percentagem

foi investigada do ponto de vista fitoquímico e, menos ainda, quanto à sua atividade biológica e farmacológica. Embora a medicina tradicional esteja difundida por todo o mundo, sendo parte integrante da cultura de cada povo, infelizmente muito do conhecimento antigo e muitas plantas importantes começam a perder-se num grau preocupante (Joy *et al.*, 1998; Joy *et al.*, 2001).

A promoção e o uso de plantas medicinais e a sua integração nos sistemas de saúde foi reconhecida pela Organização Mundial de Saúde e em diversos países (Lamendin *et al.*, 2004; Tepe, 2008), como por exemplo em França, onde são já prescritas preparações de origem vegetal, em paralelo com os medicamentos produzidos pela indústria farmacêutica (Lamendin *et al.*, 2004).

O uso de plantas com finalidades terapêuticas é ainda uma oportunidade para a subsistência e o desenvolvimento económico de populações de baixos rendimentos. As aplicações terapêuticas de extratos vegetais justificam a importância do isolamento, identificação e elucidação dos mecanismos de ação das respetivas moléculas ativas (Joy *et al.*, 1998; Joy *et al.*, 2001).

Das várias atividades biológicas atribuídas a plantas aromáticas e medicinais podem ser citadas ações:

- i) Antibacteriana (Leal *et al.*, 2003; Oluwatuyi *et al.*, 2004; Kamatou *et al.*, 2007; Bakkali *et al.*, 2008);
- ii) Antioxidante (Al-Sereiti *et al.*, 1999; Avato *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2005; Gird *et al.*, 2014; Seidler-Łożykowska *et al.*, 2014; Vaško *et al.*, 2014);
- iii) Antifúngica (Moreno *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2008);
- iv) Antiviral (Cowan, 1999; Bakkali *et al.*, 2008);
- v) Anticarcinogénica (Leal *et al.*, 2003; McVicar, 2006; Gird *et al.*, 2014; Vaško *et al.*, 2014);
- vi) Colérica, estimula a secreção de bilis, descongestiona o fígado e facilita a digestão (Hoefler *et al.*, 1987);
- vii) Hepatoprotetora (Hoefler *et al.*, 1987; Lima *et al.*, 2005);
- viii) Larvicida e/ou repelente (Baricevic *et al.*, 2000);
- ix) Estímulo à atividade enzimática (Debersac *et al.*, 2001; Howes *et al.*, 2011);
- x) Anti-inflamatória (Kintzios, 2000; Kamatou *et al.*, 2007; Proença da Cunha *et al.*, 2011; Howes *et al.*, 2011);
- xi) Analgésica (Proença da Cunha *et al.*, 2011; Bakkali *et al.*, 2008);

Atualmente, a maioria das pessoas utiliza-a na culinária, no entanto, muitos estudos conferem às folhas de *Salvia officinalis* propriedades para o tratamento de diferentes patologias (Lu e Foo, 2000; Ben Hamed *et al.*, 2006).

Segundo Proença da Cunha *et al.* (2007), a atividade farmacológica de *Salvia officinalis* está relacionada com a sua ação antimicrobiana e antissudorífica; os flavonoides e ácidos fenólicos reforçam a ação antissética, dando-lhe uma atividade colerética, espasmolítica e anticolinérgica; as isoflavononas possuem uma ação estrogénica; e devido à presença de taninos, possui propriedades anti-inflamatórias.

A salva, de beleza inata e fascinante, iniciou a sua popularidade na década de 1970 com aqueles em que a jardinagem se tornava um *hobby*, difundindo-se posteriormente, por todos os países de língua Inglesa e resto da Europa (Grieve, 1995; Clebsch, 2003).

I.4 A Espécie *Salvia officinalis* L.

I.4.1 Classificação Taxonómica

A espécie *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* apresenta a seguinte classificação taxonómica, segundo a “Flora Digital de Portugal” (JBUTAD, 2015a):

Reino: Plantae

SuperDivisão: Spermatophyta

Divisão: Magnoliophyta

Sub-Divisão: Magnoliophytina

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Lamiidae

Ordem: Lamiales

Família: Lamiaceae

Género: *Salvia*

Espécie: *Salvia officinalis* Linnaeus

Variedade: *purpurascens*

Segundo Joy *et al.* (2001), a ordem Lamiales engloba aproximadamente 7500 espécies e 300 géneros, 48 dos quais possuem valor medicinal comprovado. Já Rosúa *et al.* (1989); Clebsch (2003), Walker *et al.* (2004), Delamare *et al.* (2007), Kamatou *et al.* (2007) e Walker *et al.* (2007) referem que o género *Salvia* compreende cerca de 900 a 1000 espécies como ocorrentes em todo o mundo, exibindo uma vasta e extraordinária variação de formas e de cores.

S. officinalis é conhecida popularmente como salva, sangue de Adão, alegria dos jardins, chá da Europa, chá da França, chá da Grécia, sabiá, salva de remédio, erva sacra, erva-santa, salva das boticas, salva mansa, salva dos jardins e salva ordinária (Proença da Cunha *et al.*, 2003, 2009; Castroviejo, 2010), grande salva, salva brava, salva da Catalunha, salva mansa, salva menor ou *salvetta* (Castroviejo, 2010).

Embora, o género *Salvia* tenha sido identificado por muitos autores como monofilético, com base na estrutura diferenciada dos seus estames, a grande diversidade de

estruturas estaminais, na morfologia floral e habitat vegetativo tem conduzido a uma dificuldade em encontrar os limites intragenéticos (Claben-Bockhoff *et al.*, 2004). Através de estudos e análises moleculares, Walker *et al.* (2004), por meio de fundamentadas reconstruções filogenéticas em estudos efetuados em regiões *trnL-F*, *ITS* e *PsbA-trnH* dos cloroplastos e das regiões nucleares ribossomais *ITS* do rDNA, acreditam que o género *Salvia* não é um género monofilético, mas compreende três grupos com origem diferente, são eles: táxon I muito difundida pelo velho mundo, mas com uma linhagem no novo mundo; táxon II linhagem do novo mundo e a táxon III uma linhagem Asiática independente. Referem também que o género *Salvia* foi separado dos outros membros da ordem de Mentheae, com base na sua estrutura estaminal singular. Enquanto a maioria das plantas da ordem Mentheae possui quatro estames, o género *Salvia* apresenta apenas dois com duas tecas separadas por um alongado tecido conjuntivo (Walker *et al.*, 2007).

De acordo com um estudo realizado por Farkas *et al.* (2007), verificou-se que a distância genética entre *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* e *Salvia officinalis* varia entre 30 e 42% e que estas, distinguem-se geneticamente de *S. judeaica* (70% distância). Trabalhos efetuados por Böszörményi e seus colaboradores (2009), referem que existe uma forte relação entre a composição química e a variabilidade genética entre as espécies de *Salvia officinalis* L. e as suas cultivares. Todas elas contêm os mesmos compostos voláteis, diferindo apenas na sua concentração.

Poucos estudos foram feitos sobre a variedade *purpurascens*, mas sabe-se que, de acordo com Böszörményi (2010), as variedades *purpurascens* e *tricolor* são as mais semelhantes geneticamente.

I.4.2 Distribuição Geográfica

A família Lamiaceae está representada por diversas espécies distribuídas por vários habitats de diferentes altitudes, encontrando-se desde as regiões do Ártico aos Himalaias, do sudeste da Ásia ao Havai, Austrália, África e Nova Zelândia de norte a sul (Almeida *et al.*, 2002; Claben-Bockhoff *et al.*, 2004), estando muito bem representada na região mediterrânea (Rosúa *et al.*, 1989; Proença da Cunha *et al.*, 2003; Avato *et al.*, 2005; Seidler-Łożykowska *et al.*, 2014) (Figura 2). É uma família típica de savana, que pode ser encontrada em áreas quentes de todo o mundo (Almeida *et al.*, 2002; Claben-Bockhoff *et al.*, 2004).

Segundo Castroviejo (2010), o género *Salvia* é originário da Península Balcânica, dispersando-se mais tarde pela Península Ibérica e Baleares. Sendo a planta *Salvia officinalis*

originária da região do Mediterrâneo (Muñoz, 1993; Grieve, 1995; McLeod, 1995; Baricevic *et al.*, 2000; Gruenwald *et al.*, 2000; Castroviejo, 2010; Proença da Cunha *et al.* 2011; Seidler-Łożykowska *et al.*, 2014), dispersando-se posteriormente por toda a Europa (Muñoz, 1993; Grieve, 1995; Gruenwald *et al.*, 2000). Já é tão antiga, que atualmente encontram-se imensas variedades (Garland, 2004) dispersas por todo o mundo (Figura 2), principalmente nas zonas quentes e temperadas (Bettaieb *et al.*, 2009). Por vezes, surge como subspontânea em Portugal (Proença da Cunha *et al.*, 2009).

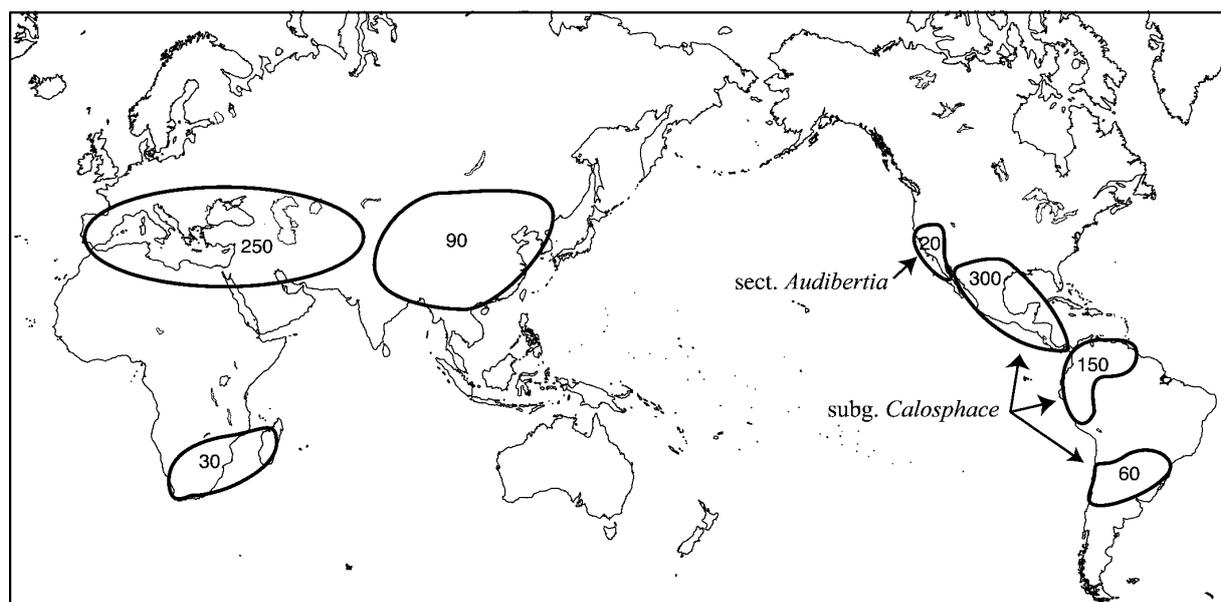


Figura 2 - Centros de diversidade do género *Salvia*. Em cada área encontra-se o número referente às espécies existentes em cada região (Fonte: Walker *et al.*, 2004)

Os atuais centros de diversidade são a Europa/Ásia, inclui a Bacia do Mediterrâneo (cerca de 250 espécies), centro e leste da Ásia (cerca de 90 espécies), leste e sul da África (cerca de 60 espécies), América do Norte (cerca 20 espécies), América Central (cerca 300 espécies) e América do Sul (cerca 210 espécies) (Claben-Bockhoff *et al.*, 2004).

A espécie *Salvia officinalis* L. é a mais representativa deste género. Para além de estar bastante difundida na Bacia do Mediterrâneo (Figura 3) (Avato *et al.*, 2005; Karaback *et al.*, 2009), aparece também no sudeste do continente africano e no sul do continente americano, onde é largamente cultivada (Avato *et al.*, 2005).



Figura 3 - Distribuição mundial da *Salvia officinalis* L.; coloração roxa: nativa, coloração castanha: introduzida (Fonte: WCSP, 2012)

A espécie *Salvia officinalis* encontra-se no seu estado selvagem em Espanha e ao longo da costa do Mediterrâneo incluindo o lado oriental do Adriático. Cresce com exuberância sobre as montanhas e colinas da Croácia e Dalmácia, nas ilhas de Veglia (Krk, ilha Croata) e Golfo de Carnaro, sendo encontrada principalmente onde há formações calcárias de solo delgado. No estado selvagem tem um odor mais penetrante, sendo mais picante e adstringente do que a planta cultivada. A melhor variedade, segundo dizem, cresce nas ilhas de Veglia, onde o distrito circundante é conhecido como a região da salva (Grieve, 1995). Quando cultivada, *S. officinalis*, prefere terrenos calcários de clima temperado e com muita luz (Proença da Cunha *et al.*, 2003, 2007). Nos países em que *S. officinalis* é cultivada, a colheita inicia-se no mês de julho e termina em dezembro, dependendo do local onde se encontra. A colheita ocorre a partir do segundo ano de vegetação, no início da floração (Gruenwald *et al.*, 2000).

I.4.3 Descrição Botânica

Salvia officinalis é uma espécie nanofanerófita, e os seus exemplares são perenes (Grieve, 1995; Seidler-Łożykowska *et al.*, 2014; JBUTAD, 2015b), herbáceos ou subarborescentes (Grieve, 1995; Gruenwald *et al.*, 2000; Castroviejo, 2010), caméfito até 60cm

de porte ereto (Figura 4), com numerosos ramos tomentosos patentes (Ortiz, 2009; Castroviejo, 2010; Proença da Cunha *et al.*, 2011), cobertos de tricomas de 0,2-1,5mm e glândulas esferoidais sésseis (Castroviejo, 2010).



Figura 4 - *Salvia officinalis* L. (Fonte: Adaptado de WCSP, 2012)

Apresenta folhas oblongas cinza esverdeadas, púrpuras, ligeiramente enrugadas e aveludadas (Kingsley, 1998; Ortiz, 2009; Castroviejo, 2010), branco-tomentosas na página inferior (Grieve, 1995; Gruenwald *et al.*, 2000; Proença da Cunha *et al.*, 2003; Karaback *et al.*, 2009; Ortiz, 2009; Castroviejo, 2010), tricomas esses, com cerca de 0,2-1,5mm e glândulas esferoidais sésseis, com limbo de 1,8-7,7×0,8-3cm (Castroviejo, 2010). As folhas também podem ser oblongo-lanceoladas, estreitas na base, pecioladas, finamente dentadas com nervura rugosa (Grieve, 1995; Gruenwald *et al.*, 2000; Karaback *et al.*, 2009; Castroviejo, 2010). Quando jovens apresentam uma cor branco acinzentadas, posteriormente ficam cinza esverdeadas (Grieve, 1995; Gruenwald *et al.*, 2000; Castroviejo, 2010). As folhas externas são as primeiras a serem renovadas (Gruenwald *et al.*, 2000). O caule apresenta uma forma quadrangular com feixes de colênquima nas extremidades (Strasburger *et al.*, 2002; Proença da Cunha *et al.*, 2011).

A salva rubra, *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*, é também um subarbusto com a mesma dimensão da salva comum, *S. officinalis* (Singer, 2008), e as suas folhas adultas são semelhantes, a diferença reside nas folhas jovens que apresentam uma coloração púrpura (Karaback *et al.*, 2009).

A flor de *S. officinalis* é labiada, zigomórfica (Grieve, 1995; Gruenwald *et al.*, 2000; Strasburger *et al.*, 2002; Clebsch, 2003; Castroviejo, 2010; Proença da Cunha *et al.*, 2011) de cor violeta pálido, branco ou rosa (Grieve, 1995; Gruenwald *et al.*, 2000; Clebsch, 2003; Castroviejo, 2010) ou segundo Strasburguer *et al.* (2002) azuis ou roxas. Apresentam um tamanho médio, verticilastros (Rosúa *et al.*, 1989; Strasburger *et al.*, 2002; Proença da Cunha *et al.*, 2003, 2007; Karaback *et al.*, 2009; Ortiz, 2009; Castroviejo, 2010) inferiores de 5 a 10 flores (Rosúa *et al.*, 1989; Proença da Cunha *et al.*, 2003; Ortiz, 2009; Castroviejo, 2010) ou 4 a 8 flores (Karaback *et al.*, 2009), reunidos em espiga, com as brácteas às vezes coradas (Rosúa *et al.*, 1989; Castroviejo, 2010) que podem atingir 23×7mm, ovadas pontiagudas e persistentes (Castroviejo, 2010). Aparecem em falsos espirais, os quais estão dispostas em 4 a 8 linhas (Gruenwald *et al.*, 2000). Pedicelos 2-4mm, não comprimidos, semirretos (Castroviejo, 2010). Cada cálice pode atingir 10 a 14/15mm. Apresenta a forma de um funil campanulado ou tubuloso, bilabiado, com lábio superior tridentado e inferior bidentado ou bifendido (Gruenwald *et al.*, 2000; Clebsch, 2003; Karaback *et al.*, 2009; Castroviejo, 2010), cor verde ou púrpura, com tricomas 0,2-1,2mm e glândulas esferoidais sésseis (Castroviejo, 2010).

O cálice é gamossépalo, quase sempre persistente até à frutificação, corola gamopétala, frequentemente bilabiada, é formado por uma pétala superior e duas inferiores (McLeod, 1995). A corola é bilobada, podendo atingir 35mm (Gruenwald *et al.*, 2000; Proença da Cunha *et al.*, 2003; Ortiz, 2009; Castroviejo, 2010), com o lábio superior ereto, comprimido lateralmente, pouco arqueado ou falciforme, e o inferior trilobado com o lóbulo médio maior (Karaback *et al.*, 2009; Castroviejo, 2010) apresenta cor rosada, violeta, azul rosada ou lilás (Castroviejo, 2010); possui dois estames (os anteriores), com os filetes curtos e os conectivos muito compridos, tendo cada um na extremidade superior um lóculo oblongo da antera e na extremidade inferior um lóculo estéril ou um apêndice achatado em forma de colher e os aquénios ovoide trigonais, ou subglobosos, lisos (Karaback *et al.*, 2009; Castroviejo, 2010). O estilete origina-se no carpelo, o ovário é súpero e divide-se em quatro profundos lóbulos durante a floração (Strasburger *et al.*, 2002; Ortiz, 2009), este possui um anel de tricomas no seu interior (Gruenwald *et al.*, 2000; Castroviejo, 2010), sem invaginação na sua parte ventral

(Castroviejo, 2010). O néctar é produzido pelo nectário na base do ovário (Classen-Bockhof *et al.*, 2004).

Segundo estudos efetuados por Rosúa *et al.* (1989), existe uma dificuldade na observação dos cromossomas, o que impede a existência de cariótipos deste grupo de plantas, só se conhecendo o número cromossómico básico $X=11$.

I.4.3.1 Ontogenia

No início do desenvolvimento foliar, as folhas jovens desprovidas quase de cloroplastos adquirem uma coloração púrpura, em contraste com a coloração cinza esverdeada das folhas adultas. Esta tonalidade está relacionada com o aumento de antocianinas acumuladas nos vacúolos das células epidérmicas, que confere proteção aos poucos cloroplastos contra a radiação UV-B, que provoca desintegração da clorofila das folhas (Meyer *et al.*, 1983; Costa, 2012). Assim as antocianinas desempenham um papel muito importante como fotoprotetores solares, protegendo-as de danos induzidos por excesso de radiação solar.

Com o desenvolvimento vegetativo a área e a espessura foliar têm tendência a aumentar (Meyer *et al.*, 1983; Schultz, 1996; Gratani *et al.*, 2002). Este aumento da lâmina total melhora a capacidade de interceção da luz e aumenta a eficiência das trocas gasosas (Meyer *et al.*, 1983; Gratani *et al.*, 2002). Estes processos são fundamentais e muito sensíveis às variações de temperatura atmosférica e à humidade (Meyer *et al.*, 1983; Gratani *et al.*, 2002).

A cutícula foliar presente na face externa das paredes celulares das epidermes das folhas, tem como principais constituintes as ceras e a cutina (Meyer *et al.*, 1983; Gratani *et al.*, 2002).

As paredes cutinizadas são relativamente impermeáveis à água, reduzindo grandemente a perda de água por transpiração (Meyer *et al.*, 1983; Gratani *et al.*, 2002), a perda de compostos orgânicos e inorgânicos por lixiviação, a penetração da radiação UV-B (Gratani *et al.*, 2000) protegendo a folha de pragas e doenças.

Bringe *et al.* (2006) que efetuaram estudos na ontogenia das folhas de macieira concluíram que a síntese das ceras não acompanha o rápido crescimento da folha, pois verificaram uma diminuição da concentração de ceras solúveis com o aumento da área foliar.

Segundo Figueiredo e seus colaboradores (1997), a folha das plantas da família Lamiaceae apresenta diferentes tipos de estruturas secretoras, nomeadamente tricomas.

I.4.3.2 Estruturas Secretoras

As plantas produzem uma grande variedade de secreções. Algumas são soluções constituídas essencialmente por metabolitos primários e/ou por metabolitos secundários (Ascensão, 2007). As secreções vegetais são sintetizadas ou simplesmente acumuladas e eliminadas em células especializadas, que ocorrem isoladas (idioblastos secretores) ou que constituem estruturas glandulares diferenciadas (tricomas, emergências, bolsas, canais e vasos laticíferos) (Ascensão, 2007).

Os tricomas são apêndices epidérmicos com ampla distribuição nas plantas Magnoliophyta. Podem apresentar formas, estruturas e funções variadas e encontram-se presentes nos órgãos superficiais da planta (Hallahan e Gray, 2000; Ascensão, 2007).

São classificados como apêndices uni ou pluricelulares, originários de células epidérmicas que se desenvolveram para o exterior nas diferentes superfícies dos diversos órgãos que a constituem (Hallahan e Gray, 2000; Ascensão, 2007). A grande diversidade destas estruturas em termos morfológico, estrutural, ontogénico, composição química do secretado e o modo de secreção faz com que a sua classificação não seja fácil, sendo muitas vezes subjetiva, dada a variedade de métodos de classificação existentes (Hallahan e Gray, 2000; Ascensão, 2007). A distinção mais utilizada divide-os em tricomas glandulares e não glandulares, sendo a morfologia a principal característica de distinção. No entanto existem outras, também importantes tais como: o material secretado, acumulado e absorvido (Hallahan e Gray, 2000; Ascensão, 2007).

Segundo Ascensão *et al.* (1995), Avato *et al.* (2005) e Gonçalves *et al.* (2010), a ontogenia dos tricomas glandulares na família Lamiaceae terá origem numa célula da protoderme, que se distingue das células contíguas por ser mais volumosa e apresentar citoplasma mais denso e núcleo hipertrofiado. São responsáveis pela secreção de metabolitos de diferentes naturezas, hidrofílicos e lipofílicos (Ascensão *et al.*, 1995; Hallahan e Gray, 2000; Moreira *et al.*, 2010).

Normalmente são classificados em dois grupos: tricomas peltados e tricomas capitados (Figura 5), em que ambos apresentam uma cabeça secretora, pedículo e uma base ou pé (Ascensão *et al.*, 1995; Hallahan e Gray, 2000; Moreira *et al.*, 2010). São formados por uma célula basal, no entanto os peltados possuem um pedículo curto e uma cabeça com células secretoras de organização diversificada, enquanto nos tricomas capitados o pedículo pode ser uni ou pluricelular, extenso ou curto, mas relativamente maior que metade da cabeça uni ou bicelular (Hallahan e Gray, 2000).

Segundo Corsi *et al.* (1999) e Avato *et al.* (2005) os tricomas glandulares capitados de *S. officinalis* podem ser classificados em: capitado tipo I, capitado tipo II, capitado tipo III e capitado tipo IV (Figura 5). O que os distingue são o local do órgão vegetativo em que se encontra, os distintos modos de secreção e a constituição dessas secreções. Assim sendo, apresentam um papel funcional distinto.

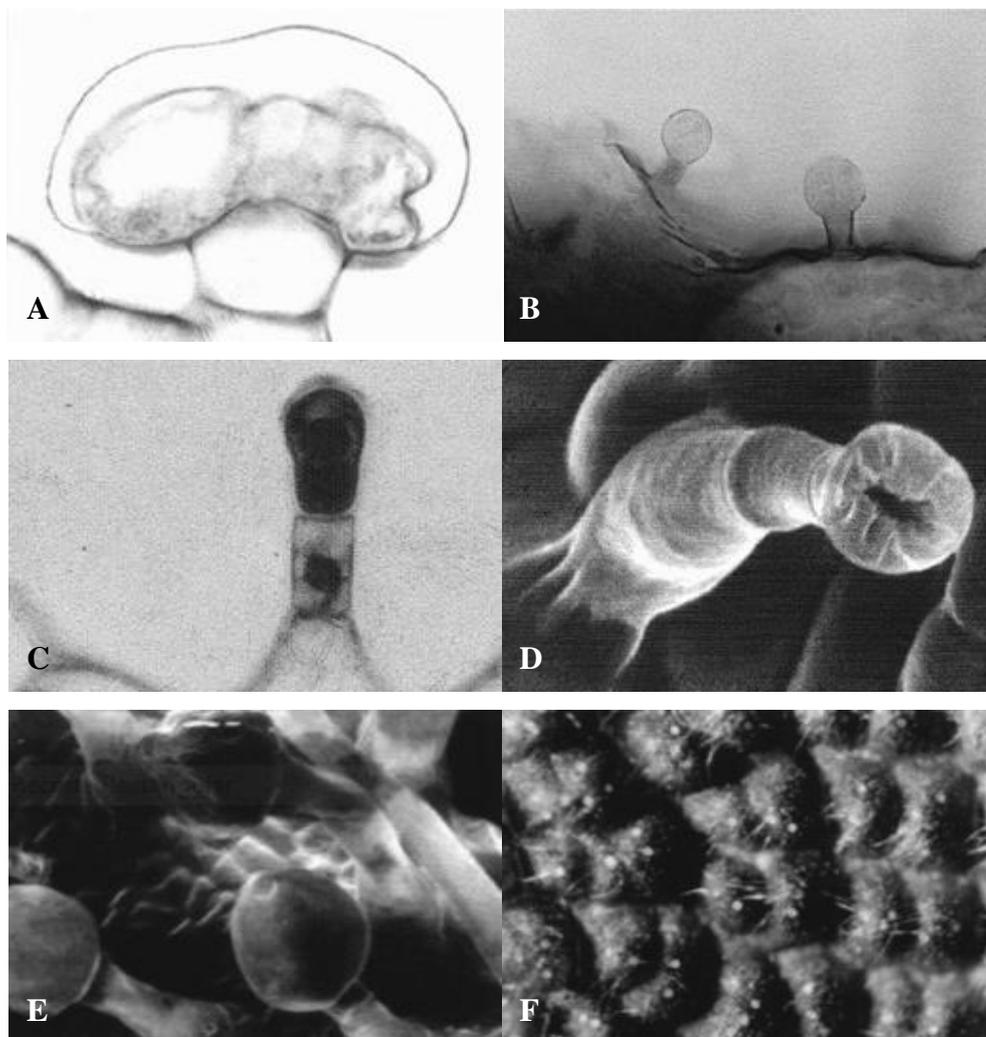


Figura 5 - (A) Tricoma peltado ($\times 800$); Tricomas glandulares capitados (B, C, D, E): (B) Tipo I ($\times 150$), (C) Tipo II ($\times 600$), (D) Tipo III (SEM, $\times 1700$), (E) Tipo IV (SEM $\times 700$); (F) Tricomas peltados na página adaxial da folha e tricomas não glandulares (SEM $\times 6$) de *Salvia officinalis* (Adaptado de Corsi *et al.*, 1999)

Todos apresentam secreções mistas, exceto o tricoma capitado tipo I, que só possui secreções hidrofílicas. Nos tricomas peltados e nos capitados tipo II, as secreções predominantes são as hidrofílicas, nos restantes tipos as secreções dominantes são as lipofílicas (Corsi *et al.*, 1999).

De acordo com Corsi *et al.* (1999), dentro dos quatro tipos de tricomas capitados encontram-se diferenças morfológicas. Os tricomas tipo I possuem um pedículo curto uni ou bicelular e uma grande cabeça secretora também uni ou bicelular. Os tricomas tipo II resultam

do alongamento das células basais tal como nos tricomas peltados. Os tricomas tipo III são grandes, constituídos por um longo pedículo composto por uma a três células e uma cabeça unicelular cutinizada. Os pedículos dos tricomas do tipo IV são longos e delgados compostos por quatro células no final da ontogénese. A cabeça unicelular é grande e larga com formas muitas vezes trapezoidais.

Os tricomas peltados são constituídos por um pequeno pedículo unicelular e uma cabeça secretora constituída por 12 células (ocasionalmente 16) organizadas em escudo (quatro células centrais rodeadas por oito periféricas). As células do pedículo apresentam-se cutinizadas. As células da cabeça secretora também manifestam uma cutícula espessa levantada, de modo a formar uma câmara secretora subcuticular (Corsi *et al.*, 1999; Avato *et al.*, 2005).

Os tricomas peltados encontram-se essencialmente nas folhas e nos órgãos reprodutores, em particular no cálice. Os tricomas capitados do tipo I localizam-se nas folhas tal como os tricomas peltados e em menor número junto ao cálice, tendo tendência a ser mais numerosos junto da entrada do cálice e na sua base. Os tricomas tipo II encontram-se em menor quantidade e espalhados pelas duas páginas da folha, aparecendo especialmente junto às nervuras e ao cálice. Os tricomas tipo III aparecem em menor número e só na página adaxial da folha. Os tricomas tipo IV só foram observados no cálice especialmente junto às nervuras e margens superiores (Corsi *et al.*, 1999).

Os tricomas peltados estão mais especializados na defesa física, e os tricomas glandulares capitados na defesa química (Corsi *et al.*, 1999). De facto, as substâncias detetadas pelos métodos histoquímicos sugerem que este tipo de tricomas estão envolvidos na defesa química da planta. A presença de uma massa viscosa, adesiva de polissacarídeos, principalmente no cálice de flores frescas ou secas, sugere que existe um eficiente mecanismo de defesa, pois muitos afídeos ficam presos ao tentarem alimentar-se da planta (Corsi *et al.*, 1999).

Os tricomas não glandulares podem ser uni ou pluricelulares, uni ou plurisseriados, simples ou ramificados, que se apresentam num único plano (Hallahan e Gray, 2000).

Os tricomas não glandulares aparecem essencialmente nos órgãos vegetativos e reprodutivos, são abundantes e grandes nos órgãos mais jovens, são responsáveis pela proteção da planta quando ocorre um excesso de transpiração e de radiação (Corsi *et al.*, 1999).

Aparecem frequentemente nas folhas e nos cálices, na página adaxial junto às protuberâncias e na página abaxial junto às nervuras secundárias. Nos cálices juvenis aparecem tricomas não glandulares longos e muito finos especialmente na base. Com o desenvolvimento vegetativo os tricomas têm tendência a desaparecer do cálice e a situarem-se ao longo das nervuras (Corsi *et al.*, 1999).

I.4.4 Fisiologia

Nas plantas vasculares, a fotossíntese ocorre principalmente nas folhas que, na maioria das espécies, são órgãos finos e expandidos, possuidores de uma enorme superfície externa em relação ao seu volume. Este tipo de estrutura permite a exposição à luz (relativamente ao volume da folha) de células portadoras de cloroplastos (Meyer *et al.*, 1983).

O aparelho fotossintético está organizado de uma forma heterogênea lateral dos tilacoides, que por sua vez, origina heterogeneidade funcional. A formação de grana está associada com a separação dos fotossistemas II (PSII) e I (PSI). O PSII nas zonas de partição e o PSI nas zonas expostas juntamente com a ATPase (Lawlor *et al.*, 1993; Wild e Ball, 1997 *in sit* Gomes-Laranjo *et al.*, 2003). Experiências realizadas evidenciam variabilidade na razão PSII/PSI, em resposta às condições de radiação do meio onde as plantas crescem (Wild e Ball, 1997 *in sit* Gomes-Laranjo *et al.*, 2003).

A maturação do aparelho fotossintético ocorre ao longo do desenvolvimento foliar (Lepeduš *et al.*, 2011). Inicialmente a formação do PSII é rápida permitindo assim uma elevada produção de oxigênio para compensar a elevada taxa de respiração. Contudo, as folhas jovens são mais suscetíveis à fotoinibição, estando assim mais sujeitas ao stresse oxidativo (Bertamini *et al.*, 2003; Pallardy, 2008; Costa, 2012). A fotoinibição ocorre, principalmente, no PSII (Bertamini *et al.*, 2003) por inativação da proteína D1 e do centro de reação que interrompe a fotossíntese (Melis, 1999; Nishiyama *et al.*, 2006). No caso das folhas adultas, o aumento da atividade do ciclo das xantofilas, relacionado com a dissipação térmica nas antenas do PSII, pode apresentar vantagens na proteção do aparelho fotossintético contra a fotoinibição (Lu e Zhang *et al.*, 2001; Chaves *et al.*, 2003).

Em estados mais avançados da ontogenia ocorre um decréscimo da enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) e diminuição da condutância estomática reduzindo a entrada de CO₂ (Bertamini *et al.*, 2002; Pallardy, 2008) e, conseqüentemente, da taxa fotossintética (Lu e Zhang *et al.*, 2001; Bertamini *et al.*, 2002; Ohe *et al.*, 2005). As folhas jovens apresentam uma maior condutância estomática com uma abertura estomática

decrecente à medida que se aproxima da senescência (Ekanayake *et al.*, 1995). Apesar de em algumas espécies como o morangueiro e o limoeiro, os níveis de condutância estomática e de transpiração aumentarem em folhas adultas (Keutgen *et al.*, 1997; Keutgen *et al.*, 2001).

As antocianinas das folhas jovens, que lhes conferem a coloração púrpura, absorvem uma parte da luz emitida por fluorescência reduzindo assim a intensidade da fluorescência da clorofila (Costa, 2012; Gould *et al.*, 2008). Ao contrário do que esperavam, o estudo de Avalos *et al.* (2004), não identificou diferenças nos valores de eficiência fotoquímica máxima do PSII (F_v/F_m) entre folhas jovens e adultas de *Psychotria limonensis*.

I.4.5 Condições de Cultivo

A espécie *S. officinalis* é uma planta rústica, adapta-se bem a uma grande variedade de solos, desde ácidos a básicos, com um intervalo de pH bastante amplo, 4,2 a 9 segundo Muñoz (1993), Kingsley (1998) e Savio *et al.* (1998). Prefere solos leves, secos, bem drenados embora se dê bem em solos argilosos, é resistente à seca (Muñoz, 1993; Singer, 2008; Karaback *et al.*, 2009), e necessita de um lugar com bastante luz solar (Muñoz, 1993; Singer, 2008; Karaback *et al.*, 2009; Ortiz, 2009). A gama de temperatura deve estar entre 5 - 26°C (Kingsley, 1998; Savio *et al.*, 1998).

É propagada por semente, ocasionalmente, mas com mais frequência por estaca (Muñoz, 1993; Grieve, 1995). De facto a propagação é feita por estacaria no final da primavera ou início do outono. As sementes germinam facilmente, mas devido à variabilidade genética este método não é aconselhado. A floração ocorre no final da primavera início do verão (Karaback *et al.*, 2009).

A espécie *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* é sempre propagada por alporquia ou por estaca, pois a semente não produz plantas com folhas de coloração púrpura, mas origina plantas de folhas com coloração exclusivamente verde (Grieve, 1995).

As partes utilizadas de *Salvia officinalis* são as folhas, caules e as partes aéreas floridas (Grieve, 1995; Gruenwald *et al.*, 2000; Proença da Cunha *et al.*, 2003, 2007, 2009). Podem ser utilizadas em verde ou secas, ou aproveitando os seus óleos essenciais extraídos das folhas e caules. As folhas são aromáticas, picantes e adstringentes (Gruenwald *et al.*, 2000).

A salva pode ser seca ao sol, no entanto as melhores condições de secagem, de maneira a haver uma menor perda de metabolitos, será utilizando câmaras de secagem com

entrada de correntes de ar verticais a 50°C com 0,9% de humidade absoluta (Gruenwald *et al.*, 2000).

Na Dalmácia, onde a tradição de colecionar espécies de *Salvia* constitui uma indústria caseira importante, as folhas são colhidas de maio a setembro, antes da floração, retiradas em pleno verão. A opinião geral é que deve ser colhida antes da flor abrir, apesar da Farmacopeia austríaca afirmar que a apanha da folha é melhor durante a floração (Grieve, 1995).

A planta vulgarmente designada de salva é utilizada, como referido anteriormente, como condimento alimentar, para fornecer sabor e aromatizar pratos confecionados e como planta medicinal serve para aliviar males de índole diversa (Walker *et al.*, 2007).

I.4.6 Usos Populares e Mediciniais

Atualmente, o efeito das plantas medicinais na saúde humana é sobejamente conhecido devido essencialmente à presença de vários compostos químicos entre os quais, terpenoides, alcaloides, fenóis, glicosídeos e taninos (Egwaikhide *et al.*, 2009; Kolasani *et al.*, 2011).

As propriedades medicinais da família Lamiaceae estão relacionadas com a elevada atividade antioxidante conferida essencialmente pelos compostos fenólicos (Geneva *et al.*, 2010). Nestas últimas décadas, este facto já foi várias vezes investigado (Lu e Foo, 2000; Geneva *et al.*, 2010), sendo a salva considerada um potente antioxidante natural (Bettaieb *et al.*, 2011). A presença de outros compostos difundiu as suas variedades pelas várias regiões mundiais, essencialmente para uso medicinal, ornamental, culinário, perfumaria e cosmética (Santos-Gomes *et al.*, 2002; Bettaieb *et al.*, 2011; Ardalan *et al.*, 2012).

É largamente conhecido que as condições edafoclimáticas e a ontogenia da folha influenciam a composição em metabolitos secundários e a qualidade dos extratos das folhas das plantas (Figueiredo *et al.*, 2008). Esta variação em *S. officinalis* é repetida a cada ciclo sazonal, o que torna os parâmetros imprevisíveis a cada ano (Grausgruber-Groger *et al.*, 2012).

A terapia à base de plantas tem crescido muito, o que leva a que as plantas medicinais tenham um elevado interesse económico e sejam um recurso importante para a produção de fármacos (Oliveira *et al.*, 2012). Nestes últimos anos várias técnicas agrícolas têm sido utilizadas para aumentar a produção destes fitoquímicos (Bettaieb *et al.*, 2011), pois estima-se que cerca de 25% das moléculas dos fármacos sejam de origem natural (Bourgoud *et al.*, 2001).

I.5 Metabolitos Ativos

Nos seus *habitats* naturais, as plantas estão rodeadas por um grande número de inimigos potenciais. Quase todos os ecossistemas possuem uma ampla variedade de bactérias, vírus, fungos, nemátodes, aracnídeos, insetos, mamíferos e outros animais herbívoros. No entanto, as plantas conseguem sobreviver a tais fatores, pois possuem formas de se protegerem, produzindo um grupo de compostos conhecidos como metabolitos secundários, que atuam como mecanismo de defesa contra agressões (Taiz e Zeiger, 2006; Landolino *et al.*, 2010).

A vida nos seres vivos depende de uma complexa rede de reações químicas que se encontram interligadas entre si, a que se designa metabolismo celular. Numa só célula podem atuar uma centena de enzimas diferentes, todas elas catalisando reações específicas (Santos, 2000; García *et al.*, 2009; Landolino *et al.*, 2010).

O elevado grau de organização celular não seria possível se não houvesse uma ordem em todas essas reações, pelo que a localização e a organização das enzimas na célula constitui um aspeto fundamental na própria vida na Terra (Santos, 2000; García *et al.*, 2009; Landolino *et al.*, 2010).

Os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados nessas vias metabólicas, denominam-se de metabolitos e as reações enzimáticas envolvidas são designadas por catabólicas, anabólicas ou de biotransformação respetivamente (Santos, 2000; Landolino *et al.*, 2010).

A maior parte do carbono, azoto e energia utilizado pelas plantas, termina em moléculas comuns a todas as células, necessárias ao bom funcionamento do organismo, como sejam os aminoácidos, os nucleótidos, os açúcares e os lípidos, presentes em todas as plantas, com um papel fundamental no desempenho das várias estruturas funcionais da própria planta. Por serem considerados processos essenciais à vida e comuns a todos os seres vivos, têm sido definidos como parte integrante do metabolismo primário (Santos, 2000; García *et al.*, 2009; Landolino *et al.*, 2010).

O que diferencia muitas plantas dos restantes organismos, salvo algumas exceções, é a capacidade que estas têm em acumular inúmeras outras substâncias não necessárias à manutenção da vida dos seres vivos, definindo-se este conjunto metabólico como

metabolismo secundário (Santos, 2000; García *et al.*, 2009; Landolino *et al.*, 2010). Este metabolismo está intimamente relacionado com atividades do organismo que não são, nem constantes nem sempre do mesmo tipo, pois a época do ano e o grau de maturidade do organismo podem ser fatores diferenciadores (Lobo *et al.*, 2007).

As vias metabólicas (primárias e secundárias) de síntese, degradação e interconversão das moléculas essenciais, bem como as reações que visam a obtenção de energia são idênticas. No entanto, as vias metabólicas secundárias só serão ativadas durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou quando a planta estiver sujeita a situações de stresse tais como: hídrico, alimentar ou por ataque microbiológico/físico (Santos, 2000; García *et al.*, 2009; Landolino *et al.*, 2010).

As vias metabólicas, primária e secundária, não são independentes uma da outra. A alteração da primeira pode afetar profundamente a segunda via, embora o inverso não seja verdadeiro, podendo muitas vezes os metabolitos secundários ser utilizados por metabolitos primários em casos extremos (Santos, 2000).

As principais vias de biossíntese de metabolitos secundários derivam do metabolismo da glucose, que possui dois intermediários, o ácido xiquímico e o acetato. O ácido xiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabolitos secundários aromáticos, Figura 6. Alguns metabolitos secundários derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação de uma unidade de ácido xiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, como é o caso dos flavonoides (Santos, 2000; Vermerris *et al.*, 2006; Landolino *et al.*, 2010).

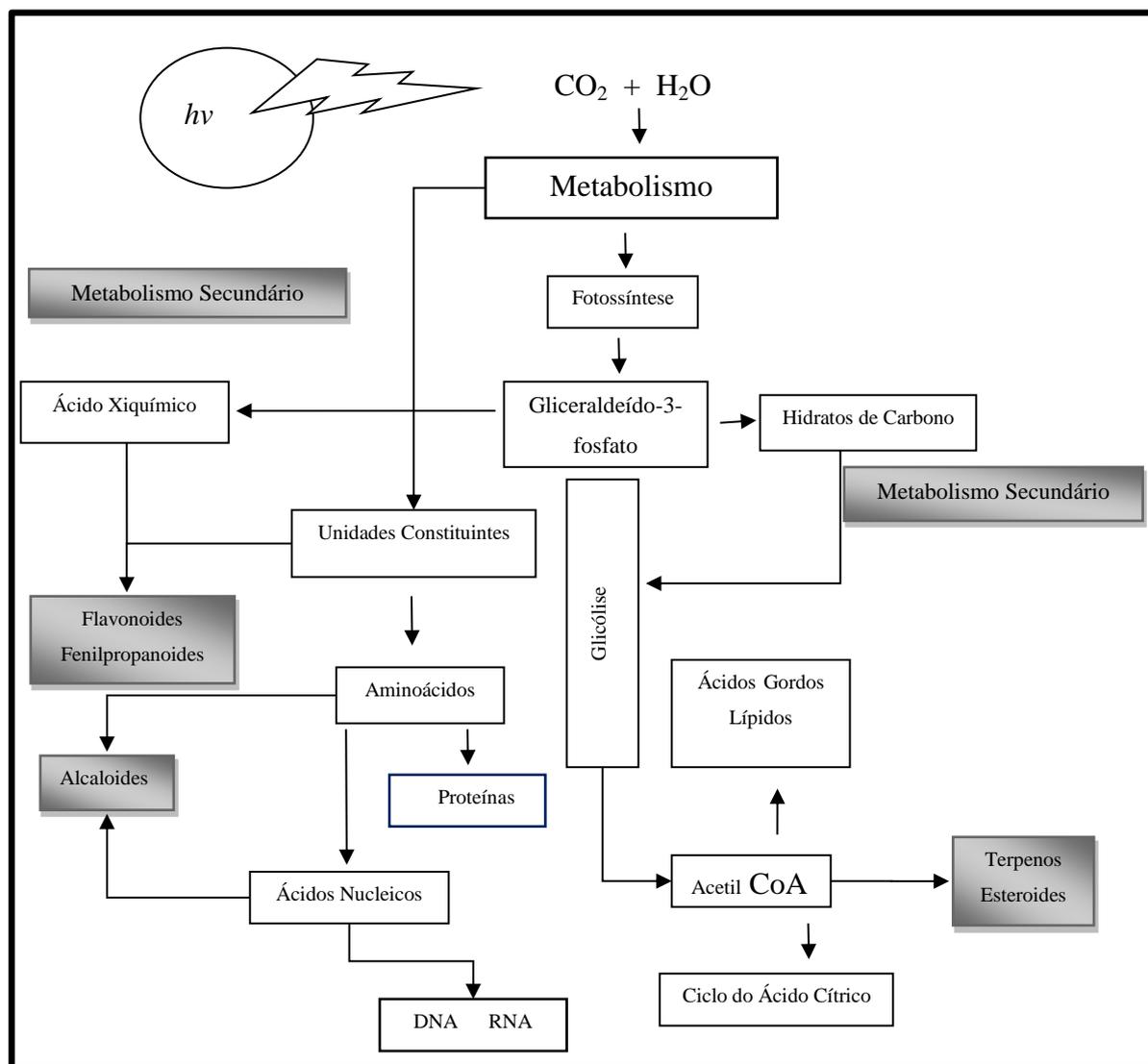


Figura 6 - Elementos básicos do metabolismo primário relacionado com o metabolismo secundário das plantas (Adaptado de Santos, 2000; García *et al.*, 2009)

Os metabolitos secundários, apesar de não apresentarem uma função definida nos processos vitais para a planta (Taiz *et al.*, 2006; Lobo *et al.*, 2007; García *et al.*, 2009; Vaishnav *et al.*, 2011), diferem dos metabolitos primários, por aparecerem num grupo restrito de plantas, num determinado género, família ou mesmo espécie. Sintetizam-se em pequenas quantidades e não de uma forma generalizada (Santos, 2000; Taiz *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009).

Sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas na defesa contra herbívoros, microrganismos, proteção contra os raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (Santos, 2000; Taiz *et al.*, 2006; Landolino *et al.*, 2010).

Embora qualquer tecido ou célula vegetal tenha capacidade de biossintetizar metabolitos secundários, as plantas possuem tecidos ou mesmo células especializadas para esse efeito (Santos, 2000).

Atualmente são conhecidos muitos compostos resultantes do metabolismo secundário, mas apenas alguns têm interesse comercial, especialmente para a indústria farmacêutica, alimentar, agronômica, produtos de higiene, cosmética e perfumaria. Alguns dos seus componentes são usados em perfumes, produtos de maquiagem, produtos de higiene, em odontologia, na agricultura, como inseticidas, herbicidas, como conservantes, corantes, aditivos alimentares e como medicamentos naturais (Santos, 2000; Perry *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003; Lugasi *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009; Landolino *et al.*, 2010).

Estes compostos derivados do metabolismo secundário são distribuídos diferencialmente entre grupos taxonômicos (Costa, 2012). Apresentam propriedades biológicas e, em muitos casos, também apresentam funções ecológicas diferentes, são atraentes ou repelentes de animais, e importantes no papel da reprodução, atraindo insetos polinizadores, ou atraindo animais que utilizam o fruto como fonte de alimento, contribuindo desta forma para a dispersão das sementes. Muitos destes pigmentos são os responsáveis pela cor das flores e frutos. Outros compostos têm uma função protetora frente aos predadores, atuando como repelentes, fornecendo à planta sabores amargos, tornando-as assim indigestas ou mesmo venenosas. Também intervêm nos mecanismos de defesa frente aos diferentes patogênicos, atuando como pesticidas naturais (García *et al.*, 2009; Landolino *et al.*, 2010).

Os metabolitos secundários são usualmente classificados em três grupos de acordo com a sua origem biossintética: derivados dos terpenoides, formados pela via do ácido mevalônico; derivados do fenilpropanoide, formados pela via do ácido xiquímico; formados pela via do acetato, os poliacetatos aromáticos (Santos, 2000; Lobo *et al.*, 2007; Bakkali *et al.*, 2008; García *et al.*, 2009).

I.5.1 Compostos Fenólicos

As plantas sintetizam uma grande variedade de metabolitos secundários que contêm o grupo fenol. Estes compostos fenólicos produzidos pelas plantas formam um grupo quimicamente heterogêneo (Carvalho *et al.*, 2000; Taíz, 2006; Zeiger, 2006; Matkowski, 2008; García *et al.*, 2009; Poquet *et al.*, 2010; Baruah, 2011; Jyotirekha, 2011).

Estas substâncias recebem o nome de compostos fenólicos, polifenóis ou fenilpropanoides pois derivam todas elas do fenol (Carvalho *et al.*, 2000; Taíz *et al.*, 2006;

Zeiger, 2006; Vermerris *et al.*, 2006; Damodaran *et al.*, 2008; Matkowski, 2008; García *et al.*, 2009; Fraga *et al.*, 2010; Poquet *et al.*, 2010; Tortora *et al.*, 2010; Jyotirekha, 2011), composto que é caracterizado por possuir pelo menos um anel aromático ao qual está ligado um grupo hidroxilo (Morrison *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2000; Verris *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009; Poquet *et al.*, 2010; Jyotirekha, 2011; Dey *et al.*, 2012). As suas propriedades físicas são fortemente influenciadas pelo grupo hidroxilo que permite ao fenol efetuar ligações com outras moléculas fenólicas (Zeiger, 2006).

A maior parte dos compostos fenólicos não são encontrados no estado livre na natureza (Carvalho *et al.*, 2000). São encontrados essencialmente nos vacúolos, onde se encontram também as enzimas que os clivam. A forma de ésteres e glicosídeos em que se encontram nas células protegem as mesmas dos efeitos de toxicidade que os compostos fenólicos possuem, pois todos derivam do fenol, apresentando portanto, caráter ácido. Uma vez que todos os fenóis são ácidos fracos, como tal são relativamente tóxicos, até mesmo para as células que os sintetizam, sendo no entanto esta toxicidade reduzida quando se encontram como ésteres e glicosídeos. As enzimas que os clivam também se situam nos vacúolos e nalguns casos podem ser encontrados na parede da célula. Sob pressões ambientais, como calor, frio e luz de alta intensidade, as enzimas apropriadas podem ser produzidas, resultando na destruição do composto (Vermerris *et al.*, 2006; Landolino *et al.*, 2010).

Dentro da variedade de antioxidantes encontrados em fontes vegetais, os que se destacam são os compostos fenólicos, por serem os mais ativos. Estes têm a capacidade de interromper a propagação da autoxidação em cadeia de radicais livres ao contribuírem com a doação de um átomo de hidrogénio para a formação de um radical mais estável que não inicia ou propaga o processo oxidativo (Hall *et al.*, 1997; Vermerris *et al.*, 2006; Landolino *et al.*, 2010; Terao, 2010; Jyotirekha, 2011).

Os compostos fenólicos podem ser originados por diferentes vias biossintéticas, via do ácido xiquímico e a via do ácido malónico (Figura 7), sendo a via do ácido xiquímico a maioritariamente responsável pela sua biossíntese. A via do ácido malónico, apesar de ser uma fonte importante de fenóis em fungos e bactérias, é pouco utilizada nas plantas superiores (Taíz *et al.*, 2006; Zeiger, 2006).

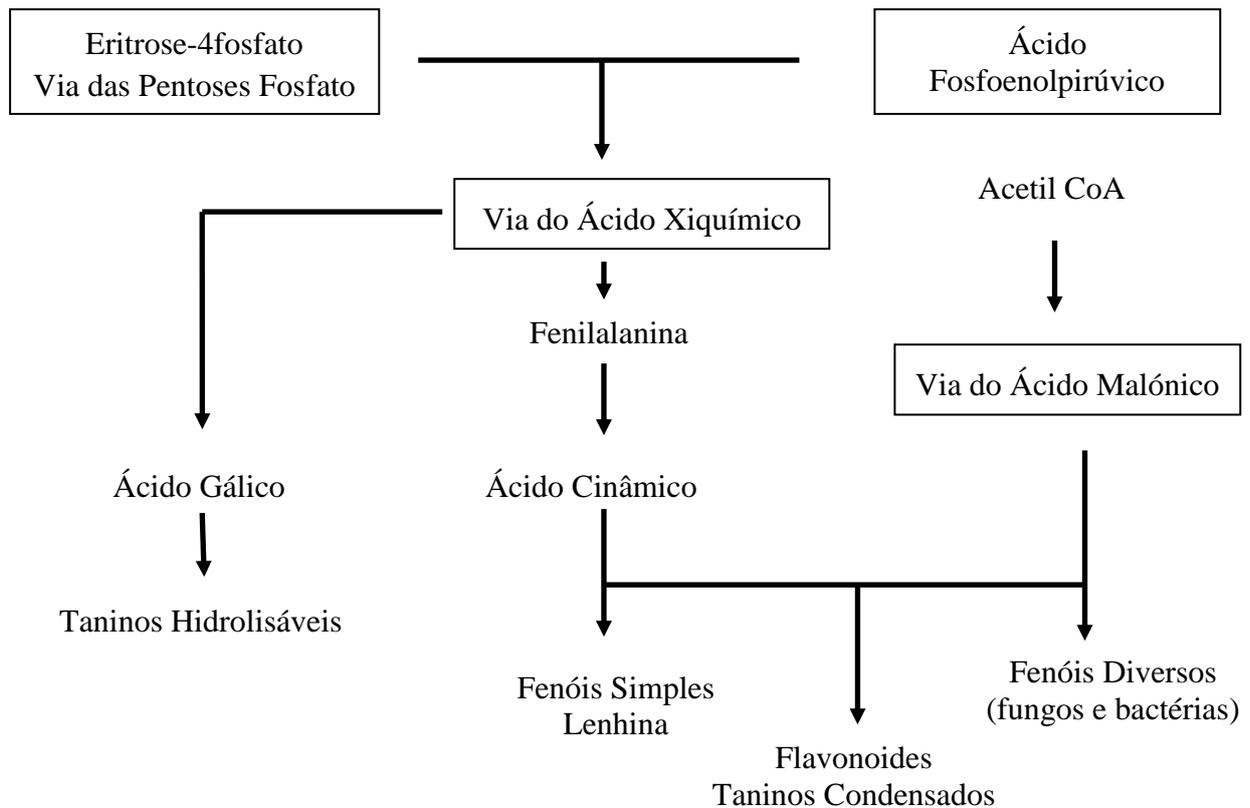


Figura 7 - Via de síntese dos compostos Fenólicos (Adaptado de García *et al.*, 2009)

A partir de eritrose-4-P e do ácido fosfoenolpirúvico inicia-se uma sequência de reações que conduzem à síntese de ácido xiquímico e derivados deste, nomeadamente aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) (Figura 7) (Taíz *et al.*, 2006; Zeiger, 2006; Damodaran *et al.*, 2008; García *et al.*, 2009; Dey *et al.*, 2012). A enzima fenilalanina amonio-liase (PAL) catalisa a formação do ácido cinâmico por eliminação de uma molécula de amónio da fenilalanina. Esta enzima atua portanto, entre o metabolismo primário e o metabolismo secundário, tornando-se então a reação que catalisa uma etapa reguladora muito importante na formação de muitos compostos fenólicos (Taíz *et al.*, 2006; Zeiger, 2006; García *et al.*, 2009).

Os compostos polifenólicos de fontes vegetais podem ser classificados em dois grupos: compostos flavonoides e compostos não-flavonoides, sendo que ambos são metabolitos secundários presentes em frutas e vegetais (Jaganath *et al.*, 2010).

I.5.1.1 Flavonoides

Os flavonoides estão amplamente distribuídos pelo reino Plantae, sendo os compostos com maior atividade antioxidante conhecida. Constituem o grupo mais extenso e de maior diversidade das substâncias fenólicas (Siegler, 1997; Zuanazzi, 2000; Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Matkowski, 2008; Landolino *et al.*, 2010).

Os flavonoides estão presentes em plantas, nos vegetais, em frutas e bebidas como o chá e vinho tinto, protegendo-os dos danos causados pelos agentes oxidantes, como por exemplo a radiação UV (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Landolino *et al.*, 2010; Costa, 2012), a poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, entre outros. Dado que o Homem não tem capacidade de produzir estas substâncias, tem que as ingerir através da alimentação (Siegler, 1997; Zuanazzi, 2000; Aherne *et al.*, 2002; Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Há inclusive certas espécies vegetais que desenvolveram flavonoides para inibir o crescimento de outras plantas competidoras (ação alelopática) (Landolino *et al.*, 2010).

A biodisponibilidade de flavonoides é fortemente influenciada pelo tipo de planta, pelas variações de crescimento, estação do ano, luz, grau de maturação e além destas, também a própria preparação de alimentos altera a sua concentração (Zuanazzi, 2000; Vermerris *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009). A sua estrutura molecular base (Figura 8) caracteriza-se por ter um esqueleto em C₆-C₃-C₆ (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Vermerris *et al.*, 2006; Lobo 2007; Matkowski, 2008); o arranjo do anel heterocíclico pirano em C₃ determina a classificação das diferentes classes de flavonoides (Vermerris *et al.*, 2006; Jaganath *et al.*, 2010; Sarma, 2011). A atividade dos flavonoides como antioxidantes depende das propriedades redox dos seus grupos hidroxifenólicos e a relação estrutural entre as diferentes partes da estrutura química. Podem exercer essa atividade de diferentes formas, capturando espécies reativas de oxigénio (ROS), transferindo átomos de hidrogénio, doando eletrões, prevenindo a formação de espécies reativas de oxigénio, ou através da quelação dos iões metálicos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Jaganath *et al.*, 2010; Sarma, 2011).

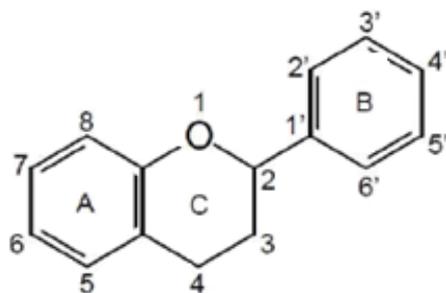


Figura 8 - Estrutura base dos flavonoides (Jaganath *et al.*, 2010)

Atuam como antioxidantes primários capturando ROS (Sarma, 2011). Esta propriedade está relacionada com a posição do grupo HO na estrutura da molécula atuando ao nível da cedência de elétrons ou de átomos de hidrogénio aos radicais livres (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Jaganath *et al.*, 2010).

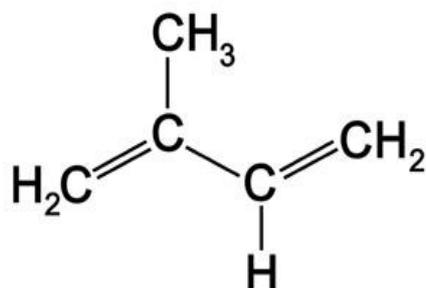
O crescente interesse pelos flavonoides deve-se à sua grande atividade farmacológica. Têm a capacidade de se unirem a polímeros biológicos como enzimas, transportadores de hormonas e molécula de DNA, fazer a quelatação com iões metálicos, tais como Fe^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , catalisar o transporte de elétrons. Possuem também ações antivirais e antialérgicas, assim como propriedades antitrombótica e anti-inflamatória (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2004; Unal *et al.*, 2008; Jaganath *et al.*, 2010; Sarma, 2011). Pertencem a este grupo um número alargado de famílias de entre os quais os flavanóis (catequina, epicatequina e epigallocatequina), os flavonóis (caempferol, quercetina e miricetina), as flavonas e as antocianinas, que diferem no seu padrão de oxidação (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Vermerris *et al.*, 2006; Jaganath *et al.*, 2010; Sarma, 2011).

I.5.1.2 Não Flavonoides

Os não-flavonoides englobam os ácidos fenólicos e os estilbenos; os ácidos fenólicos são classificados como derivados das estruturas químicas em $\text{C}_6\text{-C}_1$ específicas dos ácidos benzóicos e estruturas em $\text{C}_6\text{-C}_3$ específicas dos ácidos cinâmicos. Os ácidos benzóicos e cinâmicos encontram-se em frutos, na forma livre, e em baixas concentrações quando comparadas com as suas formas conjugadas. Estes ácidos aparecem numa variedade de produtos vegetais desde películas de uvas a cereais sobretudo sobre a forma de ésteres de ácido tartárico ou ligados a açúcares (Jaganath *et al.*, 2010).

I.5.2 Terpenoides

Os terpenos constituem o grupo mais numeroso de metabolitos secundários (Taíz *et al.*, 2006; Lobo *et al.*, 2007; García *et al.*, 2009), cujas estruturas derivam da união de 5 carbonos num esqueleto carbonado composto de várias unidades de isopreno (2-metilbutadieno) (Figura 9) (Lobo *et al.*, 2007).

Figura 9 - Estrutura do isopreno (Adaptado de Taíz *et al.*, 2006)

A via biossintética destes compostos dá lugar tanto a metabolitos primários como secundários de grande importância para o crescimento e sobrevivência das plantas (Taíz *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009).

Os terpenos são todos insolúveis em água e classificam-se em função do número de unidades de isoprenos (C5) (Figura 9) (Morrison *et al.*, 1996; Taíz *et al.*, 2006; Abreu *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2007; Proença da Cunha *et al.*, 2007; Matkowski, 2008; García *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Classificação dos terpenos

Grupo	Nº de Carbonos	Nº de Unidades de Isopreno
Hemiterpenos	5	1
Monoterpenos	10	2
Sesquiterpenos	15	3
Diterpenos	20	4
Sesterpenos	25	5
Triterpenos	30	6
Tetraterpenos	40	8
Politerpenos	5n	N

Nota: N - Mais de oito unidades de Isopreno

I.5.3 Alcaloides

Os alcaloides são produtos naturais que contêm azoto e não são nem aminoácidos, nem nucleótidos, nem cofatores. Estas últimas famílias de compostos, que são metabolitos primários, estão presentes em todas as espécies vivas, enquanto os alcaloides estão normalmente limitados ao reino das plantas superiores, apesar de alguns se encontrarem em plantas inferiores, microrganismos e algumas, poucas, espécies animais. Cada composto é específico de uma dada espécie, uma característica típica dos metabolitos secundários (Ferreira *et al.*, 2007).

Este grupo extenso e diverso de metabolitos pode classificar-se relativamente à sua origem biossintética: a maioria dos alcaloides deriva dos aminoácidos aromáticos como a fenilalanina ou a tirosina, ou do triptofano (Ferreira *et al.*, 2007).

Os alcaloides podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, contudo com mais frequência nos tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos laticíferos. Raramente se encontram em tecidos mortos (Henriques *et al.*, 2004). São sintetizados no retículo endoplasmático, armazenados posteriormente nos vacúolos, por isso as folhas mais jovens possuem pequenas quantidades destes compostos (Henriques *et al.*, 2004).

De uma maneira geral, os alcaloides são formados a partir de aminoácidos (alcaloides verdadeiros e protoalcaloides). Além dos aminoácidos, há outros precursores tais como os terpenos ou esteroides que podem ser incorporados na construção final dos alcaloides (pseudoalcaloides). Assim, a origem biogénica dos alcaloides não pode ser classificada apenas numa via metabólica, mas na combinação de produtos derivados de uma ou mais vias metabólicas distintas (Henriques *et al.*, 2004).

1) Alcaloides verdadeiros: são aqueles em que o átomo de azoto faz parte de um anel heterocíclico, a sua biossíntese ocorre de aminoácidos.

2) Protoalcaloides: são aminas simples em que o átomo de azoto não faz parte do anel heterocíclico, são produzidos a partir de aminoácidos.

3) Pseudoalcaloides: possuem um anel heterocíclico com N, mas não derivam de aminoácidos (Simões *et al.*, 2007; Knoller, 2015) (Figura 10).

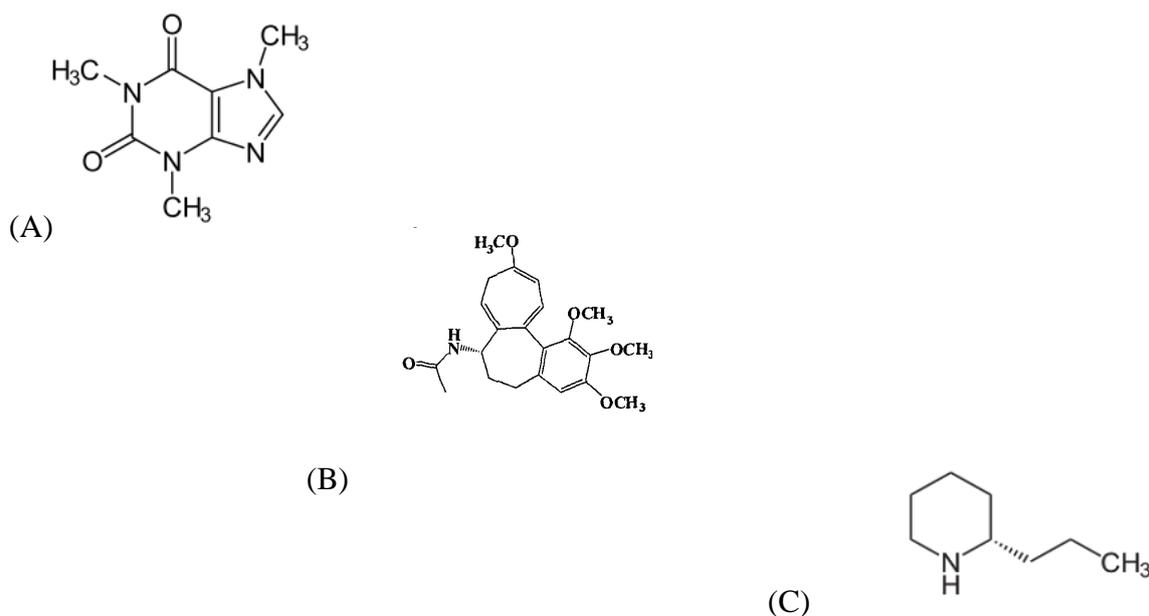


Figura 10 - Estrutura química alcaloide: (A) Alcaloide verdadeiro (cafeína); (B) Protoalcaloide (colchicina); (C) Pseudoalcaloide (coniina) (Adaptado de Gobbo-Neto *et al.*, 2007; Simões *et al.*, 2007; Knoller, 2015)

I.6 Composição Química de *Salvia officinalis* L.

Em relação aos componentes químicos, a família Lamiaceae desperta um grande interesse no estudo da sua composição química.

Relativamente à *Salvia officinalis* esta é caracterizada essencialmente pela sua composição fenólica (Hayouni *et al.*, 2008; Grzegorzczuk *et al.*, 2010; Daglia, 2012; Hamrouni-Sellami *et al.*, 2013; Roby *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2015) e terpénica (Hall *et al.*, 1997; Topçu *et al.*, 2007; Hayouni *et al.*, 2008; Grzegorzczuk *et al.*, 2010; Stagos *et al.*, 2012).

Os flavonoides, dentro dos compostos fenólicos são os encontrados em maior abundância (Lu e Foo, 1999, 2000, 2001).

Segundo muitos autores, que identificaram os compostos fenólicos em *S. officinalis*, verificaram que o ácido rosmarínico e a luteolina-7-*O*-glucósido (Figura 11) são os mais abundantes (Wang *et al.*, 1998; Lu e Foo, 1999, 2001; Santos-Gomes *et al.*, 2002; Shan *et al.*, 2005; Durling *et al.*, 2007; Grzegorzczuk *et al.*, 2007; Shan *et al.*, 2007; Matkowski, 2008; Christensen *et al.*, 2010; Roby *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2015).

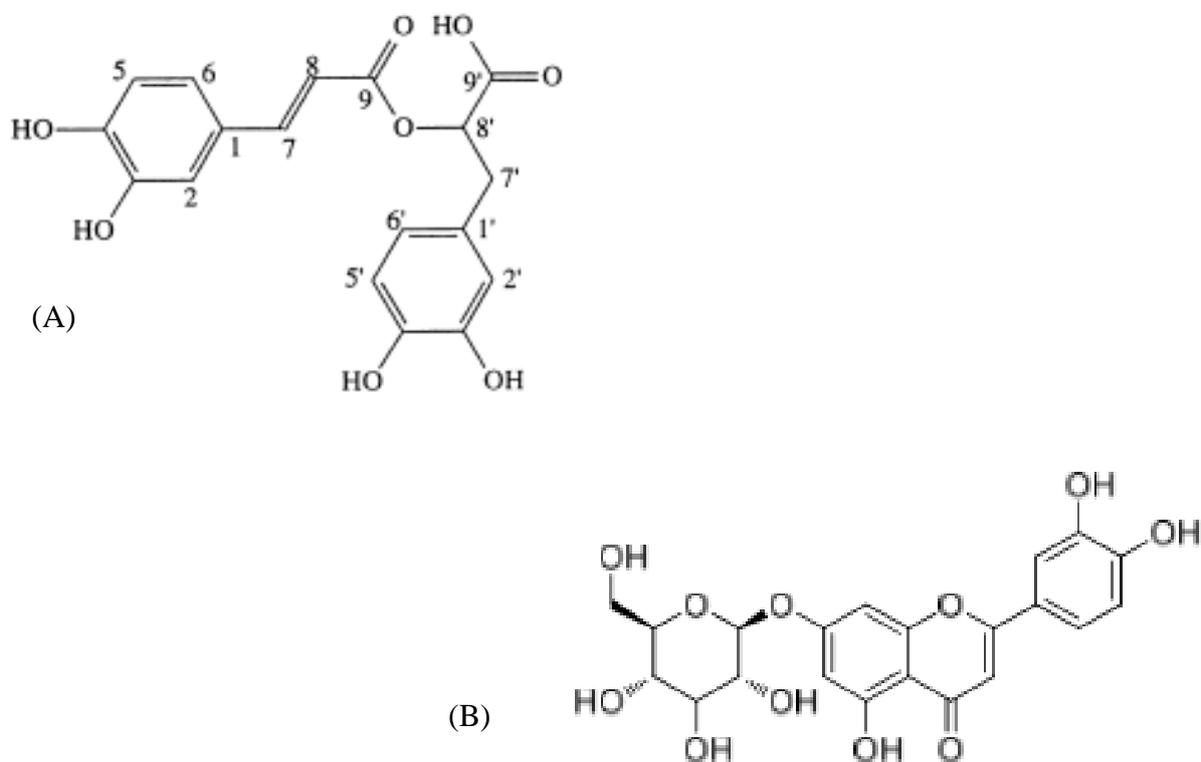


Figura 11 - Estrutura química dos compostos fenólicos em *S. officinalis* L. (A) Ácido Rosmarínico. (B) luteolina-7-*O*-glucósido (Adaptado de Lu e Foo, 1999, 2001)

I.7 Atividade Antioxidante

Existe um paradoxo à volta do oxigénio, o qual é indispensável à vida, mas ao mesmo tempo pode funcionar como substância tóxica para o organismo. No entanto, os organismos conseguem sobreviver à sua presença, devido à existência de um sistema de defesa antioxidante (Augusto, 2006).

Nos últimos anos, tem-se verificado cada vez mais, a importância dos radicais livres como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas a esse mesmo envelhecimento, como doenças oncológicas, cardiovasculares, cataratas, declínio do sistema imunológico, disfunções cerebrais, entre outros (Azzi *et al.*, 2004; Augusto, 2006).

Os compostos antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou mesmo inibir substancialmente a oxidação do substrato (Niki, 2010). Inibem, reduzem e reparam as lesões causadas pelos radicais livres nas moléculas orgânicas (Hall *et al.*, 1997).

Nos organismos, os radicais livres desempenham diversos papéis, como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto quando se encontram em excesso podem ser responsáveis por uma série de efeitos nocivos ao organismo. Os macrófagos e neutrófilos ativados convertem o oxigénio molecular em Espécies Reativas de Oxigénio (ERO) (ROS - do inglês Reactive Oxygen Species) e de azoto (ERA) (RNS - do inglês Reactive Nitrogen Species), agentes oxidativos reativos, encontrados em diversas situações fisiológicas de proteção, como durante a fagocitose, e atuam ao nível da destruição de células anómalas, ou prejudiciais para as biomoléculas (Halliwell e Whitemande, 2004; Gülçin *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2012). Apesar de este sistema minimizar os níveis de ROS, (espécies química que contém um ou mais eletrões desemparelhados, que atuam como aceitadores de eletrões de outras moléculas originando a sua oxidação, que quando ocorre ao nível da célula pode provocar a sua lise) não os conseguem eliminar na sua totalidade (Halliwell e Whiteman, 2004; Vermerris *et al.*, 2006; Gülçin *et al.*, 2007; Fraga *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010).

Os organismos vivos, normalmente, encontram-se numa situação de equilíbrio entre o pró-oxidante e antioxidante. Quando existe um desequilíbrio entre estes dois elementos, com vantagem para os oxidantes causadores dos danos, pode originar-se stresse oxidativo. Ocorre em todos os organismos expostos a ambientes oxigenados. Assim, todos os sistemas

biológicos desenvolveram estratégias antioxidantes, a fim de se protegerem dessa oxidação e de serem capazes de repor o equilíbrio inicial (Damodaran *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010). Este sistema de defesa produz substâncias antioxidantes, que também podem ser encontradas em baixas concentrações em diferentes alimentos usados no dia-a-dia (Halliwell e Whiteman, 2004).

Os antioxidantes podem ser divididos em enzimáticos e não enzimáticos (Bianchi *et al.*, 1999). Dentro dos enzimáticos a produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por compostos endógenos, enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), capaz de reduzir o $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , o qual é menos reativo (Whiteman, 2004; Vermerris *et al.*, 2006; Gülçin *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010) e tem a vantagem de ser degradado pela enzima catalase (CAT) ou glutatona peroxidase (GPx), mantendo assim, o equilíbrio redox celular (Chaillou *et al.*, 2006; Terao, 2010; Yu *et al.*, 2010; Jyotirekha, 2011). Os compostos exógenos desempenham o papel dos sistemas não enzimáticos, que são obtidos através da alimentação, como por exemplo as vitaminas, fenóis, carotenoides, selênio entre outros (Sousa *et al.*, 2007; Matkowski, 2008; Fraga *et al.*, 2010).

Em geral, os tecidos biológicos a partir dos quais os alimentos são obtidos contêm muitos sistemas antioxidantes endógenos. Esses alimentos têm vindo a despertar interesse pelo seu potencial efeito na prevenção do stresse oxidativo, causa primária de muitas lesões responsáveis por doenças graves (Damodaran *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010).

Os processos metabólicos aeróbicos, como, por exemplo, a respiração, é a principal fonte endógena de ROS, ocorre em diversas estruturas celulares, tais como as mitocôndrias, ou peroxissomas (Bianchi *et al.*, 1999; Augusto, 2006; Gülçin *et al.*, 2007; Damodaran *et al.*, 2008).

Essas ROS têm demonstrado capacidade para causar danos em diversas biomoléculas, como, por exemplo, proteínas, ácidos nucleicos (DNA) ou lípidos membranares. O excesso de produção de radicais de oxigênio, particularmente radicais hidroxilo, pode afetar os lípidos membranares, produzindo peróxidos lipídicos e ROS, que estão associadas ao envelhecimento e a várias doenças (Azzi *et al.*, 2004; Augusto, 2006; Gülçin *et al.*, 2007; Damodaran *et al.*, 2008; Fraga *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010).

O principal mecanismo de ação dos antioxidantes é capturar os radicais livres (ROS), e espécies reativas. Esses radicais incluem o anião superóxido (O_2^-), os radicais hidroxilo (HO^{\bullet}) o radical peroxilo (ROO^{\bullet}) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o

oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Halliwell e Whitemande, 2004; Vermerris *et al.*, 2006; Gülçin *et al.*, 2007) e azoto (RNS) (Shahidi, 1997).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição (Sousa *et al.*, 2007; Matkowski, 2008; Fraga *et al.*, 2010).

Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos, sendo estes considerados primários (Bianchi *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2007); os secundários reduzem a taxa de oxidação, reparam antioxidantes primários, são supressores de oxigênio *singleto* ($^1\text{O}_2$) e quelantes de íons metálicos, removem as lesões da molécula de DNA e reconstituem as membranas celulares danificadas (Bianchi *et al.*, 1999; Chaillou *et al.*, 2006). Estes antioxidantes inibem, previnem e retardam as consequências da exposição a estas substâncias (Halliwell e Whiteman, 2004; Gülçin *et al.*, 2007), pela remoção de radicais livres, inibindo a iniciação e a propagação (Damodaran *et al.*, 2008).

Com o crescente interesse pela utilização de compostos naturais, em substituição dos compostos sintéticos, no bem-estar Humano, têm sido publicados diversos estudos relativos aos compostos com atividade antioxidante, em especial com atividade farmacológica do género *Salvia*.

Segundo estudos efetuados por Hall *et al.* (1997) e Haida *et al.* (2011), os extratos de folhas de *Salvia officinallis* apresentaram alto teor de compostos fenólicos com atividade antioxidante, tendo mostrado elevada capacidade na captura de radicais livres. Estes resultados vieram comprovar a elevada atividade antioxidativa obtida por estudos efetuados por Masaki e seus colaboradores em 1995, através do método de ESR (*Eletron Spin Resonance*) em *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*. Comparando a capacidade antioxidante de *S. officinalis* e os antioxidantes comerciais, Pinheiro *et al.* (2012), verificaram que o extrato do género *Salvia* apresentava atividade superior quando analisado pelo método do β -caroteno/ácido linoleico.

I.8 Atividade Antimicrobiana

Nos últimos anos têm aumentado as infeções causadas por microrganismos oportunistas, especialmente as de origem hospitalar e alimentar (Cushnie *et al.*, 2014). A razão que mais vezes tem sido apontada está associada com o aumento de indivíduos com o

sistema imunitário comprometido ou deprimido como consequência do aumento da incidência de carcinomas e doenças que afetam a imunidade (e.g. *Sida*), ou ainda pelo aumento do número de pacientes transplantados (Silveira *et al.*, 2006; Winn *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012; Cushnie *et al.*, 2014).

O consumo cada vez mais alargado de alimentos processados e a sua produção em larga escala também fez aumentar a incidência de patologias associadas ao trato gastrointestinal, causadas por organismos de contaminação alimentar (Flores *et al.*, 2015).

A pesquisa de fármacos com atividade microbicida em relação aos agentes causadores de infeções alimentares e hospitalares, tem, nos últimos 20 anos, sido intensificada. Devido à utilização, por um lado generalizada e sem prescrição médica, de antibióticos, ou porque mesmo com prescrição, os doentes não cumprem as tomas indicadas, tem resultado no aparecimento de resistência a estes fármacos por parte de muitos microrganismos, inclusive dos ditos oportunistas (Winn *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012; Cushnie *et al.*, 2014).

Está já largamente descrito na bibliografia que numerosas plantas e seus extratos são usados desde a antiguidade para tratar sintomatologias diversas, que hoje sabemos, têm origem microbiana. Estes extratos possuem então bioatividade, com diferentes aplicabilidades, incluindo a atividade microbiana. Esta tem sido normalmente atribuída à presença nesses extratos, de frações com composição variada em substâncias fenólicas, simples ou com maior complexidade (Lamendin *et al.*, 2004; Cushnie *et al.*, 2014).

A extração de bioativos ou nutracêuticos a partir de plantas inteiras ou partes da mesma, e a avaliação da sua ação microbicida pode ser efetuada de formas relativamente simples e expeditas. A avaliação da inibição de crescimento microbiano por medição do halo de inibição em meios agarizados padrão, é simples, expedita e com elevada reproducibilidade, o que o torna ideal para rastreios iniciais quando ainda não está bem descrita essa atividade (Silveira *et al.*, 2006; Winn *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012; Cushnie *et al.*, 2014).

I.8.1 Focos de Infeções Mais Comuns

I.8.1.1 Infeções Hospitalares

Infeções hospitalares, ou nosocomiais, são consideradas como todas as infeções adquiridas ou transmitidas no espaço hospitalar (Castón-Osorio *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, a frequência das infeções fúngicas sistémicas tem vindo a aumentar de forma muito significativa, tanto em incidência como em gravidade, com mortalidade associada, tornando os fungos cada vez mais reconhecidos como importantes agentes

infeciosos (Lennette *et al.*, 1985; Guarro *et al.*, 1999; Hobson, 2003; Pigatto *et al.*, 2009; Klepser, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Oliveira Costa *et al.*, 2014).

A instalação da infecção por fungos depende da integridade da barreira física, do sistema fagocitário e da imunidade mediada por células. Perturbações que interfiram nestas barreiras favorecem a ocorrência de infecções fúngicas (Pigatto *et al.*, 2009). Podem ser classificadas como superficiais, quando afetam somente pele, cabelos, unhas ou mucosas e sistêmicas quando atingem regiões mais profundas do organismo (Pigatto *et al.*, 2009). Pacientes com doença oncológica e doenças hepáticas graves têm um risco agravado para estas infecções, principalmente das nosocomiais. Existe um grande número de fatores que contribuem para a maximização deste agravamento, tal como a utilização de imunossupressores, tratamentos agressivos como a quimioterapia, radioterapia, uso de esteroides e transplante de Células-Tronco Hematopoéticas (Guarro *et al.*, 1999; Pigatto *et al.*, 2009; Klepser, 2011; Oliveira Costa *et al.*, 2014).

A sua incidência tem aumentado devido à maior utilização de antibióticos de largo espectro, com o aumento dos imunossupressores corticosteroides e agentes antitumorais. A gravidade varia de benigna e localizada (seja transitória ou crônica) para disseminada ou mesmo fatal (Lennette *et al.*, 1985; Hobson, 2003; Pigatto *et al.*, 2009; Klepser, 2011; Cushnie *et al.*, 2014).

Dentre os fungos responsáveis por estas infecções destacam-se as espécies do género *Candida*. Este aumento pode estar relacionado com fatores endógenos e exógenos. A granulocitopenia é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de candidíases em pacientes com cancro. Danos na mucosa orofaríngea, causados pela utilização de drogas citostáticas, utilização indiscriminada de antibióticos de largo espectro, internamentos prolongados e cateterização dos pacientes são fatores que aumentam o risco de contrair infecções deste tipo (Verduyn Lunel *et al.*, 1999; Hobson, 2003; Pigatto *et al.*, 2009; Klepser, 2011).

Alguns estudos demonstraram um aumento de outras candidíases associadas a outras espécies do género *Candida*, nomeadamente e para além da *Candida albicans*, são de referir *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* (Verduyn Lunel *et al.*, 1999; Castón-Osorio *et al.*, 2008; Klepser, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Na bibliografia disponível têm sido reportadas incidências crescentes de infecções por *C. albicans* tanto nos Estados Unidos da América como na Europa (Verduyn Lunel *et al.*, 1999; Hobson, 2003; Castón-Osorio *et al.*, 2008).

Vários autores como Verduyn Lunel *et al.* (1999), Castón-Osorio *et al.* (2008) e Klepser (2011) têm correlacionado o aumento de patologias associadas a infecções por espécies dos géneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Scedosporium* com a profilaxia utilizada no combate às candidíases, em particular as que recorrem à prescrição de fluconazole e outros azoles, bem como a fungicidas de largo espectro (Lennette *et al.*, 1985; Hobson, 2003; Castón-Osorio *et al.*, 2008).

A resistência aos antibióticos é uma consequência natural do desenvolvimento e da capacidade que as populações bacterianas têm em adaptar-se. O uso indevido e indiscriminado de antibióticos aumenta a seletividade relativamente às populações microbianas, facilitando a aquisição de mecanismos de resistência (Pelczar *et al.*, 1981; Götz *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2006; DGS, 2014). Como consequência, as bactérias de gram-negativo multirresistentes têm vindo a aumentar globalmente (Oliveira Costa *et al.*, 2014).

O fenómeno referido no parágrafo anterior é inevitável e irreversível. O uso intenso de antibióticos na medicina, na produção de alimentos para animais, e na agricultura, tem causado um aumento na resistência a estes fármacos em todo mundo. Esta situação é um grave problema de saúde pública que, está cada vez mais, a ser alvo de preocupação e atenção da comunidade científica (Götz *et al.*, 2006; Rosini *et al.*, 2011). A nível mundial tem-se assistido a uma consciencialização para a adoção de novas práticas ao nível hospitalar, como o uso correto e eficaz das medidas de controlo da infeção hospitalar, lavagem das mãos, a consciencialização da importância e necessidade do uso prudente de antibióticos por forma a minimizar a emergência de bactérias resistentes (Götz *et al.*, 2006; Rosini *et al.*, 2011; Oliveira Costa *et al.*, 2014).

I.8.1.2 Infecções Alimentares

Nos últimos anos, as doenças de origem alimentar têm vindo a aumentar, como consequência do aumento de surtos infecciosos, colocando em alerta as autoridades sanitárias, sobre a necessidade de tomar medidas de controlo sanitário (Flores *et al.*, 2015).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, uma doença de origem alimentar, é uma patologia, geralmente de natureza infecciosa ou tóxica, provocada por agentes que entram no corpo através da ingestão de alimentos ou água (Flores *et al.*, 2015).

Todos os alimentos apresentam predisposição à deterioração com o tempo, o que pode acontecer como resultado da atividade de enzimas autolíticas intrínsecas aos alimentos ou à atividade de microrganismos contaminantes. Os alimentos podem sofrer contaminações em

todas as etapas de processamento até ao consumidor final. Estas contaminações são causadas por uma panóplia de microrganismos que muitas vezes produzem toxinas responsáveis pela instalação de intoxicações (Hayouni *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2015).

Dos microrganismos mais frequentemente encontrados nos alimentos destacam-se os coliformes termotolerantes, indicadores importantes do cumprimento de padrões de higiene na produção alimentar. São bactérias constituídas por bacilos de *gram*-negativo, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de sobreviver em compostos ativos de superfície, surfactantes. Neste grupo encontram-se várias espécies pertencentes aos géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Escherichia*, sendo *Escherichia coli* a espécie mais prevalente e que tem sido correlacionada com infeções gastrointestinais e septicémias dos recém-nascidos (Gellingk *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2015).

Staphylococcus aureus é outra espécie que surge associada aos alimentos e que tem sido correlacionada com altas taxas de mortalidade hospitalar devido ao seu elevado potencial infeccioso nos diferentes tecidos humanos e à grande variedade de estirpes resistentes aos antibióticos mais comumente usados em prescrições médicas. Esta espécie provoca intoxicações alimentares através da produção de enterotoxinas (Götz *et al.*, 2006; Todar, 2008a; Rosini *et al.*, 2011).

Os animais e o Homem são os reservatórios primários das espécies causadoras de infeções alimentares. A principal fonte de contaminação são os produtos de origem animal, como carnes, em especial as salsichas frescas e produtos lácteos, como os queijos (Flores *et al.*, 2015).

A espécie *Listeria monocytogenes* possui uma ampla variedade de hospedeiros que vão desde os animais domésticos aos selvagens. Apesar de não ser muito frequente uma infeção promovida por este agente patogénico, quando ocorre pode ser fatal para o Homem, principalmente se se desenvolver em indivíduos imunodeprimidos, em grávidas, crianças e/ou idosos (Lennette *et al.*, 1985; Winn *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2015). Esta espécie apresenta suscetibilidade aos antibióticos indicados para bactérias de *gram*-positivo, sendo os mais indicados a tetraciclina, rifampicina, cloranfenicol, eritromicina e ampicilina (Lennette *et al.*, 1985; Winn *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2015).

I.8.2 Microrganismos em Estudo - Domínio Eubactéria

Em 1977, Carl Woese, um microbiólogo norte-americano, baseado em diferenças filogenéticas significativas entre organismos procariontes e que por essa razão estavam todos

incluídos no Reino Monera, propôs a sua extinção e a divisão deste reino em Archaeobacteria (ou Arqueobactérias) e Eubacteria (ou Eubactérias) (Woese *et al.*, 1990; Jorge, 2012).

O sistema Woese foi baseado na análise filogenética do RNA ribossomal 16S, uma técnica pioneira no seu tempo. Utilizou estudos comparativos de células procarióticas e eucarióticas ao nível molecular e a sua relação evolutiva (Woese *et al.*, 1990; Jorge, 2012).

As bactérias (ditas verdadeiras - do Eu grego que tem este significado) são seres unicelulares, estruturalmente simples, de pequenas dimensões, mas possuem uma grande diversidade metabólica, embora não tenham quaisquer organelos. Podem ser fotoautotróficos, encontrando-se os pigmentos fotossintéticos nas membranas celulares. A parede celular é constituída por lípidos, proteínas e polissacarídeos. Adaptam-se a uma grande variedade de ambientes e reproduzem-se rapidamente quando encontram condições favoráveis (Winn *et al.*, 2006).

São classificadas em função da sua morfologia individual, em cocos, se apresentarem uma forma esférica, bacilos, se tiverem um formato de bastonete, espirilos, se forem helicoidais (Pelczar *et al.*, 1981; Lennette *et al.*, 1985; Winn *et al.*, 2006) e vibriões, se forem encurvados, em forma de arco ou de vírgula, com o flagelo numa das extremidades (Lennette *et al.*, 1985; Winn *et al.*, 2006).

Ainda que alguns dos indivíduos apresentem capacidade de produzir as moléculas necessárias para o seu crescimento, a maioria das eubactérias são heterotróficas, e como tal requerem alguma molécula orgânica como fonte de carbono e energia (Pelczar *et al.*, 1981).

I.8.2.1 *Staphylococcus aureus*

O género *Staphylococcus* pertence à família Micrococcae, é composto por 37 espécies, 17 das quais podem ser encontradas em amostras biológicas humanas (Götz *et al.*, 2006; Winn *et al.*, 2006).

A espécie *Staphylococcus aureus* (Figura 12) é uma bactéria esférica, imóvel do grupo dos cocos de gram-positivo, com diâmetro de 1µm distinguindo-se dos restantes *Staphylococcus* no teste da catalase, sendo classificados de coagulase negativa (Pelczar *et al.*, 1981; Götz *et al.*, 2006; Winn *et al.*, 2006). O seu crescimento é mais rápido e mais abundante em condições de aerobiose apesar de poderem ser anaerobióticos facultativos (Pelczar *et al.*, 1981; Lennette *et al.*, 1985; Götz *et al.*, 2006).

É um agente patogénico oportunista, mas comensal de humanos, encontrando-se frequentemente na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Pode em situações

específicas provocar patologias que vão desde uma simples infecção cutânea relativamente benigna, até formas mais graves, como doenças sistêmicas, potencialmente mortais, como pneumonia, meningite, miocardites, pericardites, abscessos, e septicemia entre outras. Do género *Staphylococcus*, esta espécie é a mais importante, pois encontra-se no meio ambiente externo e coloniza 20 a 40% das fossas nasais dos adultos. Podem também aparecer nas pregas cutâneas, períneo, axilas e vagina (Pelczar *et al.*, 1981; Lennette *et al.*, 1985; Götz *et al.*, 2006; Winn *et al.*, 2006; Todar, 2008a; Rosini *et al.*, 2011). Continua a ser uma das maiores causa de morte a nível mundial e responsável por variadíssimas infeções. É um dos principais causadores de infeções hospitalares (Götz *et al.*, 2006; Todar, 2008a; Rosini *et al.*, 2011).

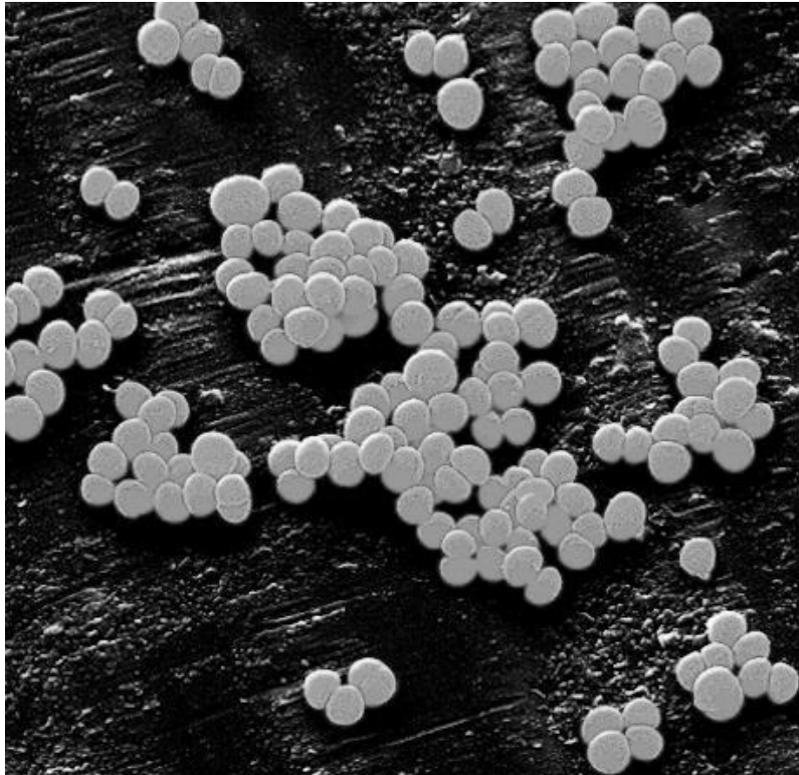


Figura 12 - *Staphylococcus aureus* (Todar, 2008a)

No primeiro contacto com este microrganismo, este adere à pele ou à mucosa, rompe as membranas das células epiteliais, comprometendo as ligações intercelulares (Pelczar *et al.*, 1981; Santos *et al.*, 2007) como desmossomas e junções de aderência, interferindo essencialmente no sistema de complemento, neutraliza a fagocitose e inibe as respostas imunes humoral e celular (Santos *et al.*, 2007).

O alto poder infeccioso de *S. aureus* não está restrito apenas à sua facilidade e multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também à produção de moléculas com grande poder patogénico, que incluem enzimas e toxinas (Santos *et al.*, 2007).

Esta bactéria foi das primeiras a serem controladas com penicilina, mas devido à sua grande capacidade adaptativa, tornou-se rapidamente resistente aos antibióticos, podendo permanecer viável por longos períodos de tempo. Atualmente mais de 80% das estirpes de *S. aureus* são resistentes à penicilina e outros antibióticos de uso corrente nas prescrições médicas (Pelczar *et al.*, 1981; Winn *et al.*, 2006; Todar, 2008a).

Esta estirpe cresce em meios de pH neutro, à temperatura de 37°C, o que constituem fatores de virulência importantes, quando se trata de infeções a animais homeotérmicos como o Homem (Winn *et al.*, 2006).

As colónias são arredondadas lisas e brilhantes. A coloração vai desde o acinzentado até amarelo ouro (Pelczar *et al.*, 1981; Winn *et al.*, 2006).

Os *Staphylococcus* situam-se entre os microrganismos não esporulados mais resistentes. *S. aureus* cresce na presença de altas concentrações de cloreto de sódio (10% a 15%) e resiste à ação de sais biliares (Pelczar *et al.*, 1981).

1.8.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia é um género grande e diversificado de bactérias. É um bacilo de gram-negativo (Figura 13), da família Enterobacteriaceae, género *Escherichia* (Pelczar *et al.*, 1981; Lennette *et al.*, 1985; Winn *et al.*, 2006; Todar, 2008b).

Possui forma de bastonete e vários flagelos periféricos. Encontra-se na flora intestinal do Homem, colonizando-o logo após o nascimento (Pelczar *et al.*, 1981; Todar, 2008b). Existem, no entanto estirpes que podem ser patogénicas e causar infeções e que são classificadas consoante os efeitos que promovem em enteropatogénicas, enterotoxigénicas, enteroinvasivas e hemorrágicas (Lennette *et al.*, 1985).

Geralmente a espécie *E. coli* comensal habita o intestino sem causar problemas de saúde (Pelczar *et al.*, 1981; Winn *et al.*, 2006). Quando libertadas para o meio ambiente podem ser um indicador de qualidade de água e alimentos, sendo considerados marcadores de água contaminada por detritos de origem fecal (Todar, 2008b).



Figura 13 - *Escherichia coli* (ampliação 1000×) (Todar, 2008b)

Fisiologicamente, *E. coli* é versátil e bem adaptada aos seus habitats habituais. Pode crescer em meios ricos em glicose como único constituinte orgânico, transformando metabolicamente a glicose em todos os compostos macromoleculares que compõem as suas células (Todar, 2008b).

A bactéria pode crescer na presença ou na ausência de O_2 . Sob condições anaeróbicas, como na flora intestinal, crescendo por fermentação, produz uma característica mistura de gases e de ácidos. No entanto, também pode crescer em ambientes oxigenados e em diferentes habitats ambientais uma vez que é capaz de utilizar NO_3 , NO_2 ou fumarato como aceitadores finais de elétrons para os processos de transporte de elétrons, adaptam-se a diferentes ambientes (Todar, 2008b).

A maioria das estirpes de *E. coli* é inofensiva, embora existam algumas patogênicas. Alguns tipos de *E. coli* podem causar diarreia, enquanto outras causam infecções do trato urinário, doenças respiratórias e pneumonia, entre outras doenças (Pelczar *et al.*, 1981; Winn *et al.*, 2006).

1.8.2.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um bacilo curto, de gram-positivo, catalase positivo (Figura 14), não esporulado, em forma de haste, móvel, anaeróbio facultativo, disposto em cadeias curtas e não formando cápsula (Pelczar *et al.*, 1981; Lennette *et al.*, 1985; Winn *et al.*, 2006; Todar, 2008c).

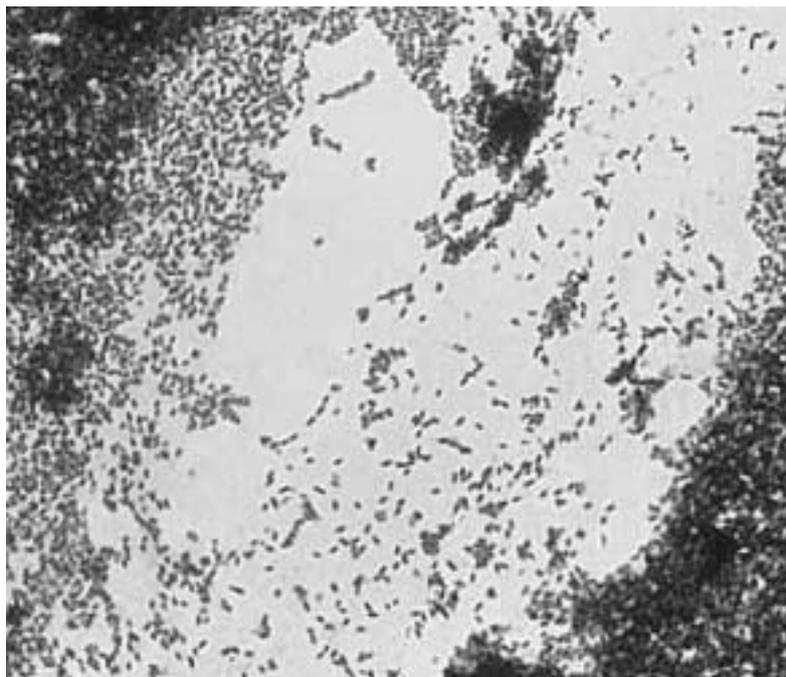


Figura 14 - *Listeria monocytogenes* (Todar, 2008c)

À temperatura ambiente apresentam mobilidade pois são flagelados, mas quando crescem a 37°C tornam-se imóveis. Este microrganismo cresce num amplo intervalo de temperaturas (4°C - 42°C) (Pelczar *et al.*, 1981; Winn *et al.*, 2006; Todar, 2008c) o que mais uma vez, e à semelhança das espécies de *S. aureus* contribui para a sua virulência.

Dentro das diferentes espécies existentes de *Listeria* somente *Listeria monocytogenes* é considerada patogénica para seres humanos causando uma patologia designada listeriose (Pelczar *et al.*, 1981; Lennette *et al.*, 1985; Winn *et al.*, 2006; Todar, 2008c).

Esta bactéria é um agente infeccioso intracelular oportunista, multiplicando-se dentro da célula hospedeira. É responsável por infeções gastro-intestinais bacterianas, afetando principalmente recém-nascidos, mulheres grávidas e adultos com sistema imunitário debilitado (Winn *et al.*, 2006; Todar, 2008c).

Este microrganismo pode ser encontrado no solo, águas residuais, plantas e fezes dos animais, mas a maior fonte de contaminação são os produtos alimentares (Lennette *et al.*, 1985; Winn *et al.*, 2006), crescendo nestes locais através da formação de biofilmes. Os alimentos contaminados, quando refrigerados, permitem o aumento da população de *Listeria*, dado que esta espécie se desenvolve a baixas temperaturas (cerca de 4°C), podendo permanecer estável durante semanas (Lennette *et al.*, 1985; Winn *et al.*, 2006). Os principais hospedeiros deste agente infeccioso são os animais (vacas, ovelhas, porcos, coelhos e aves) (Pelczar *et al.*, 1981; Lennette *et al.*, 1985; Winn *et al.*, 2006) e algumas plantas. A infeção

faz-se por contacto direto com o organismo infetado, através da placenta ou no parto quando a mãe está infetada, no entanto o mecanismo de transmissão mais usual é através da alimentação. Além desta, também o consumo de água contaminada com substâncias fecais de animais contaminados é também uma via comum de infeção. Cerca de 5% dos seres humanos podem ser portadores de *Listeria monocytogenes* sem que no entanto mostrem sinais de alguma patologia (Lennette *et al.*, 1985; Winn *et al.*, 2006; Todar, 2008c).

Este microrganismo é sensível à penicilina, ampicilina aminoglicósidos, eritromicina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol e imipenem (Winn *et al.*, 2006).

I.8.3 Microrganismos em Estudo - Género *Candida*

Estima-se hoje que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos (Mehrotra *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006). São organismos ubíquos em numerosos habitats (Lennette *et al.*, 1985; Mehrotra *et al.*, 2005), podendo encontrar-se na água, em solos húmidos e nos compostos orgânicos (Lennette *et al.*, 1985; Mehrotra *et al.*, 2005). Podem ainda aparecer em plantas e animais como parasitas ou simbioses (Mehrotra *et al.*, 2005).

A complexidade das células deste grupo é elevada e os tipos celulares variam desde uma célula microscópica até extensos micélios (Pelczar *et al.*, 1981). São seres eucariontes portadores de esporos podendo reproduzir-se sexuada e assexuadamente (Pelczar *et al.*, 1980; Sharma, 1989; Mehrotra *et al.*, 2005).

As leveduras são o exemplo típico dos fungos constituídos por uma única célula-fungos unicelulares. A maior parte das leveduras possuem cápsulas com composição polissacarídica, incluindo heteropolissacarídeos e substâncias semelhantes ao amido (Pelczar *et al.*, 1980). A parede celular é constituída por quitina ou celulose ou a associação de ambas com outros polissacarídeos complexos. Esta constituição confere-lhes uma maior resistência às agressões do meio nos ecossistemas (Pelczar *et al.*, 1980; Sharma, 1989; Mehrotra *et al.*, 2005).

A sua reprodução pode ser sexuada ou assexuada (Pelczar *et al.*, 1981). Assexuadamente pode ocorrer esporulação, gemulação ou fissão, sendo mais comum a gemulação (Pelczar *et al.*, 1980; Lennette *et al.*, 1985).

As leveduras são apontadas como causadoras de numerosas patologias em seres humanos. Devido a este facto, tem havido um esforço de colaboração cada vez maior entre médicos e laboratórios, para se avaliar o papel etiológico da levedura em meio clínico (Lennette *et al.*, 1985).

Das cerca de 100 mil espécies de fungos conhecidos, algumas são agentes etiológicos de numerosas patologias. Uma boa parte destas espécies potencialmente patogénicas são eliminadas pelos cuidados de higiene diários ou pelo nosso sistema primário de defesa, a pele e tecidos subcutâneos. Clinicamente, qualquer fungo que se desenvolva e consiga reproduzir-se a 37°C ou a temperaturas mais altas é considerado patogénico (Lennette *et al.*, 1985).

As primeiras observações microscópicas de leveduras do género *Candida* foram feitas por Leeuwenhoek por volta de 1680, porém a primeira descrição associando as leveduras à incidência de patologias foi feita por Lagenbeck em 1839, que descreveu a lesão bucal causada num paciente com tifo e a associou a uma levedura (Jorge, 2012).

As leveduras do género *Candida* são microrganismos comensais comumente encontrados nas mucosas bucais, vaginais, e do trato gastrointestinal do homem e dos animais. Em presença de fatores predisponentes, podem transformar-se da forma comensal para a patogénica causando infeções que são denominadas candidíases (Verduyn Lunel *et al.*, 1999; Jorge, 2012; Silva *et al.*, 2012).

Este género é muito heterogéneo, sendo formado por um grande número de espécies, (\approx 200 espécies) das quais só cerca de 10% são reconhecidas como agentes infecciosos. Destas, cerca de 90% das infeções são causadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (Guarro *et al.*, 1999; Verduyn Lunel *et al.*, 1999).

O género *Candida* apresenta morfologia diversificada, são geralmente pequenas, ovoides, e possuem uma parede celular espessa (Kurtzman *et al.*, 2011, Jorge, 2012). Produzem abundantes pseudomicélios, podendo haver lugar à formação de verdadeiros micélios e clamidósporos. Os blastósporos podem estar presentes em posições típicas de cada espécie. A reprodução vegetativa faz-se por gemulação multilateral (Pelczar *et al.*, 1981; Kurtzman *et al.*, 2011). O metabolismo pode ser oxidativo, mas, em algumas espécies, é fortemente fermentativo. Quando crescem em meios líquidos formam-se sedimentos, frequentemente anel e uma película (Pelczar *et al.*, 1981). A temperatura de incubação parece ter uma influência importante na morfogénese das diversas espécies de *Candida* (Jorge, 2012).

I.8.3.1 *Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923)

A espécie *Candida albicans* é a mais estudada dos microrganismos do género *Candida* (Verduyn Lunel *et al.*, 1999; Kurtzman *et al.*, 2000; Hobson, 2003). Entre os fungos *Candida* sp. é o género predominante na flora microbiana humana, sendo *Candida albicans* a espécie mais frequente do aparelho digestivo, com uma percentagem de incidência que varia entre 20 a 40% nos indivíduos assintomáticos para a candidíase (Lennette *et al.*, 1985; Guarro *et al.*, 1999; Hobson, 2003; Kurtzman *et al.*, 2011).

Em particular *C. albicans* é patogénica oportunista (Lennette *et al.*, 1985; Verduyn Lunel *et al.*, 1999; Kurtzman *et al.*, 2000; Kurtzman *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012) frequentemente isolada da superfície das mucosas dos indivíduos. Pode encontrar-se na flora normal da boca, garganta, intestino grosso, vagina e pele. Está muito bem adaptada ao corpo humano, por isso pode colonizá-lo sem produzir sinais de doença em condições de normalidade fisiológica. Em condições de fraqueza local ou sistémica, que ocorre em pacientes com sistema imunitário deprimido por alguma patologia, ou ainda promovida por efeitos secundários de fármacos para tratar qualquer distúrbio de saúde, podem invadir os tecidos provocando infeções graves (Lennette *et al.*, 1985; Verduyn Lunel *et al.*, 1999; Kurtzman *et al.*, 2011) designadas de candidíases (Verduyn Lunel *et al.*, 1999; Kurtzman *et al.*, 2011). A incidência deste tipo de doença tem vindo a aumentar nestas últimas décadas, pois tem aumentado também o recurso a novas terapias farmacológicas, que debilitam o sistema imunitário, para além de que a taxa de doentes infetados com HIV continua a aumentar a nível mundial (Verduyn Lunel *et al.*, 1999; Hobson, 2003; Kurtzman *et al.*, 2011).

C. albicans pode apresentar-se em diferentes morfologias (Figura 15) de acordo com as condições ambientais, incluindo células leveduriformes, pseudo-hifas, hifas verdadeiras e clamidoconídeos (Guarro *et al.*, 1999; Kurtzman *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012). Microscopicamente, as células leveduriformes são globosas, ovoides curtas ou alongadas com parede fina e sem cápsula. Medem entre $(2,9-7,2) \times (2,9-14,4)$ μm de diâmetro, apresentando gemulação multilateral segundo Jorge (2012) e $(3,5-6,0) \times (4,0-8,0)$ μm segundo Kurtzman *et al.* (2011) e Silva *et al.* (2012). Gemulações sucessivas com alongamento dos blastoconídeos individuais conduzem à formação das pseudo-hifas (Barnett *et al.*, 2000; Kurtzman *et al.*, 2000; Kurtzman *et al.*, 2011; Jorge, 2012). As hifas verdadeiras derivam dos tubos germinativos e caracterizam-se por possuir paredes paralelas desde o seu ponto de origem no blastoconídeo, ou seja, não existe constrição na junção com a célula mãe (Kurtzman *et al.*, 2011; Jorge, 2012).

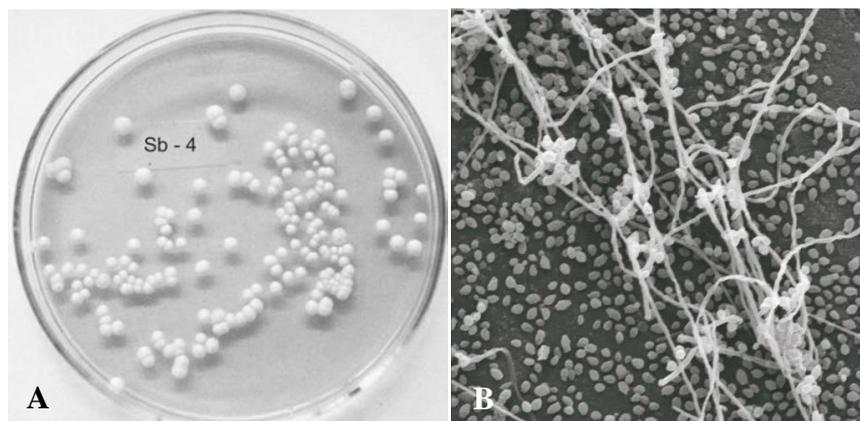


Figura 15 - (A) Crescimento de leveduras da espécie *Candida albicans* em agar Sabourad dextrose. Observam-se colônias circulares, cremosas e brilhantes. (B) Biofilme de *Candida albicans* formada *in vitro* observado em microscopia eletrônica de varrimento (MEV). Observa-se a presença do fungo em forma de leveduras e hifas. (Adaptado de Jorge, 2012)

A parede celular é uma estrutura complexa constituída maioritariamente por polissacarídeos (80-90%) peso/peso), apresentando também proteínas (3 a 6%) e lípidos (2%) (Jorge, 2012). A estrutura de resistência no processo de esporulação recebe a designação de clamidospóros. Esta estrutura é muitas vezes utilizada como meio de diagnóstico para diferenciar espécies (Kurtzman *et al.*, 2011).

A temperatura parece ter uma influência importante na morfogênese de diversas espécies de *Candida*. Temperaturas à volta dos 25°C primariamente promovem a formação de clamidoconídeos, enquanto que a temperaturas próximas dos 33°C, o crescimento em forma leveduriforme é favorecido. Em temperaturas mais elevadas, tais como as presentes em hospedeiros potenciais (37°C a 43°C) e pH próximo da neutralidade o crescimento micelial é favorecido e a transformação da célula leveduriforme para a hifal ocorre pela formação do tubo germinativo (Barnett *et al.*, 2000; Kurtzman *et al.*, 2011; Jorge, 2012; Silva *et al.*, 2012).

1.8.3.2 *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice (1932)

Candida parapsilosis é um fungo comensal que aparece habitualmente na pele das mãos (Lin C-C *et al.*, 2014). Esta levedura é a causa mais comum da candidíase nos recém-nascidos. Em meio de cultura *C. parapsilosis* produz longas ramificações de pseudo-hifas (Figura 16). Contudo o grau de formação de pseudo-hifas varia com a estirpe (Kurtzman *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Lin C-C *et al.*, 2014). No meio de cultura CHROMagar *C. parapsilosis* apresenta colorações que variam de marfim a rosa e lavanda. Até à data não há referencias a nenhuma fase teleomórfica (Kurtzman *et al.*, 2011). Microscopicamente as células são ovoides (3,0-4,0) × (5,0-8,0) µm de diâmetro, surgindo simples ou aos pares. Podem também apresentar-se sob a forma de células cilíndricas até 20 µm de comprimento

(Kurtzman *et al.*, 2000). Não possui reprodução sexuada conhecida, e emite pseudo-hifas simples (Barnett *et al.*, 2000).

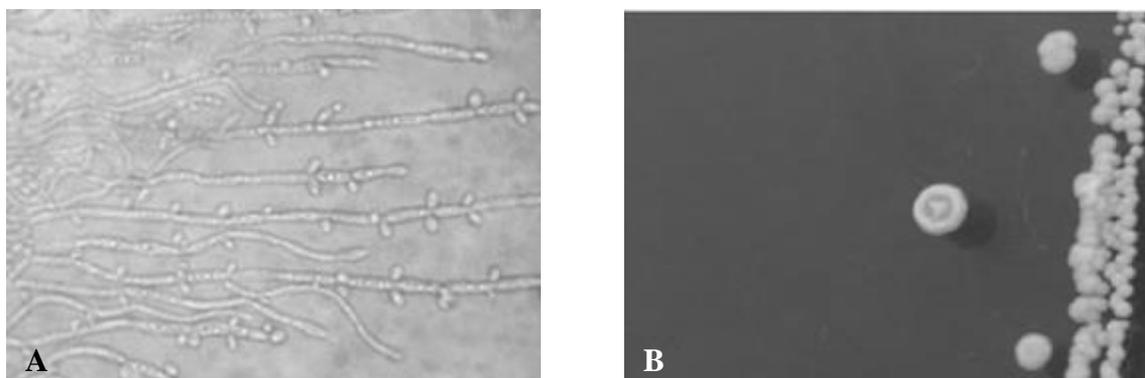


Figura 16 - *Candida parapsilosis* (A) colônias macroscópicas em meio Cornmeal Tween 80. (B) estrutura microscópica em SDA (Sabouraud Dextrose Agar) (Silva *et al.*, 2012)

Os fatores de risco que aceleram o desenvolvimento de *C. parapsilosis* na corrente sanguínea estão relacionados com o uso prolongado de cateteres, casos em que ocorre alimentação intravenosa, cirurgias gastrointestinais, condições de imunodeficiência, quimioterapia, utilização de imunossupressores em pacientes transplantados, tratamento com antibióticos ou tratamentos com fármacos antifúngicos (Pigatto *et al.*, 2009; Klepser, 2011; Lin C-C *et al.*, 2014; Oliveira Costa *et al.*, 2014). O risco de mortalidade aumenta quando o paciente possui altos níveis de metástases tumorais ou outra doença maligna. A melhoria dos cuidados de higiene, como a lavagem das mãos é uma prática que apresenta correlação significativa com a diminuição dos surtos oportunistas causados por *C. parapsilosis* (Lin C-C *et al.*, 2014).

Considerando a gama de antifúngicos disponíveis para o tratamento de candidíases o fluconazole parece ser o mais eficiente para a eliminação deste agente infeccioso (Lin C-C *et al.*, 2014), ainda que a sua resistência a este tipo de fármacos tenha vindo a aumentar (Klepser, 2011).

I.8.3.3 *Candida oleophila* Montrocher (1967)

Candida oleophila é um fungo epifítico antagonista microbiano, que protege uma variedade de produtos frescos nos processos de pós-colheita, de um variado número de agentes patogênicos (Droby *et al.*, 2002; Gamagae *et al.*, 2003; Lassois *et al.*, 2008). Atualmente são conhecidos quatro microrganismos antagonistas com ação semelhante à que é atribuída a esta espécie, nomeadamente duas leveduras, *Candida oleophila* e *Cryptococcus albidus* e duas estirpes de bactérias da espécie *Pseudomonas seryngae* (Droby *et al.*, 2002; Lassois *et al.*, 2008).

A capacidade de biocontrolo de *Candida oleophila* está relacionada com a sua capacidade de colonizar rapidamente a superfície dos frutos, e a sua aptidão de crescimento acelerado em lesões, competindo assim pelo espaço e nutrientes com o agente infeccioso (Droby *et al.*, 2002). Pensa-se que este fator será o principal responsável da ação antagonista deste fungo. No entanto, para além de competir pelos nutrientes e espaço, este fungo antagonista, parasita os agentes infecciosos pós-colheita, através da propagação das suas hifas na parede celular do agente infeccioso, degradando-a (micoparasitismo), podendo também induzir uma resposta bioquímica na superfície das lesões (Droby *et al.*, 2002; Saligkarias *et al.*, 2002; Lassois *et al.*, 2008).

Morfologicamente, esta espécie apresenta algumas células esferoidais, mas a maior parte encontra-se sob a forma ovoide ou alongada (2,9-4,3)×(4,3-6,5) µm. As células cilíndricas (1,5-3,6)×(4,3-9,4) µm podem apresentar-se ligeiramente curvadas. Podem aparecer isoladamente ou em colónias (Kurtzman *et al.*, 2011). Apresentam reprodução vegetativa formando pseudo-hifas que poderão ter verticilos ou blastoconídios ovoides (Kurtzman *et al.*, 2011). Não possui reprodução sexuada conhecida (Barnett *et al.*, 2000; Kurtzman *et al.*, 2011).

I.8.4 Desenvolvimento de Resistência a Antibióticos e Antifúngicos

A crescente taxa de resistência dos microrganismos, associada ao decréscimo da síntese e desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos leva a que o antibiótico, menos de cem anos após a descoberta da penicilina, e após ter contribuído para um marcado aumento da esperança de vida média, esteja em "risco de extinção", isto é em risco de perda de eficácia. Atualmente, Portugal ocupa o 9º lugar entre os países com maior consumo antimicrobiano na Europa. A taxa de infeção hospitalar em Portugal é mais elevada do que a média europeia (DGS, 2014).

A comunidade científica definiu um grupo de microrganismos que constitui particular preocupação em termos de aquisição de resistência a antimicrobianos, designando-o pelo acrónimo ESKAPE, que corresponde às iniciais dos seguintes microrganismos: *Enterococcus* resistente à vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Klebsiella* produtora de betalactamases de espectro alargado, *Acinetobacter* resistente ao imipeneme, *Pseudomonas* resistente ao imipeneme e *Enterobacter* resistente às cefalosporinas de terceira geração, mais tarde o *Clostridium difficile* foi também integrado neste grupo (DGS, 2014).

Portugal apresenta um dos níveis mais elevados da Europa em termos de resistência de *Staphylococcus aureus* à meticilina. Este valor foi crescente entre 2003 a 2011, no entanto nos anos 2012 e 2013 verificou-se uma ligeira diminuição. Relativamente à *E. coli*, em Portugal aumentou, entre 2001 e 2012, de 18% para 30% a resistência às quinolonas. Estudos de prevalência de infeções adquiridas em ambiente hospitalar e de uso de antibióticos em hospitais portugueses, realizado em 2012, indicam taxas de resistência a carbopenemes de 2% (DGS, 2014).

Nas duas últimas décadas a pesquisa de novos compostos bioativos a partir de produtos naturais tem sido estimulada, pois cada vez mais, a resistência aos antibióticos está a tornar-se um problema complexo para a medicina mundial. Esta resistência está relacionada com o uso inadequado dos fármacos com ação bactericida pela população em geral, o que permitiu aos microrganismos desenvolverem adaptações genéticas ou ambientais favoráveis (Silveira *et al.*, 2006; Winn *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Cushnie *et al.*, 2014).

Perante este facto a procura de substâncias naturais, biologicamente ativas, tem sido encorajada, e entre outras atividades biológicas, a pesquisa de substâncias com atividade antimicrobiana deve ser estimulada. Estas moléculas naturais podem aliar o seu papel de condimento alimentar a outras características vantajosas como o facto de serem produtos naturais e biodegradáveis, apresentarem baixa toxicidade para os mamíferos, poderem desempenhar, simultaneamente, as funções de mais do que um dos seus equivalentes sintéticos (Figueiredo *et al.*, 2007; Teles *et al.*, 2014) e/ou sinergismo, ou seja quando combinadas duas substâncias, a soma do seu efeito é superior à soma dos efeitos em separado, o que pode ser benéfico ou prejudicial, podendo inibir, intensificar ou mesmo não interferir na eliminação do microrganismo (Cuenca-Estrella, 2004, Teles *et al.*, 2014).

A resistência aos fármacos antifúngicos tem sido um desafio no tratamento de infeções hospitalares. Alguns fungos patogénicos apresentam uma resistência inata ou reduzem a sua suscetibilidade aos fármacos e tratamentos o que é normalmente designado de resistência adquirida (Barry *et al.*, 2002; Klepser, 2011; Zhang *et al.*, 2013).

Dentre os diferentes mecanismos de resistência descritos para microrganismos, os mais importantes em bactérias de *gram*-positivo podem ser classificados em 3 grupos distintos: destruição do antibiótico promovida por enzimas sintetizadas pelos microrganismos e que catalisam a degradação do antibiótico ou modificam os seus grupos funcionais, criando funções inativas para o reconhecimento molecular (Ghannoum *et al.*, 1999; Silveira *et al.*,

2006; Klepser, 2011), efluxo contínuo do antibiótico, isto é, genes mutantes superexpressam proteínas transportadoras de membrana responsáveis pela entrada e saída de substâncias do meio citoplasmático, fazendo com que a retirada do antibiótico para o meio extracelular seja mais rápida que a sua difusão pela membrana bacteriana, mantendo uma concentração insuficiente para atuar como bloqueador de funções celulares (Ghannoum *et al.*, 1999; Silveira *et al.*, 2006; Klepser, 2011) e ainda reprogramação e modificação da estrutura-alvo do antibiótico, como ribossomas, proteínas e constituintes da parede celular que são estruturalmente modificados a partir de genes que os expressam, afetando o reconhecimento do fármaco pelo alvo e diminuindo a sua potência (Silveira *et al.*, 2006).

Os antifúngicos de uso mais comum podem ser agrupados em quatro conjuntos farmacológicos de acordo com o seu modo de ação: polienos (*e.g.* anfotericina B) que atua e promove alterações na membrana do fungo (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006), os azoles (imidazóis e triazóis), os quais inibem a síntese do ergosterol, constituinte da membrana celular fúngica (fluconazole, voriconazole e posaconazole), os análogos da pirimidinas que atuam por inibição da síntese de DNA e RNA (5-fluorocitosina) (Lamb *et al.*, 1999), e por último as equinocandinas que inibem a síntese do 1,3- β -D-glucano, principal constituinte da parede celular dos fungos (caspofungina, anidulafungina e micafungina) (Pigatto *et al.*, 2009, Klepser, 2011).

Os polienos foram os primeiros antifúngicos desenvolvidos e utilizados contra as infecções fúngicas. O uso da anfotericina B, um antifúngico sistêmico, é o mais eficaz do mercado, no entanto o uso deste fármaco é limitado, pois apresenta toxicidade para o organismo humano, para além de ter uma administração difícil, via intravenosa. Apesar do aumento dos antifúngicos disponíveis para tratamento, a resistência que pode advir da sua utilização continua a ser um problema (Ghannoum *et al.*, 1999; Verduyn Lunel *et al.*, 1999; Bal, 2010; Klepser, 2011).

Os azoles são geralmente bem tolerados, podendo no entanto, promover o aparecimento de distúrbios da visão, fototoxicidade cutânea (Klepser, 2011) e o mais grave, serem hepatotóxicos ou provocarem nefrotoxicidade (Lamb *et al.*, 1999; Pigatto *et al.*, 2009; Klepser, 2011). Muitas reações têm sido descritas como efeitos secundários da sua aplicação como febre, calafrios, hipotensão, anorexias, náuseas, vômitos, enxaquecas e taquipneia. O fluconazole é o fármaco pertencente a este grupo cuja aplicação como antifúngico está mais difundida, sendo muito utilizado em doenças renais, candidíases crônicas, recipientes de transporte de órgãos para transplante e pacientes hematologicamente deprimidos. Dada a sua

utilização intensa o desenvolvimento de resistência a este antifúngico tem-se intensificado (Verduyn Lunel *et al.*, 1999; Klepser, 2011).

As equinocandinas são antifúngicos recentes de baixa toxicidade (Pigatto *et al.*, 2009, Klepser, 2011) que no entanto apresentam menor atividade antimicrobiana nomeadamente contra espécies como *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (Bal, 2010), *Cryptococcus neoformans*, espécies de *Fusarium* e *Scedosporium*, como também contra Zigomycetes (Klepser, 2011).

O género *Candida* é, dos fungos causadores de infeções nosocomiais, o que se desenvolve e difunde mais rapidamente, e que mais tem surgido como promotor de infeções hospitalares, sendo normalmente combatido com recurso a azoles. Como já foi referido, a sua aplicabilidade está limitada por problemas relacionados com a segurança do fármaco, existindo muitos relatos sobre a sua hepatotoxicidade e aumento de resistência. Mesmo assim, dada a sua eficácia na inibição da síntese do ergosterol, componente fundamental da membrana celular dos fungos, os azóis são dos fármacos mais utilizados no tratamento de candidíases. Dada a resistência que se tem vindo a desenvolver pelos microrganismos, principalmente os filamentosos, e considerando ainda a sua elevada hepatotoxicidade, a procura de outras substâncias com resultados igualmente eficazes tem aumentado, apresentando-se como uma alternativa viável os compostos provenientes de plantas (Lamb *et al.*, 1999; Odds *et al.*, 2003; Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006; Klepser, 2011).

I.8.5 Extratos de Plantas Usados como Medicamentos

As plantas têm na sua composição moléculas muito variadas, como resultado do metabolismo primário, mas fundamentalmente, pelo menos no que se refere à diversidade, resultantes do metabolismo secundário, muitas das vezes como resposta a situações de stresse ambiental (Taíz *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009). Muitas destas substâncias naturais são extraídas das plantas sob a forma de extratos mais ou menos complexos. Mais raramente, as substâncias isoladas são utilizadas na síntese ou semissíntese de outros compostos. Muitas vezes um mesmo princípio ativo pode ser extraído de diferentes plantas. A escolha é feita, tendo em mente, entre outros, o ciclo de vida da planta, o rendimento de extração, a natureza dos compostos, o custo da planta, o custo de manutenção e ausência de compostos tóxicos (Figueiredo *et al.*, 2007).

Salvia officinalis L. tem aparecido na longa lista de plantas medicinais como espasmolítica, antissética e adstringente. Alguns dos compostos fenólicos desta espécie

apresentam uma excelente atividade antimicrobiana tal como uma elevada atividade antioxidante. Consequentemente os extratos correspondentes têm sido largamente utilizados na estabilização alimentar (Hayouni *et al.*, 2008; Topçu *et al.*, 2008; Daglia, 2012; Martins *et al.*, 2015).

Dentro do grupo dos polifenóis, os flavanóis, flavonóis e taninos são os que possuem atividade antimicrobiana mais elevada (Daglia, 2012). Atuam inibindo a formação de biofilmes, reduzindo a capacidade de aderência do microrganismo e neutralizando as toxinas microbianas. Entre outros microrganismos, os flavanóis inibem o crescimento de *Escherichia coli*, e outros flavonóis possuem atividade antimicrobiana contra muitas bactérias de gram-positivo como o *Staphylococcus aureus* e bactérias de gram-negativo. Já para os taninos foi descrita atividade contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. mutans*, como reflete o estudo efetuado por Daglia (2011) no género *Rubus* e *Fragaria*. Estudos *in vitro* efetuados por Topçu e colaboradores (2008) e por Baravecic e colegas (2008), mostraram que os terpenos de *S. officinalis* têm funções anti-inflamatórias, antiproliferativas e neuroprotetora. Topçu e seus assistentes (2008), verificaram ainda que os diterpenoides apresentaram elevada atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, entre eles a hipargenina A e a hipargenina B.

I.8.6 Compostos com Atividade Antimicrobiana

Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas e referidos na bibliografia disponível pertencem aos grupos dos alcaloides (Ferreira, 2007), dos terpenoides, das substâncias fenólicas, tais como fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonoides, taninos e cumarinas (Damodaran *et al.*, 2008; Tortora *et al.*, 2010). Estes metabolitos secundários regulam o metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando a síntese enzimática, tanto ao nível nuclear como ribossomal, podendo mesmo afetar a membrana do microrganismo infeccioso (Damodaran *et al.*, 2008; Tortora *et al.*, 2010).

A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos baseia-se na rutura das membranas dos microrganismos, provocando alterações na composição e estrutura lipídica, promovendo o esvaziamento do conteúdo celular. Uma propriedade importante destes compostos é a sua atividade permanente durante longos períodos de tempo (Tortora *et al.*, 2010). Os alvos preferenciais destes compostos são as proteínas ou os lípidos membranares como referido anteriormente.

Capítulo II. Material e Métodos

II.1 Caracterização do Material Vegetal

O ensaio experimental foi realizado no Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), em Vila Real (41°19'N, 7°44'W) à cota de 470 m acima do nível do mar, entre 2011 e 2013.

No presente trabalho foram selecionadas 12 plantas de salva rubra *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*, subarbusto perene, fortemente ramificado (Figura 17), com cerca de 60cm de altura cada e diâmetro equivalente. As plantas com quatro anos de idade, em bom estado fitossanitário e com boa exposição solar, pertencem à coleção de plantas aromáticas e medicinais do Jardim Botânico da UTAD.



Figura 17 - Espécie *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* localizada na coleção de plantas aromáticas e medicinais do Jardim Botânico da UTAD, com especial detalhe de coloração das folhas jovens e adultas

II.2 Localização e Caracterização Climática

II.2.1 Localização

A cidade de Vila Real está situada a cerca de 450m de altitude, sobre a margem direita do rio Corgo, um dos afluentes do Douro. Localiza-se num planalto rodeado de altas montanhas, em que avultam as serras do Marão e do Alvão (Figura 18) (Diniz *et al.*, 2003; CMVR, 2014; Ferreira, 2015).

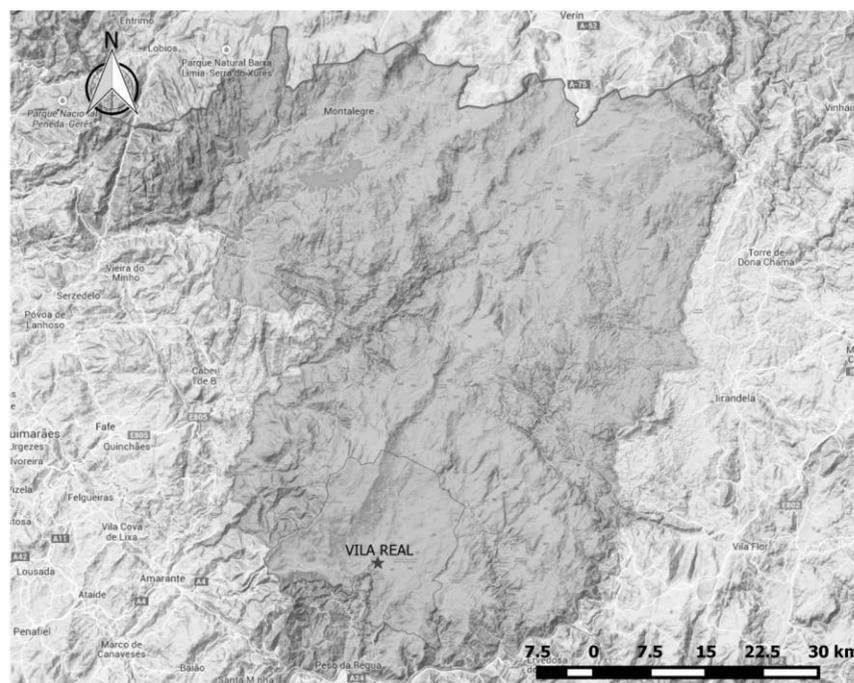


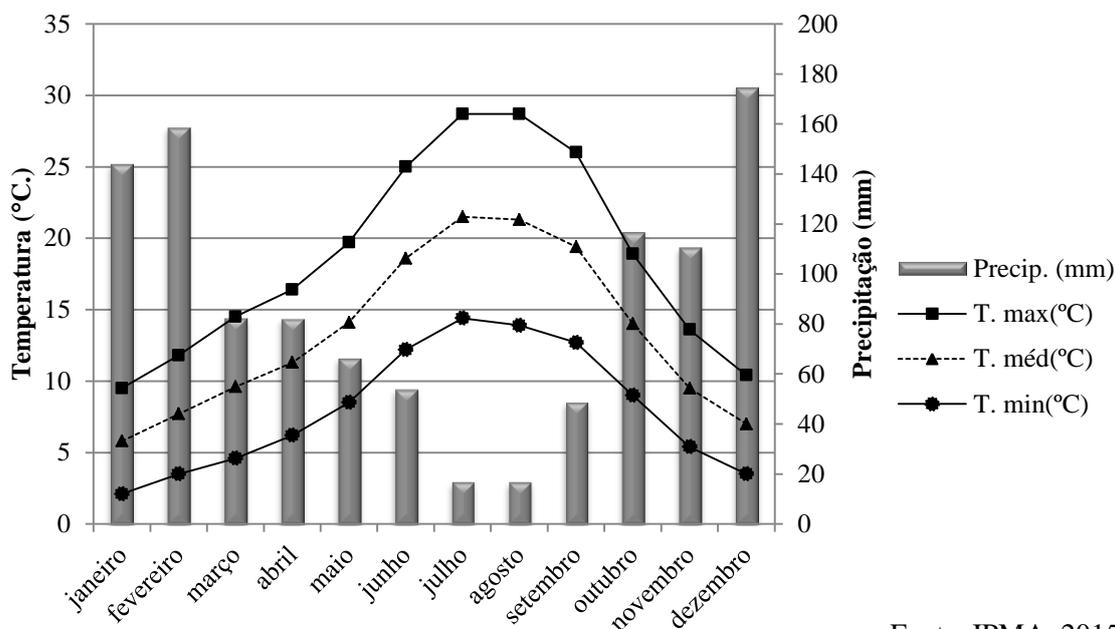
Figura 18 - Distrito de Vila Real (Fonte: Physical-Google, https://www.google.com/maps/d/viewer?mid=z_Mg2zwfiPGM.k7Wwd72ITxjI&hl=en_US)

Dista aproximadamente 85km, em linha reta, do Oceano Atlântico, que lhe fica a oeste, 15km do rio Douro, que lhe corre a sul, e, para norte, cerca de 65km da fronteira com a Galiza, Espanha (Diniz *et al.*, 2003; CMVR, 2014; Ferreira, 2015).

O concelho de Vila Real mantém características rurais bem marcadas. Dominam dois tipos de paisagem: a zona mais montanhosa das Serras do Marão e do Alvão, separadas pela terra verdejante e fértil do Vale da Campeã, e, para sul, com a proximidade do Douro, os vinhedos em socalco. Por toda a parte existem linhas de água que irrigam a área do concelho, com destaque para o rio Corgo, que atravessa a cidade num pequeno mas profundo vale, originando um canhão de invulgar beleza (Diniz *et al.*, 2003; CMVR, 2014).

II.2.2 Caracterização Climática

O clima da região do local do estudo é temperado tipicamente Mediterrânico com influência continental. Há medida que se progride para o interior, as influências atlânticas deixam praticamente de sentir-se, dando lugar a um clima com características mais continentais, verões quentes e secos e invernos chuvosos, em que ocorre cerca de 70% da precipitação total anual. Assim a cidade de Vila Real, apresenta duas estações do ano de extremos: invernos bastante prolongados com frio constante, chegando mesmo a temperaturas por vezes negativas, e verões bastante quentes e secos. Em relação à temperatura, além das grandes amplitudes térmicas verifica-se que os meses mais quentes são julho e agosto e os mais frios dezembro e janeiro, com média anual de 21,5°C, 21,3°C e 5,8°C, 7°C, respetivamente, segundo as normais climatológicas no período de 1971 a 2000 em Vila Real representadas na Figura 19 (IPMA, 2015).



Fonte: IPMA, 2015

Figura 19 - Normais Climatológicas de temperatura e precipitação para Vila Real (1971/2000)

Analisando a Figura 20, Figura 21 e Figura 22 dos registos da Estação Meteorológica Automática do Campus da UTAD, observou-se que os meses mais frios estão associados ao inverno nos quais se registaram as precipitações mais elevadas, sendo estas, quase nulas durante o verão, que registou as temperaturas médias das máximas do ano mais elevadas. A temperatura máxima média mensal mais elevada foi registada em agosto, 28,3°C e 31,6°C no ano de 2011 e 2013, respetivamente. As temperaturas médias mínimas mensais ocorreram em dezembro de 2011 e em janeiro e dezembro de 2013, com valores de 3,6°C e 2,8°C, respetivamente.

Em termos de distribuição de precipitação (Figura 20 e Figura 22), observou-se uma importante variação sazonal, sendo o semestre húmido responsável por 80% da pluviosidade média anual entre 61mm no ano de 2011 e 71mm em 2013, concentrando-se, principalmente, nos meses de outubro a março. Em contrapartida, os meses de junho, julho e agosto foram bastante secos.

No ano de 2011 a maior concentração de precipitação verificou-se no mês de novembro (151mm) e a mínima em julho foi de 1,5mm.

Nas Figura 20 e Figura 22 pode verificar-se que a maior radiação solar direta encontra-se concentrada no verão nos meses de junho, julho e agosto. A radiação solar global varia entre 5,2 e 28,5MJm⁻²dia⁻¹.

É importante realçar que, devido às características desta planta, os extremos dos fenómenos meteorológicos assumem uma grande importância ao nível do desenvolvimento vegetativo, pelo que o regime de temperaturas e a distribuição sazonal da precipitação condiciona a resposta da vegetação a tais fatores. Assim sendo, o ensaio experimental decorreu entre 2011 e 2013. Optou-se por apresentar os dados referentes a 2011 e 2013 por serem períodos climáticos distintos, pelas diferenças registadas a nível das diferentes variáveis do clima, tais como, temperatura, precipitação, humidade, radiação solar, entre outros que influenciam o desenvolvimento vegetativo, já que o ano de 2012 foi semelhante ao de 2013.

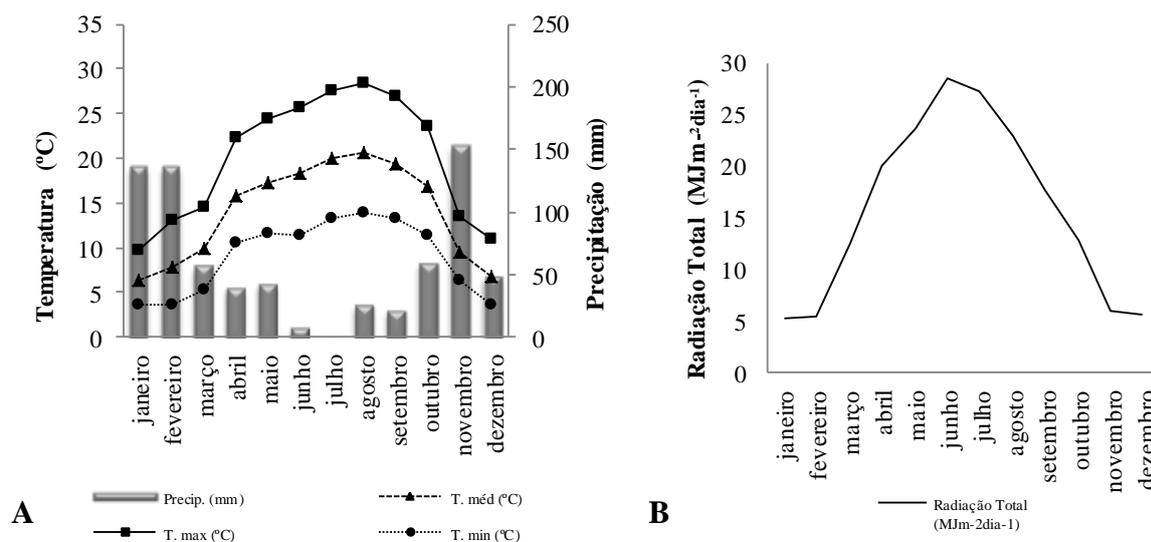


Figura 20 - Totais pluviométricos (Precip), temperatura média das médias (T. méd), média das mínimas (T. min), média das máximas (T. max) mensais (A); Radiação Solar Total (B) para Vila Real, registados no ano 2011 (dados meteorológicos obtidos pela estação meteorológica automática do Campus da UTAD)

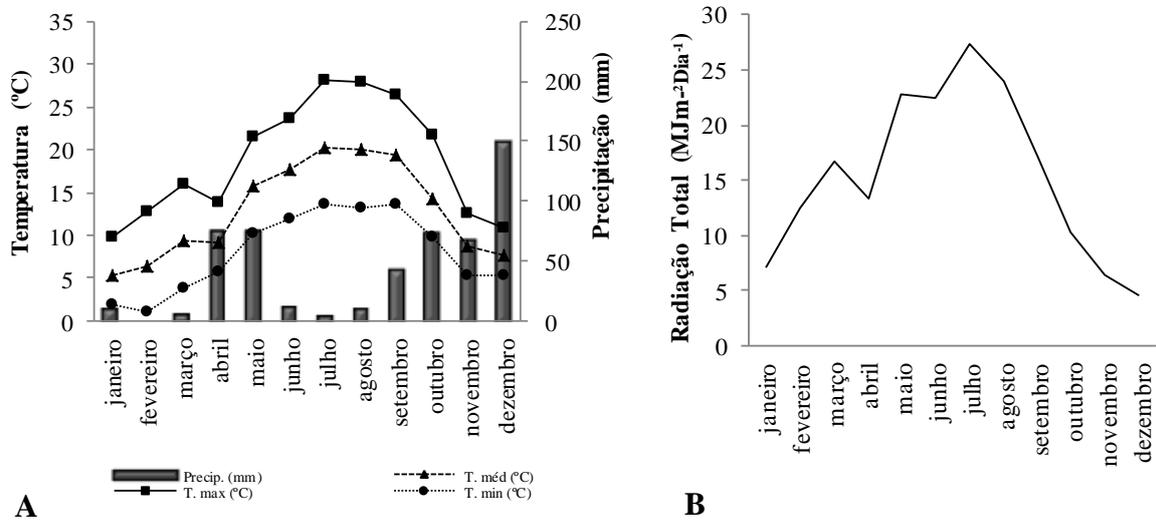


Figura 21 - Totais pluviométricos (Precip), temperatura média das médias (T. méd), média das mínimas (T. min), média das máximas (T. max) mensais (A); Radiação Solar Total (B) para Vila Real, registados no ano 2012 (dados meteorológicos obtidos pela estação meteorológica automática do Campus da UTAD)

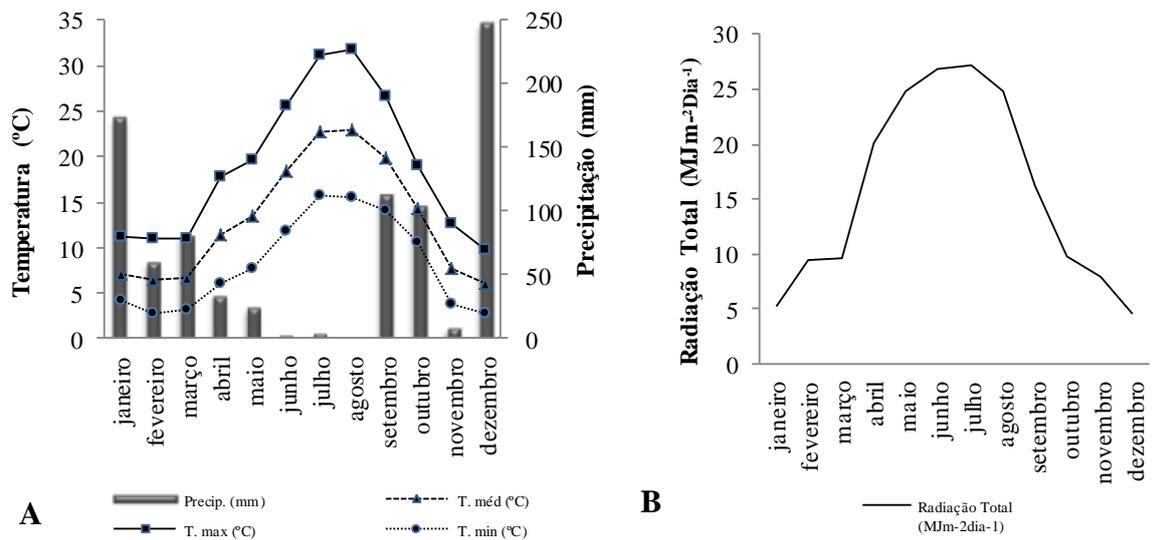


Figura 22 - Totais pluviométricos (Precip), temperatura média das médias (T. méd), média das mínima (T. min), média das máximas (T. max) mensais (A); Radiação Solar Total (B) para Vila Real medidos no ano 2013 (dados meteorológicos medidos por estação meteorológica automática no Campus da UTAD)

II.2.3 Caracterização Edáfica

De acordo com Cary (1985), dada a natureza das formações geológicas e do relevo, os solos predominantes na área do concelho de Vila Real são, por via de regra, delgados e pobres, embora existam algumas zonas mais aplanadas, encostas mais suaves e vales ou depressões em que não só por se tratar de formações de acumulações, mas sobretudo pelo facto de refletirem uma profunda e prolongada intervenção humana, ocorrem solos de boa ou grande fertilidade.

O solo onde decorreu o ensaio é um cambissolo dístrico (litólico não húmido e mediterrânico pardo), sobretudo derivado do xisto. Caracteriza-se por apresentar uma textura média (franco-arenosa), com pH ácido (5,4), uma percentagem de matéria orgânica de 1,45 e teores de fósforo médios (63ppm) e de potássio muito altos (348ppm). A análise do solo foi realizada no Laboratório de Solos da UTAD (Anexo 1).

II.3 Amostragem

A recolha das amostras foliares para a avaliação dos diferentes parâmetros foi efetuada em 15 de junho e 9 de setembro do ano de 2011 e 24 de junho e 13 de setembro do ano de 2013, no período da manhã. Foram colhidas folhas verdes com desenvolvimento foliar completo e folhas jovens com coloração violácea que se encontravam nos ápices, todas elas em bom estado fitossanitário.

II.4 Metodologia dos Parâmetros Morfoanatômicos, Fisiológicos, Químicos e Bioquímicos

II.4.1 Determinação de Parâmetros Morfoanatômicos

Das 8 folhas colhidas por tratamento (jovens junho, jovens setembro de 2011 e adulta junho, adultas setembro de 2013) fizeram-se cortes na região mediana da folha, a fim de evitar diferenças de espessura. Os cortes definitivos foram obtidos segundo a técnica de Deyson (1965) e Gonçalves (2000).

Para isso fixaram-se as amostras durante 24h em FAA (90% de álcool a 70%; 5% de formol; 5% de ácido acético glacial). De seguida, as amostras foram colocadas em água destilada durante 15min. A seguir desidrataram-se em concentrações crescentes de álcool durante 1h (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), procedeu-se ao clareamento em xilol e à impregnação das amostras em parafina fundida numa estufa a 60°C durante 12 a 24h. Depois da impregnação, efetuou-se a inclusão em blocos de parafina no aparelho de inclusão LEICA

EG 1160 HITOEMBEDDER. Após solidificação dos blocos, procedeu-se ao corte do material no micrótomo rotativo LEICA RM 2135 e à colagem em lâminas em banho-maria (54°C). Após 12 a 24h, efetuou-se a desparafinação do material em xilol que posteriormente foi hidratado em concentrações decrescentes de álcool (100 a 70%). Para dar afinidade ao corante utilizado (azul de toluidina 0,1% durante 7min), passou-se o material por água destilada e, por fim, procedeu-se a uma última desidratação em álcool e em xilol antes de efetuar a montagem da preparação em Entellan. Este tipo de coloração permite obter bons contrastes entre os diferentes componentes dos órgãos e o meio de montagem.

Posteriormente as preparações histológicas obtidas foram observadas ao microscópio ótico invertido Olympus IX 51 (Olympus Optical Co., GmbH, Hamburgo, Alemanha). Estes cortes seguidamente foram fotografados com uma câmara fotográfica acoplada Olympus Colorview III. As medições anatómicas foram realizadas com o *software* de tratamento de imagem Cell* (Soft Imaging System GmbH, Hamburgo, Alemanha).

Os parâmetros histológicos analisados consistiram na medição da espessura dos diferentes tecidos foliares, designadamente, as epidermes adaxial e abaxial com as respetivas cutículas, os parênquimas clorofilinos em paliçado (PCE) e lacunoso (PCL), mesófilo e lâmina total. A razão PCE/PCL foi posteriormente calculada. Na nervura principal da folha foi medido a espessura do xilema (EX), a espessura do floema (EF), a largura da nervura principal, a área dos vasos xilémicos (AVX) e o perímetro dos vasos xilémicos (PVX) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ciclo vegetativo de 2013. Paralelamente foram feitas observações tridimensionais das epidermes superiores e inferiores de 5 folhas jovens e adultas num microscópio eletrónico de varrimento (MEV) Philips-FEI/Quanta 400 com EDS (FEI, Hillsboro, Oregon, EUA) a 15,0kV.

II.4.2 Quantificação de Ceras Cuticulares Solúveis

Para quantificar as ceras intra e epicuticulares foi usada uma solução de tricolorometano e metanol na proporção de 3:1, segundo Hamilton (1995) com algumas modificações.

As amostras foram introduzidas, 2 folhas por amostra, separadamente em placas de Petri com 100mL de solução tricolorometano/metanol durante 2min, agitando-se levemente. As soluções obtidas (ceras mais tricolorometano e metanol) foram filtradas em papel-filtro e cada uma foi transferida para um goblé de peso conhecido, onde ficaram a secar à temperatura ambiente, para obtenção do resíduo sólido (ceras).

II.4.3 Determinação de Parâmetros do Estado Hídrico e Esclerofilia

Procedeu-se à medição da área foliar ($n=8$), com o medidor LI-3100 (Li-Cor, Lincoln, NE) e para os índices do estado hídrico e esclerofilia foi calculado o conteúdo relativo de água (RWC %), através da fórmula:

$$\text{RWC} = \frac{(\text{PF} - \text{PS})}{(\text{PT} - \text{PS})} \times 100$$

PF - corresponde ao peso fresco;

PT - corresponde ao peso fresco à turgescência máxima (determinado por imersão dos pecíolos foliares em água desmineralizada, durante 24h, às escuras e a 4°C);

PS - corresponde ao peso seco (após secagem a 70°C, durante 48h, numa estufa ventilada).

A densidade do tecido foliar (D , g kg⁻¹) e a área foliar específica (SLA, m² g⁻¹) foram calculadas de acordo com Dijkstra (1989) do seguinte modo:

$$D = (\text{PF}/\text{PS}) \times 1000$$

$$\text{SLA} = \text{AF}/\text{PS}$$

AF - corresponde à Área Foliar

Para obtenção destes parâmetros foram utilizados os procedimentos descritos em Bacelar *et al.* (2006).

II.4.4 Determinação de Parâmetros Fisiológicos

II.4.4.1 Determinação da Fluorescência da Clorofila *a* *in vivo*

A determinação da fluorescência da clorofila *a* foi efetuada num dia de céu limpo pela manhã, usando um fluorímetro portátil PAM (*Pulse Amplitude Modifier*) que permitiu fazer medições *in vivo*.

Antes da medição, adaptou-se uma porção da folha ($n=8$) ao escuro durante 30min. Depois deste período mediu-se a fluorescência basal (F_0) quando todos os centros de reação do fotossistema II (PSII) estavam abertos (oxidados), usando um pulso de luz de baixa intensidade. A fluorescência máxima (F_m) foi medida quando todos os centros de reação do PSII estavam fechados (reduzidos) durante um pulso de luz saturada (pulso de 0,7s de 15000µmol fotões m⁻²s⁻¹). A diferença entre estes dois parâmetros dá-nos a fluorescência variável, F_v (Correia *et al.*, 2005). Através da equação:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

Obtém-se a eficiência fotoquímica máxima do PSII (Krause e Weiss, 1991).

De seguida as folhas foram novamente expostas à luz, aumentando-se a luz actínica de um fluxo de fotões de 300 para 1500 $\mu\text{mol fotões m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Depois de 20 s de exposição a cada irradiância, foi medida a fluorescência no equilíbrio (F_s) por 2,5 s, seguindo-se uma exposição a luz saturante (15000 $\mu\text{mol fotões m}^{-2}\text{s}^{-1}$) por 0,7 s para calcular a fluorescência máxima (F'_m). Para determinar o F'_0 ensombrou-se a amostra de folhas por 5 s com uma fonte de luz vermelho longínquo. Estes parâmetros foram usados para determinar:

- coeficiente de extinção fotoquímica: $qP=(F'_m-F_s)/(F'_m-F'_0)$;
- coeficiente de extinção não fotoquímica $qN=1-F'_v/F_v$;
- rendimento quântico efetivo do PSII ($\Phi_{\text{PSII}}=\Delta F/F'_m=(F'_m-F_s)/F'_m$) (Bilger e Schreiber, 1986; Genty *et al.*, 1989).
- Taxa de transporte de eletrões ($\text{ETR}=(\Delta F/F'_m)\times\text{PPFD}\times 0,5\times 0,84$) (Krall e Edwards (1993), onde PPFD é a densidade de fluxo de fotões incidente na folha, 0,5 é o fator que assume igual distribuição de energia entre os dois fotossistemas e 0,84 é o valor correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas, valor mais comum para as plantas C3.

II.4.4.2 Determinação das Trocas Gasosas

A determinação das trocas gasosas foi efetuada nas mesmas folhas utilizadas na avaliação da fluorescência da clorofila *a*. Utilizou-se um analisador de gás por radiação infravermelha (IRGA-LCpro+, ADC, Hoddesdon, Reino Unido) num modo diferencial e circuito aberto. As medições das trocas gasosas foram efetuadas no período da manhã (11h), num dia de céu limpo, em 8 folhas expostas em condições de luz saturante para a fotossíntese (PPFD superior a 500 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$). Cada leitura foi registada logo que a pressão parcial do CO_2 no interior da câmara estabilizasse, o que normalmente acontecia ao fim de 1 min, de forma a minimizar o chamado “efeito estufa” dentro da câmara foliar (Moutinho-Pereira, 2000).

O IRGA permite para além de estimar a taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), obter a condutância estomática para o vapor de água (g_s), a taxa de transpiração (E) e a razão da concentração do CO_2 intercelular e atmosférico C_i/C_a . A eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s) foi determinada a partir das equações de von Caemmerer e Farquhar (1981). As unidades adotadas são as propostas por Cown (1977) sendo as suas taxas expressas por unidade de área foliar projetada (apenas a área de uma das superfícies foliares).

II.4.5 Determinação dos Parâmetros Químicos e Bioquímicos

II.4.5.1 Determinação de Açúcares Solúveis e Amido

Os açúcares solúveis foram quantificados segundo o procedimento adaptado de Irigoyen *et al.* (1992) através do método colorimétrico de antrona.

Num tubo de ensaio adicionou-se um disco de 8mm de diâmetro correspondente ao material vegetal em estudo, *S. officinalis* L. var. *purpurascens* ($n=8$). De seguida, adicionou-se 10mL de etanol a 80% e colocou-se em banho-maria durante 1h a 80°C. Posteriormente noutro tubo de ensaio foi adicionado 200µL do extrato alcoólico e 3mL de antrona, agitou-se no vórtex, ferveu-se os tubos durante 10 minutos a 100°C e de seguida arrefeceu-se em gelo. Por fim, procedeu-se à leitura da absorvância a 625nm. A curva-padrão foi feita com uma solução mãe de glucose (0,05%).

Para a quantificação do amido, utilizou-se o mesmo disco dos açúcares solúveis ao qual se adicionou ácido perclórico a 30%, para eliminar o extrato dos açúcares, de acordo com o procedimento adaptado de Osaki *et al.* (1991). A curva-padrão foi feita com uma solução mãe de glucose (0,05% em 50mL de ácido perclórico a 30%) sendo a leitura da absorvância realizada a 625nm.

II.4.5.2 Determinação de Proteínas Solúveis

A concentração total de proteínas solúveis foi determinada tal como proposto por Bradford (1976) com algumas adaptações. Os discos de folha foram macerados num meio contendo 50mM tampão fosfato (pH 7,8), 0,1mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 100mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) e 2% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP), e centrifugada a 22000g durante 30 minutos, a 4°C. A absorvância foi lida a 595nm, e albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão.

II.4.5.3 Determinação da Peroxidação Lipídica

Na quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como meio de determinar o grau de peroxidação lipídica foram utilizados os procedimentos adaptados de Heath e Packer (1968) e de Costa *et al.* (2002). A base química deste método relaciona-se com o facto de que, durante a oxidação da maioria dos sistemas biológicos, formar-se uma substância designada por malondialdeído (MDA). De facto é o principal aldeído formado como produto secundário durante a oxidação dos ácidos gordos polinsaturados existentes nas membranas biológicas, no entanto, outros aldeídos podem condensar com o ácido

tiobarbitúrico (TBA) durante esta reação, daí a designação de TBARS. A adição de TBA, a acidificação e o aquecimento, promovem a formação de um produto cor-de-rosa. O produto corado, em solução ácida, absorve a luz num comprimento de onda de 532nm, apresentando uma emissão de fluorescência a 553nm. A concentração de TBARS é estimada por espectrofotometria a 532nm, descontando a absorvância não específica, relacionada com os pigmentos fotossintéticos que se observa a 600nm. Para o cálculo do MDA utiliza-se o coeficiente de extinção molar do aduto ((TBA)₂-MDA) de 155mM⁻¹ cm⁻¹.

As folhas de cada amostra foram homogeneizadas ácido tricloroacético (TCA) a 20%, centrifugado a 10000g durante 20 minutos. Por cada amostra prepararam-se 3 tubos, por isso, de cada um dos sobrenadantes foram obtidas 3 alíquotas de 250μL às quais se adicionou 1mL da mistura de TBA 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v). Após agitação no vórtex, os tubos foram a banho-maria a 95°C durante 30 minutos seguido de uma nova centrifugação a 11000g de 20 minutos. A leitura foi realizada a 532 e 600nm.

II.4.5.4 Determinação da Perda de Eletrólitos

Paralelamente, a percentagem de perda de eletrólitos foi avaliada utilizando um medidor de condutibilidade elétrica (Hanna Instruments Hi8820n, Italy) sendo determinado segundo o método de Lutts *et al.* (1996) com algumas modificações.

Foram efetuadas 3 lavagens sucessivas (n=8) com água destilada para a remoção da superfície de contaminação e, posteriormente colocaram-se discos de 0,8cm em tubos de falcon contendo 10mL de água ultrapura. Os tubos foram agitados a 25°C, durante 24h, e registou-se a primeira leitura com um condutímetro. A segunda leitura foi efetuada após os tubos irem ao autoclave a 120°C, durante 20 minutos. Utilizou-se uma solução de calibração de 84μSCm@25°C/77°F.

Para a determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos e metabolitos foram feitos discos de 8mm de diâmetro nas folhas recolhidos durante o ensaio experimental. Para as análises bioquímicas foram feitas 8 repetições por tratamento, o que equivale a 16 discos, devidamente identificados em 4 frascos, congelados de imediato em azoto líquido (-195°C) e posteriormente colocados a -80°C até ao momento da quantificação.

II.4.5.5 Quantificação de Pigmentos Fotossintéticos

II.4.5.5.1 Clorofilas

A quantificação de clorofilas foi feita a partir de discos foliares sujeitos a um tratamento com acetona a 80 % (v/v) de acordo com Arnon (1949) e Šesták *et al.* (1971). No espectrofótopetro

(Cary 100 Bio UV-Vis, Varian Inc.) mediram-se os comprimentos de onda a 663 e 645nm correspondentes aos picos de absorção máxima de clorofila *a* e clorofila *b*, respetivamente. Posteriormente aplicaram-se as fórmulas de cálculo propostas por Arnon (1949) baseadas nos coeficientes de absorção específica de Mackinney (1941):

$$\text{Clorofila total (mg dm}^{-2}\text{)} = (20,2.\text{Abs}_{645} + 8,02.\text{Abs}_{663}).(\text{d}.0,001).\text{s}^{-1}$$

$$\text{Clorofila a (mg dm}^{-2}\text{)} = (12,7.\text{Abs}_{663} - 2,69.\text{Abs}_{645}).(\text{d}.0,001).\text{s}^{-1}$$

$$\text{Clorofila b (mg dm}^{-2}\text{)} = (22,9.\text{Abs}_{645} - 4,68.\text{Abs}_{663}).(\text{d}.0,001).\text{s}^{-1}$$

[sendo Abs_{663} e Abs_{645} a absorvância a 663nm e 645nm, respetivamente; d = volume final do extrato acetónico, mL; s = área foliar dos discos, dm^2]

II.4.5.5.2 Carotenoides

A quantificação da concentração de carotenoides totais foi realizada segundo Lichtenthaler (1987).

No extrato acetónico utilizado para a quantificação das clorofilas mediu-se a absorvância a 470nm e aplicou-se a seguinte fórmula de cálculo:

$$\text{Carotenoides totais (mg dm}^{-2}\text{)} = [(1000.\text{Abs}_{470} - 1,82.\text{Cl}_a - 85,02.\text{Cl}_b)/198].(\text{d}.0,001)\text{s}^{-1}$$

[Sendo Abs_{470} a absorvância a 470nm; Cl_a e Cl_b concentrações em clorofila *a* e *b*; respetivamente, 198 coeficiente de absorção dos carotenoides totais a 470nm; d = volume final do extrato acetónico, s = área foliar dos discos, dm^2].

II.4.5.5.3 Método não Invasivo para a Estimativa da Clorofila Total

A determinação das propriedades óticas das folhas tem como objetivo avaliar o estado fisiológico das folhas sem o recurso a metodologias invasivas. Um dos métodos não invasivos utilizados foi o SPAD (Soil Plant Analysis Development) -502 (Minolta, Osaka, Japan). É uma técnica rápida e não destrutiva (Chang *et al.*, 2003).

O SPAD estima a concentração relativa de clorofila na folha através da medição da transmitância diferencial da luz através deste órgão. Parte da folha é colocada numa câmara (2mm x 3mm), o medidor emite luz a partir de 2 díodos, um produz um pico perto dos 650nm (vermelho) e outro a 940nm (infravermelho). Estes comprimentos de onda são transmitidos alternativamente à folha. A clorofila absorve a luz vermelha, mas praticamente nenhuma do infravermelho e um valor SPAD (um índice entre 1 e 100) é calculado instantaneamente a partir da diferença de densidade ótica entre os comprimentos de onda vermelho e infravermelho detetados por um fotodíodo presente na câmara em posição oposta à folha.

Segundo Daughtry *et al.* (2000), as unidades SPAD estão relacionadas com a clorofila extraível e com o volume de azoto para muitas colheitas. O valor encontrado fornece a informação relativa à intensidade da cor verde da folha. As leituras com o SPAD decorreram no local do ensaio e foram realizadas em 8 folhas por cada tratamento em estudo. Salienta-se, no entanto, que em cada folha se fizeram 4 leituras individuais e, seguidamente, calculou-se o respetivo valor médio.

II.4.5.6 Quantificação dos Teores em Compostos Fenólicos

II.4.5.6.1 Preparação dos Extratos

Nas análises laboratoriais em que se utilizaram extratos como amostras, os mesmos foram organizados de acordo com as informações constantes na Tabela 2, apresentada a seguir.

Tabela 2 - Organização dos extratos de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo dos ciclos vegetativos de 2011/2013

	Ano Colheita 2011				Ano de Colheita 2013			
	Folhas Jovens		Folhas Adultas		Folhas Jovens		Folhas Adultas	
junho	Frescas	Secadas	Frescas	Secadas	Frescas	Secadas	Frescas	Secadas
setembro	Frescas	Secadas	Frescas	Secadas	Frescas	Secadas	Frescas	Secadas

Após colheita da parte aérea de *Salvia officinallis* L. var. *purpurascens* a parte fresca referente ao ano de 2011 foi congelada a -80°C e a relativa ao ano de colheita de 2013 foi utilizada sem qualquer armazenamento prévio à análise. A amostra secada foi desidratada em ambiente seco ao abrigo da luz a 40°C , tendo sido posteriormente triturada. A percentagem de humidade das folhas frescas foi de 70%.

Cortaram-se finamente as folhas frescas de cada amostra e maceraram-se. Da quantidade total de cada amostra, pesaram-se 4g para cada repetição. Cada uma das repetições serviu para a obtenção dos extratos etanólicos, tendo-se submergido os 4g de folhas maceradas em 30mL de etanol a 70% v/v, durante 8 dias à temperatura ambiente e às escuras (adaptado de Pinheiro *et al.*, 2012).

Para os extratos das folhas secadas, pesaram-se 2g para cada repetição, tendo o pó sido dissolvido em 30mL de etanol a 70% v/v, durante 8 dias à temperatura ambiente e às escuras (adaptado de Pinheiro *et al.*, 2012) tendo-se obtido extratos de folhas secadas.

Após a filtragem por vácuo, com Kitasato e papel de filtro 0,45 µm (Millipore Cat. No. - Haft 04700), adicionou-se a cada repetição etanol a 70% até perfazer 50mL.

Para as análises do conteúdo fenólico e determinação da atividade antioxidante, todas as amostras foram diluídas da seguinte forma:

Amostras do ano de 2011:

Folhas frescas, jovens e adultas - 10 vezes

Folhas frescas adultas de setembro e folhas secadas, jovens e adultas - 50 vezes

Amostras do ano de 2013:

Folhas frescas, adultas de junho e setembro - 50 vezes

Folhas frescas jovens e folhas secadas, jovens e adultas - 100 vezes.

II.4.5.6.2 Determinação do Conteúdo dos Compostos Fenólicos

II.4.5.6.2.1 Fenóis Totais

O seu princípio baseia-se na redução em meio alcalino, da mistura dos ácidos fosfotúngstico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) a óxidos de tungsténio (W_8O_{23}) e de molibdénio (Mo_8O_{23}) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

A redução resulta numa alteração colorimétrica, originando uma coloração azul com absorção a um $\lambda_{m\acute{a}x} = 750nm$, que é proporcional à concentração de polifenóis.

A quantificação do teor em fenóis totais foi feita de acordo com o descrito por Singleton e Rossi (1965); Miliauskas *et al.* (2004): para a realização do método foi necessário primeiramente, preparar uma solução padrão de ácido gálico, para a construção da reta de calibração com diferentes concentrações: 250, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 10 e 5 mgL^{-1} . A reta de calibração utilizada para a quantificação dos fenóis totais foi a EQUAÇÃO DA RETA.

Para a preparação de cada padrão foi colocado em cada um dos tubos de ensaio sequencialmente 1 mL de cada padrão de ácido gálico, 0,5 mL de Folin-Ciocalteu, 2,0 mL de Na_2CO_3 (7,5 %) e 6,5 mL de água destilada. Após homogeneização, colocaram-se os tubos num banho de água a 70°C, durante 30 minutos; de seguida arrefeceram-se os tubos em água corrente e leu-se a absorvância a 750 nm numas cuvetes de 1cm de percurso ótico.

O mesmo procedimento foi utilizado para a análise das amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

A quantificação dos fenóis totais de cada amostra foi calculada por interpolação da reta. Os resultados foram expressos em $mg\ GAEg^{-1}$ de amostra.

II.4.5.6.2.2 *Orto-difenóis*

Para a quantificação dos *orto*-difenóis usou-se o método por adição de molibdato de sódio e medição da absorvância a 370nm (Mateos *et al.*, 2001).

Para a construção da reta de calibração usou-se oito soluções padrão de ácido gálico, com diferentes concentrações: 200, 150, 100, 75, 50, 25, 10, 5mgL⁻¹. Para cada tubo de ensaio adicionou-se 4mL de cada padrão e 1mL de molibdato de sódio 5%. Deixou-se em repouso durante 15min.

Para quantificar os *orto*-difenóis das amostras de *Salvia officinallis* L. var. *purpurascens*, adicionou-se 4mL dessa amostra de trabalho a 1mL de molibdato de sódio 5%. Deixou-se em repouso 15 minutos.

Este ensaio foi realizado em triplicado.

A quantificação dos *orto*-difenóis dos extratos de cada amostra foi calculada por interpolação.

Os resultados foram expressos em mg GAE g⁻¹ de amostra.

II.4.5.6.2.3 *Flavonoides*

Para a quantificação dos flavonoides usou-se o método descrito por Downey *et al.* (2007) e mediu-se a absorvância a 510nm, em cuvetes de 10mm de percurso ótico, no espectrofotômetro Spectronic GenesysTm 2PC.

Para a construção da reta de calibração usou-se oito soluções padrão de catequina, com diferentes concentrações: 250, 175, 125, 100, 50, 25, 10, 5 mgL⁻¹. Para cada tubo de ensaio adicionou-se 0,5mL de cada padrão a 150µL de NaNO₂ 5%. Deixou-se em repouso durante 5min, logo de seguida acrescentou-se 150µL de AlCl₃ 10%, após 6 minutos de espera adicionou-se 1mL de NaOH (1M).

Retirou-se 0,5mL de amostra de trabalho e adicionou-se 150µL de NaNO₂ 5%. Esperou-se 5 minutos e acrescentou-se 150µL de AlCl₃ 10%. Depois de 6 minutos de espera adicionou-se 1mL de NaOH (1M).

Este ensaio foi realizado em triplicado.

A quantificação dos flavonoides dos extratos de cada amostra foi calculada por interpolação.

Os resultados foram expressos em mg de catequina g⁻¹ de amostra.

II.4.5.7 Determinação da Atividade Antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada usando o método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Ozgen *et al.*, 2006). Este ensaio permite a quantificação da atividade antioxidante de uma amostra através da sua capacidade em reduzir radicais catiões $ABTS^{*+}$.

No método do ABTS, o grau de inibição obtido relaciona-se com o produzido por referências de concentração conhecida de um análogo sintético da vitamina E, ácido (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-cromonil) fórmico (“Trolox”) (Figura 23).

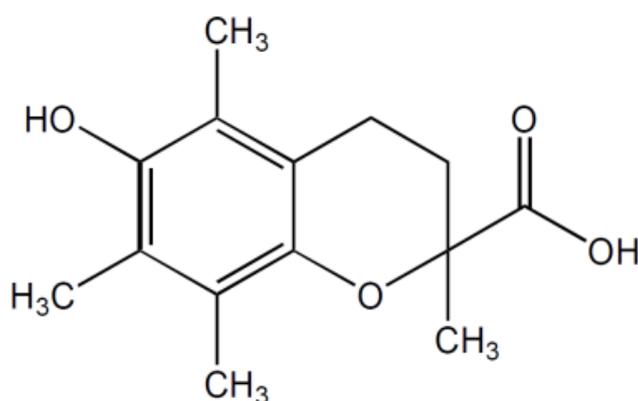


Figura 23 - Estrutura do ácido (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-cromonil) fórmico (“Trolox”)

Ao juntar na mistura reacional persulfato de potássio a ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3 - etilbenzotiazolino-6-sulfónico), este último é oxidado ao catião $ABTS^{*+}$, que possui uma coloração azul escuro. Ao juntar substâncias antioxidantes à mistura, o catião $ABTS^{*+}$ é reduzido a ABTS, fazendo com que se dê a descoloração da solução inicial (Figura 24).

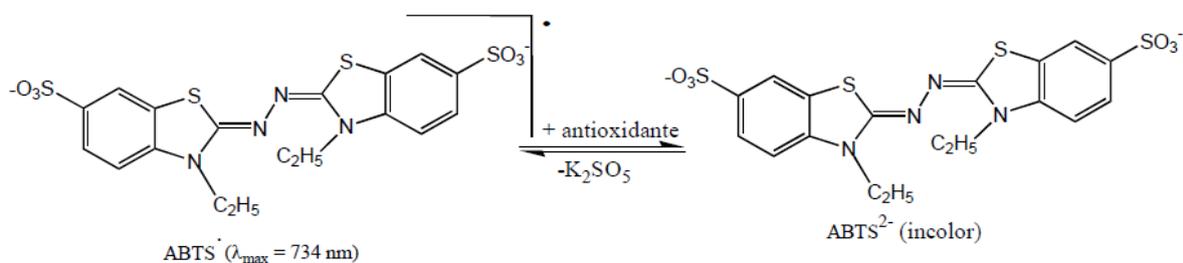


Figura 24 - Princípio do método de Determinação da Capacidade Antioxidante com ABTS

Para a preparação do catião radical ABTS^{•+}, adicionou-se 5mL da solução aquosa 7mM de ABTS a 88μL de uma solução 140mM de K₂S₂O₈ (razão 1:0,35).

A mistura foi deixada a reagir no escuro à temperatura ambiente durante 16h antes da utilização. Devido ao facto do ABTS e do persulfato de potássio reagirem estequiometricamente numa razão de 2:1, a reação anterior resulta na oxidação incompleta do ABTS. A oxidação do ABTS começa imediatamente após a adição do persulfato de potássio, mas a absorvância só é máxima e estável após 6h. O catião radical é estável nesta forma durante mais de dois dias armazenado no escuro à temperatura ambiente (Barros *et al.*, 2011).

Para a preparação da Solução de Trabalho de ABTS, a solução anterior do catião radical foi diluído de 1:88 com tampão CH₃COO⁻/Na⁺ 100mM, pH 4,5. Esta solução teve uma absorvância a 734nm de 0,70±0,02, numa cuvete de 1cm de largura.

Para a determinação da Capacidade Antioxidante (TEAC - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) adicionou-se 2mL da solução de trabalho de ABTS^{•+} a 50-200μL da amostra a analisar. Após agitação, a absorvância leu-se a 734nm após 15 minutos à temperatura ambiente.

A percentagem de inibição do catião radical ABTS^{•+} foi calculada usando a expressão:

$$\% \text{ de Inibição} = ((\text{Abs}_{734\text{nm}} \text{ branco} - \text{Abs}_{734\text{nm}} \text{ amostra}) / \text{Abs}_{734\text{nm}} \text{ branco}) \times 100$$

Para a construção da reta de calibração adicionou-se a 6 tubos de ensaio 2mL da solução de trabalho ABTS[•] e de seguida aos tubos de ensaios de 2 a 6 adicionou-se 200, 150, 100, 50, 25μL da solução de trabalho de Trolox 0,11mM, respetivamente. Por fim, ao tubo de ensaio 1, 3 a 6 adicionou-se 200, 50, 100, 150, 175μL de água, respetivamente.

Para a determinação da percentagem de inibição das amostras, adicionou-se 200, 100, e 50μL da amostra diluída, seguida da adição de 2mL da solução trabalho de ABTS[•], por fim perpez-se o volume com água destilada até aos 2,2mL.

Este ensaio foi realizado em triplicado.

Aguardou-se 15 minutos para se ler a absorvância a 734nm.

Após o cálculo da percentagem de inibição para cada uma das soluções padrão, e sua representação em função da concentração de Trolox, calculou-se a TEAC (μmol de Trolox.mg⁻¹ ou mL de amostra).

II.5 Parâmetros Microbiológicos

II.5.1 Material Vegetal / Preparação dos Extratos

Nos capítulos anteriores descreveram-se as metodologias de obtenção dos extratos hidro-etanólicos (30:70) (v/v) os quais foram avaliados quanto à composição química e à atividade antioxidante. Os mesmos extratos foram avaliados quanto à presuntiva atividade antimicrobiana. Dado que as metodologias de extração foram idênticas, remete-se a preparação deste extrato, que será identificado como EHE (Extrato Hidro-Etanólico) para o ponto II.4.5.6.1 do capítulo II.

Testou-se ainda a atividade de extratos etanólicos (100% etanol) que serão identificados como EE. Os EE foram obtidos colocando 20g de material vegetal moído, folhas jovens e folhas adultas, em dois balões Erlenmeyer aos quais se adicionou 80mL de etanol a 100%. Os balões assim preparados foram incubados à temperatura ambiente, com agitação, durante 48h, após o que se procedeu à filtração da solução com papel de filtro (1mm de porosidade). O filtrado foi evaporado em evaporador rotativo a 80°C, de modo a retirar-se todo o etanol. O extrato obtido foi ressuspense em 50mL de água destilada e liofilizado durante uma semana. Este produto foi finalmente ressuspense em DMSO (10mg.mL⁻¹) (p/v) e esterilizado por filtração com filtros 0,22µm para garantir que apenas as espécies a serem analisadas cresçam no meio agarizado, depois foram armazenados a 4°C até à sua utilização.

Para o extrato EHE procedeu-se à realização de dois ensaios tendo sido avaliadas para cada conjunto ano/colheita/jovens/adultas/frescas/secas amostras equivalentes a n=9. Em cada ensaio apresentam-se resultados do efeito isolado dos extratos e do efeito potenciador com fluconazole.

A realização de ensaios de avaliação de atividade antimicrobiana com os extratos EE teve como objetivo testar uma concentração final de extrato superior, por se ter verificado pela bibliografia disponível que vários trabalhos usaram massa total superior à usada para preparar os extratos EHE. Dado não existir material biológico suficiente para repetir a extração com as amostras que serviram para fazer o EHE, recolheram-se novas folhas, jovens e adultas, que foram utilizadas, apenas frescas, para a preparação do EE. Este foi igualmente testado contra os isolados de espécies *Candida* e das bactérias. Os extratos de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana, relativamente ao 1º Ensaio e 2º Ensaio foram organizados em folhas jovens (frescas e secas) e folhas adultas (frescas e secas) de junho e de setembro, todas elas em réplicas de três.

II.5.2 Protocolos Padrão do NCCLS

II.5.2.1 Inibição do Crescimento - Medição Halo de Inibição

O teste de difusão com disco em agar foi descrito em 1966, por Kirby e Bauer. Este fornece resultados qualitativos. É um dos métodos de avaliação da suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia. O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano a testar na superfície do agar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano. A difusão do composto leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano. Este método é qualitativo, ou seja, permite classificar a amostra bacteriana em suscetível, suscetível dose dependente ou resistente (Sejas *et al.*, 2002; Hudzicki, 2009; Reller *et al.*, 2009).

Para a execução da técnica, uma placa de Petri contendo meio sólido é inoculada com uma cultura do organismo teste. Concentrações conhecidas do agente antimicrobiano são adicionadas a discos de papel de filtro, os quais são colocados sobre a superfície do meio sólido. Durante a incubação, o agente difunde-se do disco para agar, estabelecendo um gradiente: quanto maior a distância de difusão do composto químico a partir do papel de filtro, menor a concentração do agente. Numa determinada distância ao disco, a Concentração Mínima Inibitória- MIC (do Inglês Minimum Inhibitory Concentration) efetiva é alcançada.

A partir desse ponto o crescimento do microrganismo pode ocorrer, ainda que próximo ao disco o crescimento não seja observado. Uma zona de inibição é criada, cujo diâmetro é proporcional à quantidade de agente antimicrobiano adicionado ao disco, à solubilidade do agente, ao coeficiente de difusão e à eficiência global do agente. A técnica de difusão em disco é utilizada rotineiramente nos testes de suscetibilidade aos agentes farmacológicos (Nascimento *et al.*, 2000; Barry *et al.*, 2002; Hayouni *et al.*, 2008; Madigan *et al.*, 2009; Jorgensen *et al.*, 2009; Reller *et al.*, 2009; Endo *et al.*, 2010; Carvalhinho *et al.*, 2012; Stagos *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2015).

II.5.2.2 Inibição do Crescimento - Microdiluição em Caldo

Um dos primeiros métodos para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana foi o teste de diluição em caldo (Reller *et al.*, 2009; Pozzo *et al.*, 2011).

Esta metodologia relaciona a proporção de crescimento do microrganismo em estudo no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência (Ostrosky *et al.*, 2008; Endo *et al.*, 2010).

Este procedimento envolve a preparação de diluições dos antibióticos num meio de crescimento líquido distribuído em tubos de ensaio. Os tubos contendo o antibiótico são inoculados com uma suspensão bacteriana padronizado de $1-5 \times 10^5 \text{CFU.mL}^{-1}$. A seguir à incubação durante a noite a 35°C, analisa-se a sua turbidez que evidencia ou não o crescimento bacteriano. A concentração mais baixa de antibiótico que impede o crescimento representa a concentração mínima inibitória (MIC) (Ostrosky *et al.*, 2008; Jorgensen *et al.*, 2009; Reller *et al.*, 2009; Endo *et al.*, 2010; Pozzo *et al.*, 2011).

Este método fornece resultados quantitativos e não influenciáveis pela velocidade de crescimento dos microrganismos. A sua principal desvantagem é a dificuldade na deteção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos e na dificuldade da preparação das diluições dos antibióticos (Ostrosky *et al.*, 2008; Jorgensen *et al.*, 2009). Para minimizar algumas destas desvantagens, o NCCLS desenvolveu e padronizou um protocolo de determinação da MIC usando uma metodologia cujo princípio teórico é igual ao descrito acima, mas usa volumes menores de meio de cultura e pode ser realizado num espaço muito menor, como as placas de 96 poços (NCCLS, 2004b - M27-A2).

II.5.3 Métodos de Avaliação da Atividade Microbicida

II.5.3.1 Preparação dos Meios de Cultura

II.5.3.1.1 Sabouraud Dextrose Agar

Adicionou-se até perfazer um volume de 1L de água destilada: 65g de Sabourad mexeu-se vigorosamente e aqueceu-se até ao ponto de ebulição. Distribuiu-se em erlenmeyers e foi à autoclave durante 15min a 121°C e 15 psi. Posteriormente distribuiu-se pelas placas de Petri cerca de 20mL por placa. Estas foram deixadas em repouso durante um período mínimo de 24h, de maneira a que o meio solidificasse, apresentando o meio agarizado uma altura de 4mm (Atlas, 1993).

II.5.3.1.2 Yeast Malt Agar

O meio de cultura utilizado para o crescimento e manutenção das leveduras foi o de malte agarizado, YMA, caldo da DifcoTM. Adicionou-se até perfazer um volume de 1L de água destilada: 20g de agar, 10g de glucose, 5g de peptona, 3g de extrato de levedura e 3g de extrato de malte, mexeu-se vigorosamente e aqueceu-se até ao ponto de ebulição. Distribuiu-se em erlenmeyers e foi à autoclave durante 15min a 121°C e 15psi. Posteriormente distribuiu-se pelas placas de Petri cerca de 20mL por placa. Estas foram deixadas em repouso

durante um período mínimo de 24h, de maneira a que o meio solidificasse, apresentando o meio agarizado uma altura de 4mm, antes de efetuar-se o antibiograma (Atlas, 1993).

II.5.3.1.3 Meio de Mueller Hinton II (MHII)

Adicionou-se até perfazer um volume de 1L de água destilada: 38g de Mueller Hinton II, Gélose Muller Hintton 2 (MH2-D) da bioMérieux® SA em pó (encontra-se em anexo) (pH: $7,4 \pm 0,2$ a 25°C) mexeu-se vigorosamente e aqueceu-se com agitação até ao ponto de ebulição. No meio de cultura utilizado para as leveduras adicionou-se 20g de glucose segundo as normas NCCLS (2004a). Distribuiu-se em erlenmeyers e foi à autoclave durante 15min a 121°C e 15psi. Posteriormente dividiu-se pelas placas de Petri cerca de 20mL por placa. Estas foram deixadas em repouso durante um período mínimo de 24h, de maneira a que o meio solidificasse, apresentando o meio agarizado uma altura de 4mm (Atlas, 1993).

II.5.3.1.4 Meio de Mueller Hinton II com Fluconazole (MHIF)

Procedeu-se do mesmo modo que no ponto II.5.3.1.3. Posteriormente adicionou-se 15mg de fluconazole e dividiu-se pelas placas de Petri cerca de 20mL por placa. Estas foram deixadas em repouso durante um período mínimo de 24h, de maneira a que o meio solidificasse, apresentando o meio agarizado uma altura de 4mm (Endo *et al.*, 2010).

II.5.3.1.5 Nutrient Agar

Adicionou-se até perfazer um volume de 1L de água destilada: 15g agar, 5g peptona, 5g NaCl, 2g extrato de levedura e 1g extrato de caldo (pH: $7,4 \pm 0,2$ a 25°C), mexeu-se vigorosamente e aqueceu-se com agitação até ao ponto de ebulição. Distribuiu-se em erlenmeyers e foi à autoclave durante 15min a 121°C e 15psi. Posteriormente dividiu-se pelas placas de Petri esterilizadas cerca de 20mL por placa (Atlas, 1993).

II.5.3.1.6 Oxford Agar (*Listeria Selective Agar*, Oxford)

Adicionou-se até perfazer um volume de 990mL de água destilada: 23g de peptona 15g LiCl, 10g agar, 5g NaCl, 1g *Cornstarch*, 1g *Esculin* e 0,5g citrato de amónio férrico (pH $7,0 \pm 0,2$ a 25°C). Mexeu-se vigorosamente e aqueceu-se com agitação até ao ponto de ebulição. Distribuiu-se em erlenmeyers e foi à autoclave durante 15min a 121°C e 15psi. Posteriormente adicionou-se 10mL de antibiótico e mexeu-se vigorosamente, dividiu-se pelas placas de Petri esterilizadas (Atlas, 1993).

II.5.3.2 Material Microbiano e Preparação do Inóculo

As amostras de extratos etanólicos de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* foram testados individualmente contra 6 espécies de microrganismos, 3 leveduras das espécies *Candida albicans* (ATCC 90029), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida oleophila* (isolado da UTAD classificado por sequenciação genética como *C. oleophila* strain type) e 3 bactérias das espécies *Escherichia coli* (0157H7607914), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 679) (crescida em meio oxford). Os inóculos das *Candidas* pertencem à coleção do Laboratório de Microbiologia do DeBA, e os inóculos das bactérias pertencem à coleção do Laboratório de Microbiologia do DCV da UTAD tendo sido gentilmente cedidas pela Prof^a Dra. Alexandra Esteves.

Os inóculos foram preparados de acordo com as recomendações do NCCLS, tendo as culturas prévias sido reanimadas por estriamento em meio de Nutrient Agar (NA; Biokar, France) a 37°C para os isolados de *E. coli* e *S. aureus*, e Meio Oxford para *L. monocytogenes* e as leveduras em Yeast Malt Agar (YMA; Difco, UK) a 30°C. Quando as colónias ficaram visíveis e um dia antes do ensaio, foram repicadas em Sabouraud Dextrose Agar *overnight* a 37°C ± 2°C.

No dia da incubação prepararam-se tubos de ensaio com 5mL solução salina (0,85%NaCl) (p/v) onde se suspenderam 5 colónias com aproximadamente 1mm de diâmetro. Vortexou-se durante 14s e ajustou-se a turbidez visualmente, adicionando solução salina ou mais colónia, até um valor 0,5 da escala de Mc Farland que corresponde a $\approx 1 \times 10^6$ a 5×10^6 células.mL⁻¹, segundo as normas do protocolo M44-A NCCLS (2004a), realizando-se 3 repetições para cada situação.

II.5.3.2.1 Inoculação das Placas de *Mueller Hinton II*

De acordo com o protocolo, 15 min após o ajuste do inóculo, mergulhou-se uma zaragatoa estéril na suspensão salina, rodou-se e pressionou-se a mesma contra as paredes do vidro acima do líquido, para remover o excesso de líquido. Inoculou-se a superfície do meio de cultura Muller-Hinton II, fazendo estrias uniformemente em toda a superfície da placa. Repetiu-se este procedimento 2 vezes, rodando 60° a placa, de maneira a garantir uma distribuição uniforme do inóculo. Realizaram-se três repetições por tratamento.

II.5.3.2.2 Preparação/Aplicação dos Discos de Difusão

Colocaram-se os discos (6mm de diâmetro) esterilizados na superfície da placa inoculada, pressionou-se ligeiramente para garantir o contacto total do disco com a superfície total do agar. Posteriormente impregnou-se com 15µL de cada extrato vegetal.

Como controlo negativo utilizou-se um disco impregnado com DMSO, e como controlo positivo utilizou-se 25µg do antifúngico fluconazole.

Colocaram-se as placas invertidas numa incubadora a 35°C, num período máximo de 15min após colocação dos discos. A verificação do crescimento foi efetuada após 24h de incubação. No final deste período, quando não se verificou crescimento, deixou-se a incubar por mais 24h. No final das 24h ou 48h, mediram-se os halos de inibição com uma régua, desde o centro do disco à periferia dos halos e registaram-se os resultados numa tabela.

Todos estes procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical de Classe II em condições de assépsia.

II.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico através do programa *Statistical Package for the Social Science* versão 20 para *Windows* (SPSS, Inc. Chicago, IL).

As variáveis dependentes foram analisadas recorrendo à análise de variância (ANOVA), com correção de Welch, sempre que os pressupostos da normalidade e homogeneidade de variâncias não eram cumpridos e, quando estes se verificavam foi aplicado o teste post-hoc HSD de Tukey. No teste com correção de Welch, sempre que se observou um efeito significativo ($p < 0,05$) recorreu-se ao teste de Dunnett T3's. O pressuposto da distribuição normal foi avaliado com recurso aos testes Shapiro-Wilk, ($n < 50$) ou Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors ($n > 50$) e para o pressuposto da homogeneidade de variâncias este foi avaliado pelo teste de Levene .

De referir que para os resultados obtidos foram considerados:

- Não significativos, para valores de $P > 0,05$;
- Estatisticamente significativos para um nível de probabilidade de $P < 0,05$, vulgarmente designado por significativo;
- Estatisticamente significativos para um nível de probabilidade de $P < 0,01$, habitualmente designado por muito significativo;

- Estatisticamente significativos para um nível de probabilidade de $P < 0,001$, vulgarmente designado por altamente significativo.

As análises de componentes principais foram desenvolvidas através de matrizes de correlação, e em todos os casos foi extraído um número de componentes principais igual ao número de variáveis, descrevendo necessariamente 100% da variância; sendo que os dois primeiros componentes principais permitiram em todos os casos explicar mais de 98% da variância entre amostras. De forma a remover desta análise a influência devida às distintas ordens de grandeza de cada uma das variáveis, todos os valores utilizados na mesma foram estandardizados.

Adicionalmente, foram levadas a cabo análises de similaridade entre amostras através de dendograma, produzido com as distâncias euclidianas entre cada grupo, que foram calculadas recorrendo aos valores registados para os parâmetros, normalizados, de entre 0,0 para o mínimo, e 1,0 para o valor máximo.

Todas as análises mencionadas foram levadas a cabo com recurso ao programa OriginPro, versão 9.1, da *OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA*.

Capítulo III. Resultados e Discussão

III.1 Parâmetros Morfoanatômicos

A folha é por excelência a estrutura fotossintética e reguladora da transpiração. Assim sendo, adota uma grande variedade de morfologias de complexa caracterização ao nível da organografia externa (Crespi, 1998). Ao nível histológico e composta por vários tecidos muito organizados, adaptados para a absorção máxima possível de luz, de modo a favorecer a fotossíntese (Solomon *et al.*, 2014). A superfície externa da lâmina foliar é composta por tecido epidérmico e o interior por parênquimas clorofilinos, que formam o mesófilo fotossintético (Glimn-Lacy *et al.*, 2006) e ainda feixes condutores contendo xilema e floema.

A sua capacidade fotossintética está relacionada com o potencial de produção primário da planta e, que em grande extensão, determina a habilidade competitiva desta (Castro-Díez *et al.*, 2000). Por este motivo, a estrutura interna e externa das folhas está adaptada a esta função: é plana e fina, permitindo a entrada da radiação solar até às suas células clorofilinas. No entanto, este órgão é variável em estrutura e função, dependendo da espécie e do ambiente onde se desenvolve (Lawlor, 1993; Solomon *et al.*, 2014), uma vez que são os principais órgãos de assimilação na maioria das plantas superiores (Castro-Díez *et al.*, 2000).

Assim, foi efetuada uma caracterização das folhas de *S. officinalis* L. var. *purpurascens*, de modo a avaliar eventuais diferenças morfo anatômicas causadas pelos fatores em estudo. Na Figura 25 observa-se que a folha adulta (Figura 25A) apresenta feixes condutores muito mais desenvolvidos, principalmente com maior quantidade de xilema, do que o observado em folhas jovens (Figura 25B).

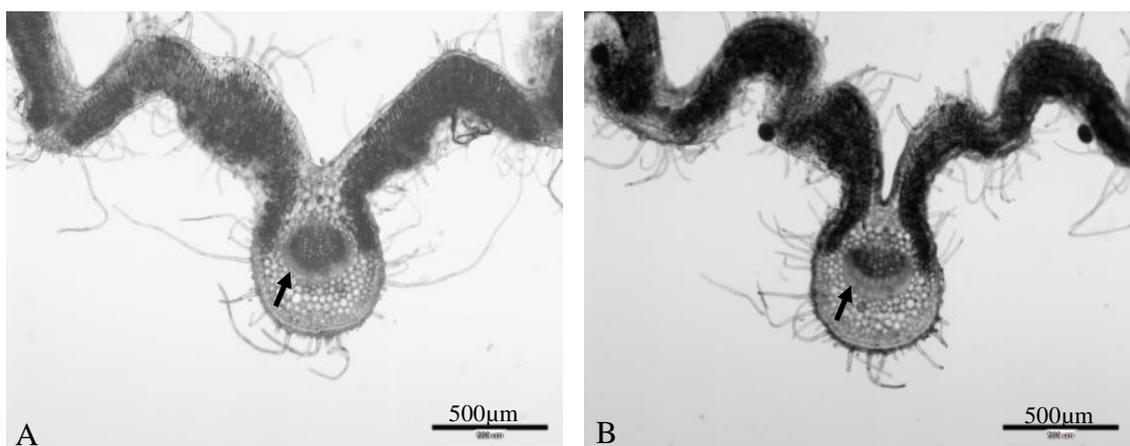


Figura 25 - Cortes transversais em fresco de *S. officinalis* L. var. *purpurascens* de uma folha adulta (500µm) (A); folha jovem (500µm) (B)

Nas características e na distribuição das estruturas internas da folha, não foram observadas diferenças entre os dois estádios de desenvolvimento analisados.

A lâmina dos dois estádios em estudo apresentou-se com uma característica morfológica ondulada (Figura 25A e B), característica esta, corroborada por Harley *et al.* (2004) que caracterizam o género *Salvia* como uma planta bifacial ou dorsiventral possuidora de um mesófilo heterogéneo (Figura 26A, B, C e D).

Nesta espécie o parênquima clorofilino em paliçada apresentou-se junto à epiderme da face adaxial, sendo constituído por células alongadas e com elevado número de cloroplastos. Já o parênquima clorofilino lacunoso surge próximo da epiderme da face abaxial, sendo constituído por células de formato mais irregular, com menos cloroplastos e com lacunas entre elas (Figura 26C e D).

Devido à grande área exposta à atmosfera, a folha está sujeita a perder água por transpiração. Com o objetivo de evitar esta perda e de fornecer proteção mecânica, as camadas de células epidérmicas que cobrem a superfície abaxial e adaxial das folhas do género *Salvia* são cutinizadas (Cutler *et al.*, 2008). De facto a epiderme é unisseriada nas duas faces, constituída essencialmente, por cutina e ceras na superfície externa. A ausência de cloroplastos provoca nestas células uma coloração transparente, visível na Figura 26B.

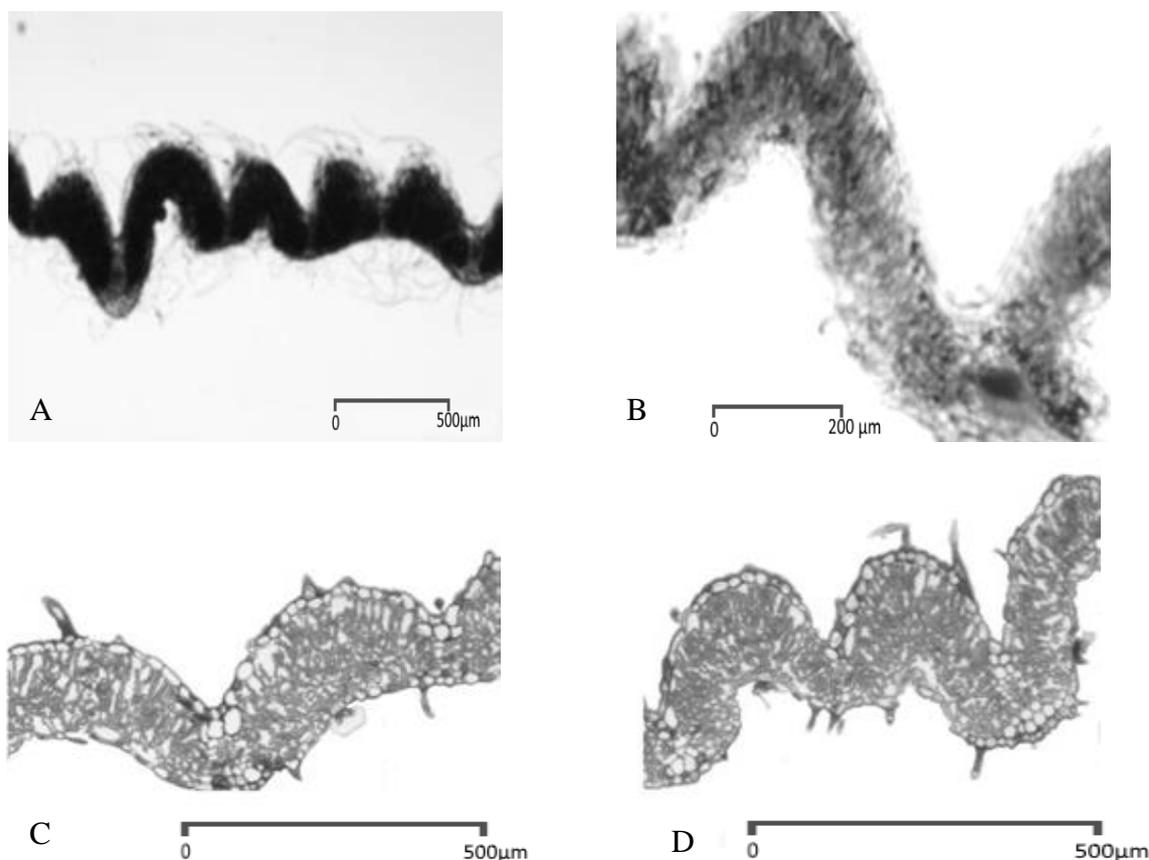


Figura 26 - Cortes transversais de *S. officinalis* L. var. *purpurescens* em fresco de uma folha jovem evidenciando a lâmina ondulada e os numerosos tricomas (500µm) (A); em fresco de uma folha adulta evidenciando o parênquima clorofilino em paliçada e o parênquima clorofilino lacunoso (200µm) (B); Preparação definitiva da lâmina de uma folha adulta (C); Preparação definitiva da lâmina de uma folha jovem (D)

Os estomas são pequenas aberturas localizadas na maioria dos órgãos aéreos das plantas sendo responsáveis pelas trocas gasosas com o exterior. O complexo estomático é formado por uma abertura, o ostíolo, ao qual estão associadas 2 células guarda, estomáticas, ostiolares ou oclusivas (Meyer, 1983; Moreira, 1993).

Os estomas dos dois estádios de desenvolvimento em estudo localizam-se ao mesmo nível das demais células epidérmicas, onde se nota a câmara estomática (Figura 27C). Ocorrem em toda a lâmina foliar e podem ser encontrados em ambas as faces da epiderme, sendo que na face abaxial são em maior quantidade relativamente à face adaxial.

Nos diversos cortes definitivos e em fresco, quer observados em microscópio ótico quer em microscópio eletrônico de varrimento, encontraram-se estomas reniformes que apresentam uma forma semelhante a um rim como pode ser observado na Figura 27A e B. A distribuição estomática é do tipo hipostomático, sendo, segundo Moreira (1993), o mais comum na classe Magnoliopsida. A baixa presença de estomas na face adaxial, essencialmente, restritos à face abaxial pode estar relacionada com a intensa radiação e a deficiência de água do meio, como sugerido por Fahn (1990).

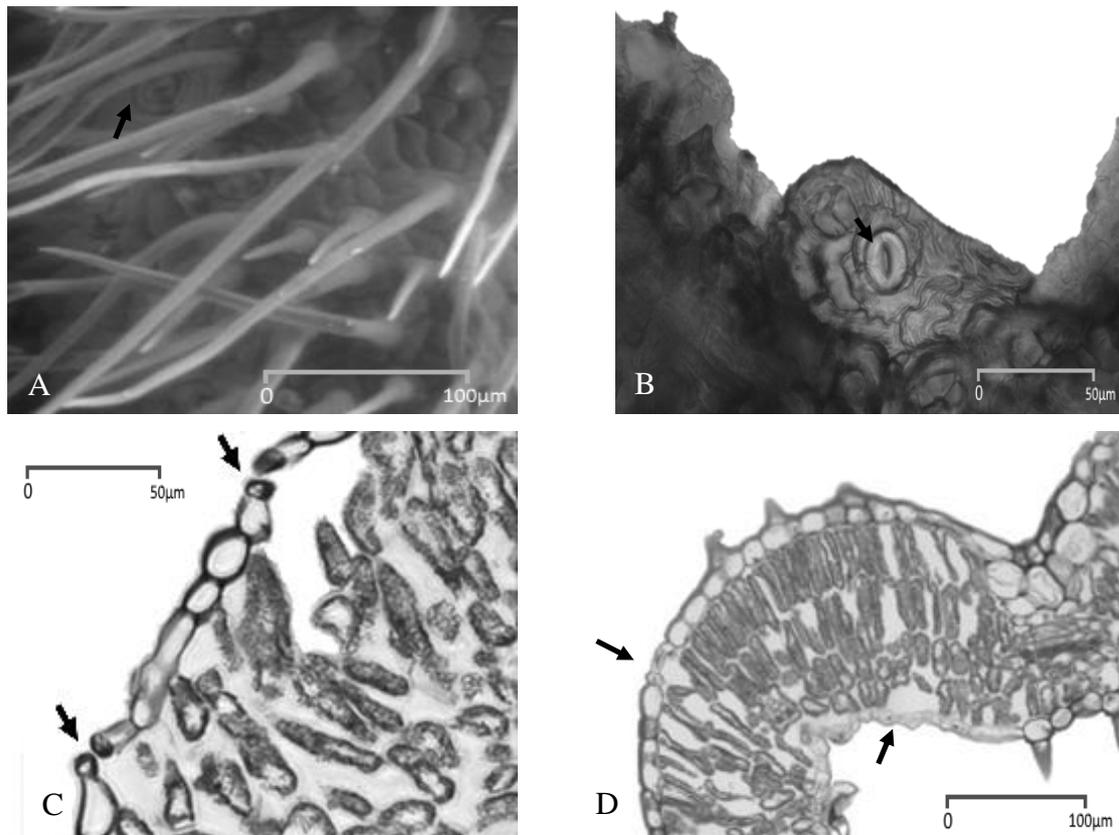


Figura 27 - Estomas reniformes de *S. officinalis* L. var. *purpurascens* visto por MEV em folhas adultas (100µm) (A); assim como em cortes em fresco (50µm) (B); cortes definitivos (50µm) (C) e de folhas jovens (100µm) (D)

Os tricomas são estruturas epidérmicas, que podem apresentar-se como uni ou pluricelulares (Figura 28 e Figura 29). São geralmente, estruturas simples, com uma ampla variação quanto à forma, ao tamanho, ao conteúdo e, principalmente, quanto à função (Moreira, 1993; Ascensão *et al.*, 1995; Avato *et al.*, 2005). São classificados como glandulares (secretores) ou não glandulares.

Os tricomas não glandulares formam, geralmente, uma densa cobertura, podendo servir de barreira mecânica contra vários fatores externos como, por exemplo, herbívoros, agentes infecciosos, radiação ultravioleta, calor extremo e perda excessiva de água por transpiração; enquanto que os tricomas glandulares estão envolvidos com a proteção química, através da libertação de substâncias lipofílicas (Fahn, 1990; Corsi *et al.*, 1999).

A presença de secreções na superfície dos órgãos está associada à presença de tricomas glandulares. Estes tricomas com função de secreção caracterizam-se por apresentarem protoplastos com citoplasma abundante e altamente granuloso (Moreira, 1993; Ascensão *et al.*, 1995; Corsi *et al.*, 1999; Avato *et al.*, 2005). A cabeça geralmente é a porção secretora do tricoma. A secreção pode ser acumulada entre a(s) célula(s) da cabeça e a cutícula, com o rompimento desta, a secreção é libertada através de poros existentes na parede (Corsi *et al.*, 1999).

As observações realizadas em ambos os estádios de desenvolvimento das folhas (jovens e adultas) revelaram a existência de vários tipos de tricomas, tricomas glandulares (Figura 29A, B e D), septados (Figura 28A) e tricomas não glandulares (Figura 29C). A presença de mais de um tipo de tricoma no mesmo órgão vegetal, ou na mesma planta, já foi relatado para diversas espécies da família Lamiaceae como, por exemplo *Leonotis leonurus* (Ascensão *et al.*, 1998) e *Plectranthus ornatus* (Ascensão *et al.*, 1999). Cutler *et al.* (2008) identificaram no género *Salvia* tricomas bicelulares e multicelulares. Ainda segundo os mesmos autores, os tricomas glandulares diferenciam-se logo no início do desenvolvimento foliar e vão formando-se novos ao longo de toda a maturação.

A Figura 29C mostra a abundância de tricomas pluricelulares na superfície adaxial da folha de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* em MEV; esta observação explica a extrema suavidade das folhas da salva rubra ao toque.

A grande densidade de tricomas glandulares e não glandulares em plantas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* pode constituir uma proteção contra agentes infecciosos e a herbívoros, pois é uma planta espontânea de grande dispersão.

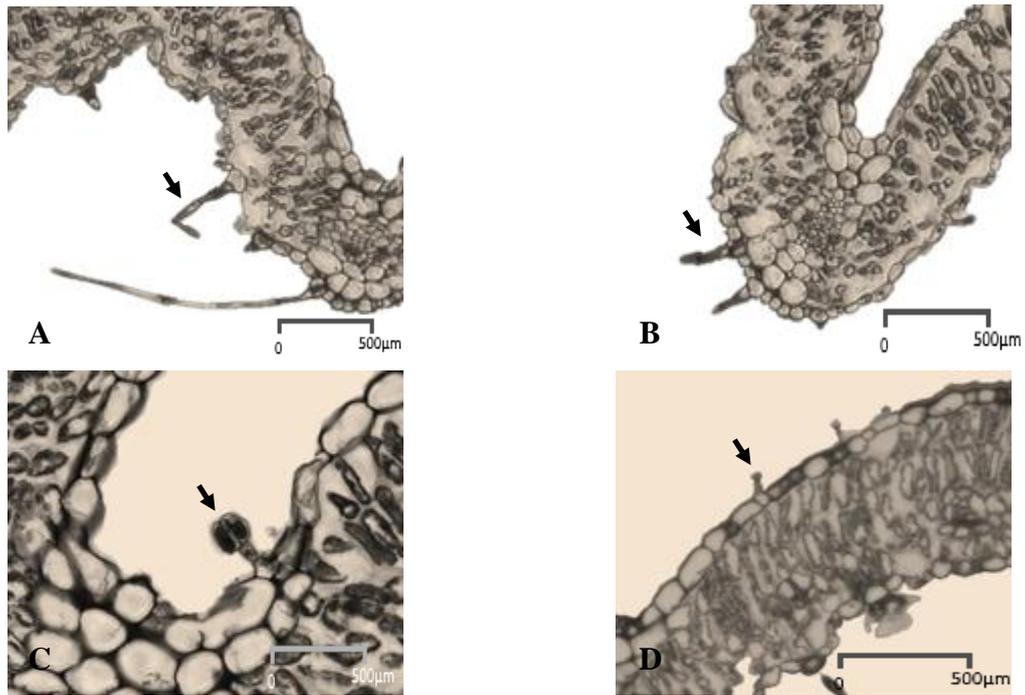


Figura 28 - Detalhe de um tricoma pluricelular (500µm) (A); tricoma unicelular (500µm) (B); tricoma capitado glandular com cabeça bicelular (50µm) (C); tricoma capitado glandular com cabeça unicelular (200µm) (D); localizados em cortes definitivos de folhas jovens de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*

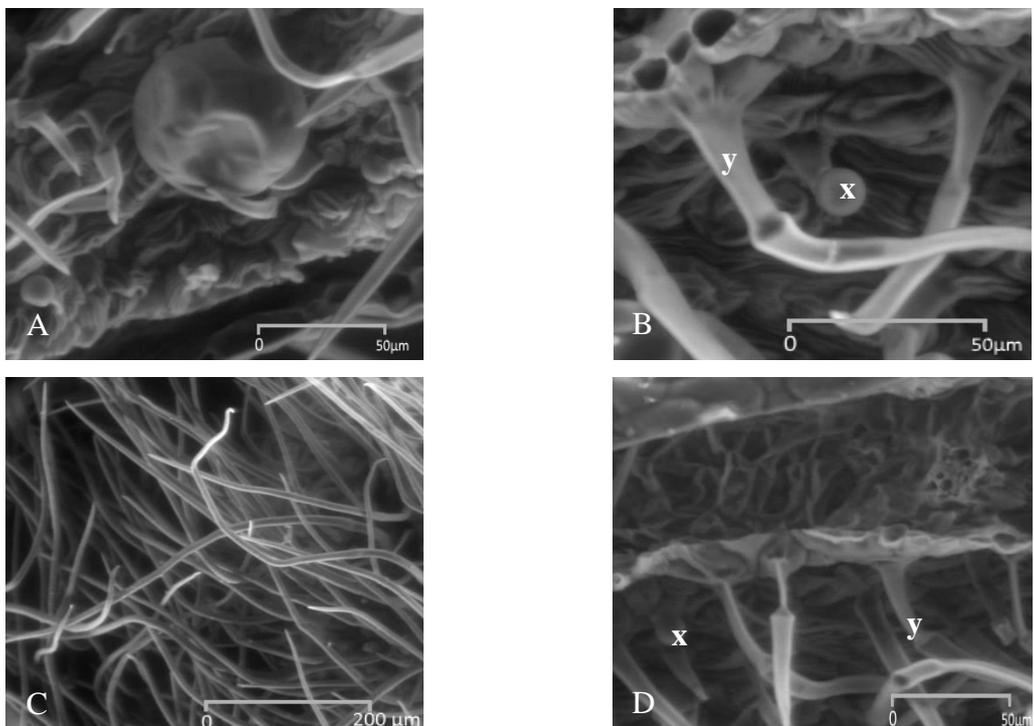


Figura 29 - Glândula (A); tricoma capitado glandular com cabeça unicelular (x), tricoma capitado não glandular pluricelular (y) (B, D) presente na página inferior de uma folha adulta; tricomas pluricelulares presentes na página superior de uma folha jovem de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* em MEV (C)

Tal como anteriormente referido, entre as duas epidermes existe o mesófilo formado por algumas camadas de parênquima clorofilino. O parênquima participa em várias funções vitais para a planta, tais como a fotossíntese, respiração e constituição de reservas. Este facto é explicado pela larga representação que tem na planta e pela reduzida diferenciação que a maioria destes tecidos apresenta (Moreira, 1993).

Nas Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5, apresentam-se os valores médios da espessura dos diferentes tecidos de folhas jovens e adultas dos dois anos em estudo.

Pela análise da Tabela 3, referente ao ano de 2011, observaram-se diferenças significativas nas espessuras do parênquima clorofilino em paliçada (PCE), do parênquima clorofilino lacunoso (PCL) e mesófilo, com valores superiores em folhas adultas, que irão refletir-se numa maior espessura da lâmina total (LT).

Também Gratani *et al.* (2000), registaram um incremento da espessura da LT com um aumento da expansão foliar em *Quercus ilex*. Não se registaram diferenças significativas nas espessuras da epiderme e da cutícula da página adaxial (ES e CS respetivamente), bem como na epiderme e cutícula da página abaxial (EI e CI repetivamente).

De salientar que a espessura do PCE é sempre superior à do PCL, tanto em folhas jovens como em adultas, o que resulta numa razão PCE/PCL superior a 1 nos dois estádios de desenvolvimento.

O PCE permite que uma maior quantidade de luz chegue aos cloroplastos, depreendendo-se assim, que as folhas adultas, que apresentam diferenças significativas, relativamente às folhas jovens, possuem um aparelho fotossintético mais desenvolvido com taxas de assimilação líquida de CO₂ ligeiramente superiores (Tabela 11).

Registaram-se ainda diferenças significativas ao longo do verão, nomeadamente uma diminuição da espessura da ES CS, mas um aumento da espessura do mesófilo associado ao aumento do PCL, como consequência, houve um aumento da espessura da LT.

Relativamente à interação da modalidade estágio de desenvolvimento x data, observou-se uma diminuição, na espessura da LT da primeira para a segunda data de colheita nas folhas jovens, principalmente devido ao decréscimo da espessura do PCE. Já as folhas adultas apresentaram um aumento da espessura da LT ao longo do verão associado ao aumento do PCL e PCE.

Tabela 3 - Espessura dos diferentes tecidos (epiderme e cutícula superior - ES CS, parênquima clorofilino em paliçada - PCE, parênquima clorofilino lacunoso - PCL, epiderme e cutícula inferior - EI CI, lâmina total - LT, mesófilo e PCE/PCL) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ciclo vegetativo de 2011

	ES CS (μm)	PCE (μm)	PCL (μm)	EI CI (μm)	Mesófilo (μm)	LT (μm)	PCE/PCL
Estádio de Desenvolvimento (ED)							
Folhas Jovens (FJ)	19,12 \pm 2,88	76,11 \pm 12,00	62,31 \pm 12,00	17,54 \pm 4,95	138,42 \pm 23,29	175,01 \pm 25,32	1,3 \pm 0,52
Folhas Adultas (FA)	18,51 \pm 3,09	94,21 \pm 13,75	72,46 \pm 13,75	17,61 \pm 4,03	166,51 \pm 25,46	202,63 \pm 26,64	1,3 \pm 0,36
Data (D)							
junho (1D)	19,63 \pm 3,05	84,91 \pm 12,76	61,47 \pm 18,41	17,83 \pm 4,82	146,24 \pm 24,00	183,52 \pm 26,26	1,4 \pm 0,47
setembro (2D)	18,02 \pm 2,93	85,48 \pm 15,41	73,31 \pm 16,92	17,37 \pm 4,64	158,78 \pm 29,96	194,10 \pm 32,19	1,2 \pm 0,43
EDx D							
FJ x 1D	20,17 \pm 2,93	79,29 \pm 11,72	60,22 \pm 14,35	17,58 \pm 4,97	139,43 \pm 22,44	177,14 \pm 25,30	1,3 \pm 0,52
FJ x 2D	18,06 \pm 2,80	73,03 \pm 11,70	64,33 \pm 16,30	17,52 \pm 4,99	137,34 \pm 24,41	172,80 \pm 25,55	1,3 \pm 0,51
FA x 1D	19,03 \pm 2,97	90,55 \pm 12,31	62,50 \pm 13,04	18,13 \pm 4,43	153,06 \pm 24,00	190,03 \pm 26,26	1,5 \pm 0,47
FA x 2D	18,01 \pm 3,06	97,82 \pm 15,02	82,36 \pm 17,85	17,11 \pm 3,70	180,11 \pm 29,96	215,36 \pm 32,19	1,2 \pm 0,43
Valor de p							
ED	0,3140	0,0010	0,0030	0,8870	0,0010	0,0010	0,6600
D	0,0110	0,7940	0,0010	0,4470	0,0060	0,0230	0,0610
EDx D	0,3060	0,0020	0,0170	0,4260	0,0020	0,0020	0,3400

Nota - Valores médios ($n=8$) \pm desvio padrão

No ano 2013, os valores da espessura dos diferentes tecidos foliares variaram à semelhança do sucedido em 2011. Verificou-se um aumento significativo do PCE e PCL, bem como de EI CI, consequentemente observou-se um aumento do mesófilo das folhas jovens para as folhas adultas.

Quanto ao efeito da data, há a registrar um aumento da espessura da ES e a diminuição de CI e da razão PCE/PCL entre junho e setembro

Quanto à interação estágio de desenvolvimento x data, apenas se mostraram significativas as alterações relativamente à espessura da CS, havendo uma diminuição de junho para setembro em folhas jovens, sendo o contrário observado em folhas adultas.

Tabela 4 - Espessura dos diferentes tecidos (epiderme e cutícula superior - ES CS, parênquima clorofilino em paliçada - PCE, parênquima clorofilino lacunoso - PCL, epiderme e cutícula inferior - EI CI, lâmina total - LT, mesófilo e PCE/PCL) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ciclo vegetativo de 2013

	ES (μm)	CS (μm)	PCE (μm)	PCL (μm)	EI (μm)	CI (μm)	Mesófilo (μm)	LT (μm)	PCE/ PCL
Estádio de Desenvolvimento (ED)									
Folhas Jovens (FJ)	14,26 \pm 2,77	4,13 \pm 1,24	62,40 \pm 11,46	39,91 \pm 10,90	7,59 \pm 2,50	0,63 \pm 0,27	104,66 \pm 17,86	137,56 \pm 19,02	1,68 \pm 0,52
Folhas Adultas (FA)	14,24 \pm 3,11	3,71 \pm 1,38	71,56 \pm 8,95	52,90 \pm 13,33	9,46 \pm 3,02	1,57 \pm 0,91	127,02 \pm 16,49	164,47 \pm 20,43	1,44 \pm 0,42
Data (D)									
junho (1D)	13,60 \pm 2,76	3,95 \pm 1,43	68,60 \pm 10,71	43,90 \pm 13,06	7,94 \pm 2,47	1,51 \pm 0,93	112,66 \pm 18,84	148,96 \pm 22,24	1,69 \pm 0,53
setembro (2D)	14,83 \pm 2,96	3,92 \pm 1,22	65,40 \pm 11,51	47,91 \pm 14,07	8,94 \pm 3,18	0,69 \pm 0,41	117,43 \pm 21,80	151,36 \pm 25,24	1,46 \pm 0,43
EDx D									
FJ x 1D	13,97 \pm 2,37	4,50 \pm 1,21	65,65 \pm 11,36	38,13 \pm 10,09	7,47 \pm 2,32	0,96 \pm 0,59	103,78 \pm 15,61	139,13 \pm 19,16	1,84 \pm 0,55
FJ x 2D	14,56 \pm 3,14	3,76 \pm 1,16	59,97 \pm 11,04	41,69 \pm 11,56	7,71 \pm 2,71	0,30 \pm 0,20	105,54 \pm 20,12	136,02 \pm 19,12	1,53 \pm 0,46
FA x 1D	13,13 \pm 3,18	3,25 \pm 1,40	72,39 \pm 8,66	51,31 \pm 12,88	8,54 \pm 2,59	2,21 \pm 1,38	124,07 \pm 16,56	161,60 \pm 19,70	1,50 \pm 0,46
FA x 2D	15,10 \pm 2,81	4,08 \pm 1,29	70,91 \pm 9,28	54,13 \pm 13,77	10,17 \pm 3,18	1,08 \pm 0,76	129,32 \pm 16,37	166,70 \pm 21,07	1,39 \pm 0,38
Valor de P									
ED	0,7991	0,0642	0,0001	0,0001	0,0016	0,0001	0,0001	0,0001	0,0120
D	0,0278	0,8609	0,1560	0,1410	0,0881	0,0001	0,2420	0,6140	0,0180
ED x D	0,2322	0,0024	0,3060	0,8780	0,2062	0,1453	0,6130	0,2990	0,3070

Nota - Valores médios ($n=8$) \pm desvio padrão

O ano de colheita foi o fator que mais contribuiu para variações significativas nas espessuras dos tecidos da folha (Tabela 5), com variações anuais detetadas em quase todos os parâmetros avaliados, com a exceção da espessura da ES. Para a maioria deles, os valores

foram maiores em 2011 (PCE, PCL, mesófilo, EI e LT), enquanto a razão PCE/PCL foi o único parâmetro, daqueles, significativamente influenciado pelo fator ano. A ontogenia também influenciou a espessura dos tecidos, com maiores valores registados nas folhas adultas, em comparação com as mais jovens, nomeadamente para a espessura do PCL, PCE, mesófilo e EI CI, que, posteriormente influenciaram a lâmina total da folha, valores estes, corroborados pelo corte histológico apresentado na Figura 25A.

Os dados relativos a essas características específicas em folhas de *Salvia officinalis* são muito escassos, e aqueles disponíveis na bibliografia científica são bastante diferentes. Por um lado, Nasta *et al.* (2014), mostra valores de espessura da folha de 0,46mm, no caso folhas de 83 dias de idade, enquanto Yi e Wetzstein (2010) valores de $471\pm 51\mu\text{m}$ ou $517\pm 47\mu\text{m}$, para folhas de 4 meses de idade para plantas cultivadas no campo ou em casa respetivamente. O trabalho de Nasta *et al.* (2014) também mostra diferenças na espessura da folha de acordo com a sua idade, assim, os resultados mostraram um aumento neste parâmetro, folhas de 26 dias apresentaram uma espessura de $0,41\pm 0,02\text{mm}$, e $0,46\pm 0,02\text{mm}$ em folhas de 83 dias de idade.

Estes padrões de maior espessura da folha, maior espessura do parênquima clorofilino lacunoso e parênquima em paliçada relacionado com o aumento da idade da folha, foram também detetados noutras espécies, como *Prunus persica* e *Olea europaea* (Marchi *et al.*, 2008) ou *Cistus incanus* (Gratani *et al.*, 2000). Na variação sazonal também se observou uma razão PCE/PCL significativamente maior nas folhas colhidas em junho. Em contraste, o parênquima clorofilino lacunoso, a espessura do mesófilo e a succulência foram maiores em setembro. Embora nenhum dado tenha sido encontrado em relação a variações sazonais das características foliares em *Salvia officinalis*, é no entanto de referir que as folhas podem sofrer variações destas características em resposta a vários fatores (Witkowski *et al.*, 1991), tais como climáticas, como resposta das folhas aos efeitos nocivos das altas temperaturas ou irradiação, ou mesmo baixa disponibilidade de água (Castro-Diez *et al.*, 2000; Letts *et al.*, 2012).

Verificou-se que o ano de colheita influenciou significativamente todos os parâmetros em estudo, exceto a espessura da epiderme e cutícula superior. Verificou-se uma diminuição acentuada das espessuras dos tecidos foliares em 2013. Já a razão PCE/PCL subiu 18,9% de 2011 para 2013. A subida da razão entre os parênquimas clorofilinos pode significar que *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* teve aparentemente maior potencial fotossintético em 2013.

Tabela 5 - Espessura dos diferentes tecidos (epiderme e cutícula superior - ES CS, parênquima clorofilino em paliçada - PCE, parênquima clorofilino lacunoso - PCL, epiderme e cutícula inferior - EI CI, lâmina total - LT, mesófilo e PCE/PCL) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo dos ciclos vegetativos de 2011/2013

	ES CS (μm)	PCE (μm)	PCL (μm)	EI CI (μm)	Mesófilo (μm)	LT (μm)	PCE/PCL
Estádio de Desenvolvimento (ED)							
Folhas Jovens (FJ)	18,61 \pm 2,88	66,89 \pm 12,00	46,79 \pm 15,37	11,09 \pm 4,95	115,03 \pm 23,30	149,08 \pm 25,32	1,56 \pm 0,53
Folhas Adultas (FA)	18,14 \pm 3,10	79,09 \pm 13,75	59,39 \pm 16,16	13,22 \pm 4,03	140,20 \pm 25,46	177,20 \pm 26,65	1,40 \pm 0,37
Data (D)							
junho (1D)	18,22 \pm 3,05	74,02 \pm 12,75	49,72 \pm 14,64	12,24 \pm 4,83	123,84 \pm 24,00	160,49 \pm 26,26	1,60 \pm 0,47
setembro (2D)	18,53 \pm 2,93	71,58 \pm 15,41	55,72 \pm 18,41	12,00 \pm 4,50	130,13 \pm 29,00	164,50 \pm 32,20	1,39 \pm 0,44
Ano (A)							
2011 (1A)	18,80 \pm 2,11	85,12 \pm 11,87	67,33 \pm 13,80	17,55 \pm 2,04	152,45 \pm 22,50	188,80 \pm 22,44	1,32 \pm 0,34
2013 (2A)	18,19 \pm 3,31	66,92 \pm 11,20	46,02 \pm 13,69	9,55 \pm 3,03	115,18 \pm 20,49	150,23 \pm 23,80	1,57 \pm 0,45
ED x D							
FJ x 1D	18,99 \pm 2,94	69,82 \pm 11,72	44,93 \pm 14,35	11,24 \pm 4,97	114,75 \pm 22,44	150,81 \pm 25,30	1,68 \pm 0,52
FJ x 2D	18,23 \pm 2,81	63,96 \pm 11,70	48,66 \pm 16,30	10,94 \pm 4,99	115,30 \pm 24,41	147,34 \pm 25,55	1,44 \pm 0,52
FA x 1D	17,32 \pm 2,97	78,98 \pm 12,32	55,37 \pm 13,05	13,41 \pm 4,43	134,58 \pm 21,46	171,93 \pm 22,82	1,49 \pm 0,39
FA x 2D	18,82 \pm 3,06	79,19 \pm 15,02	62,79 \pm 17,86	13,06 \pm 3,71	144,95 \pm 27,80	181,65 \pm 29,04	1,33 \pm 0,34
ED x A							
FJ x 1 ^a	18,99 \pm 2,61	76,08 \pm 7,25	62,28 \pm 12,50	17,51 \pm 1,94	138,36 \pm 16,17	174,96 \pm 17,41	1,29 \pm 0,43
FJ x 2 ^a	18,23 \pm 2,99	62,81 \pm 11,46	39,91 \pm 10,90	8,24 \pm 2,66	104,66 \pm 17,86	137,58 \pm 19,02	1,68 \pm 0,53
FA x 1 ^a	17,32 \pm 1,45	94,17 \pm 8,04	72,38 \pm 13,40	17,60 \pm 2,19	166,55 \pm 18,93	202,65 \pm 18,05	1,34 \pm 0,23
FA x 2 ^a	18,83 \pm 3,66	71,56 \pm 8,95	52,90 \pm 13,33	11,03 \pm 2,75	127,02 \pm 16,49	164,47 \pm 20,42	1,44 \pm 0,42
D x A							
1D x 1 ^a	19,56 \pm 2,60	84,86 \pm 9,21	61,35 \pm 10,06	17,78 \pm 2,70	146,21 \pm 16,43	183,55 \pm 16,90	1,41 \pm 0,21
1D x 2 ^a	17,56 \pm 3,07	68,60 \pm 10,71	43,90 \pm 13,06	9,46 \pm 2,83	112,66 \pm 18,84	148,96 \pm 22,25	1,69 \pm 0,54
2D x 1 ^a	18,04 \pm 1,11	85,39 \pm 14,24	73,31 \pm 14,60	17,32 \pm 1,04	158,70 \pm 26,14	194,05 \pm 26,19	1,22 \pm 0,42
2D x 2 ^a	19,75 \pm 3,44	65,44 \pm 11,51	47,91 \pm 14,07	9,63 \pm 3,22	117,43 \pm 21,78	151,36 \pm 25,24	1,46 \pm 0,43
Valor de P							
ED	0,2377	0,0001	0,0001	0,0017	0,0010	0,0001	0,2003
D	0,8449	0,3433	0,0003	0,6262	0,0068	0,0794	0,0104
A	0,1644	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0014
ED x D	0,0433	0,0076	0,0714	0,9855	0,0056	0,0043	0,9818
ED x A	0,9745	0,0055	0,5130	0,0031	0,2925	0,8640	0,6680
D x A	0,0057	0,2118	0,0352	0,5840	0,1252	0,1462	0,8730

Nota - Valores médios ($n=8$) \pm desvio padrão

O mesófilo da folha é percorrido por um sistema de feixes vasculares ou nervuras ligados ao sistema vascular do caule. Na *salva rubra* e na maioria das folhas das Magnoliopsida, os feixes vasculares dispõem-se de modo ramificado, com nervuras sucessivamente menos espessas, partindo de outras mais espessas, apresentando uma nervação peninérvea. Nas nervuras encontra-se xilema e floema, estando o xilema normalmente, voltado para a página adaxial da folha, e o floema para a página abaxial (Fahn, 1990).

As dimensões dos vasos condutores estão relacionadas com os vários parâmetros de transporte de água, como por exemplo o índice de vulnerabilidade ou condutividade hidráulica relativa (Carlquist, 1988; Fahn *et al.*, 1986).

A Tabela 6 mostra que as espessuras do xilema, do floema e da nervura principal são significativamente maiores nas folhas adultas, enquanto o perímetro dos vasos xilémicos é maior nas folhas jovens, o que seria de esperar, uma vez que durante a ontogenia, os vasos

xilémicos estão sujeitos a forças de compressão por parte das células vizinhas, diminuindo o seu tamanho à medida que se desenvolve.

Pouco se conhece sobre a dimensão dos vasos condutores em *Salvia officinalis*, mas trabalhos sobre outras espécies de *Salvia*, *Salvia divinorum* por Kowalczyk *et al.* (2014) e *Salvia halophila* por Kaya *et al.* (2007) indicaram dimensões semelhantes para os vasos condutores. Já em relação ao efeito da data, verificou-se uma diminuição significativa da área e do perímetro dos vasos xilémicos de 28% e 13%, respetivamente, entre junho e setembro.

No entanto, quando se analisa a interação ED x D, nas folhas mais jovens, com o passar do verão a área e perímetro dos vasos xilémicos aumentaram significativamente 7%, em contrapartida, nas folhas adultas registou-se uma diminuição de 25%.

Tabela 6 - Espessura do xilema (EX), espessura do floema (EF), largura da nervura principal (LN), área dos vasos xilémicos (AVX) e perímetro dos vasos xilémicos (PVX) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ciclo vegetativo de 2013

	EX (μm)	EF (μm)	LN (μm)	AVX (μm^2)	PVX (μm)
Estádio de Desenvolvimento (ED)					
Folhas Jovens (FJ)	117,04 \pm 14,61	43,01 \pm 13,23	312,48 \pm 59,34	96,67 \pm 20,06	36,46 \pm 4,62
Folhas Adultas (FA)	152,49 \pm 43,98	53,77 \pm 32,39	372,71 \pm 96,11	95,81 \pm 34,39	34,63 \pm 6,07
Data (D)					
junho (1D)	127,89 \pm 44,79	49,91 \pm 33,76	357,36 \pm 100,20	110,84 \pm 24,06	37,63 \pm 4,62
setembro (2D)	134,93 \pm 26,53	45,91 \pm 13,04	324,31 \pm 64,25	80,28 \pm 34,39	32,75 \pm 6,08
ED x D					
FJ x 1D	115,97 \pm 14,72	40,84 \pm 8,41	333,59 \pm 64,92	89,05 \pm 19,28	34,92 \pm 5,29
FJ x 2D	117,98 \pm 14,69	44,89 \pm 16,23	294,18 \pm 47,93	101,41 \pm 21,37	37,42 \pm 3,93
FA x 1D	150,03 \pm 69,22	66,76 \pm 43,04	401,50 \pm 137,20	118,60 \pm 26,10	38,59 \pm 3,75
FA x 2D	153,76 \pm 23,98	47,04 \pm 8,36	357,78 \pm 64,18	62,41 \pm 19,10	28,85 \pm 4,25
Valor de P					
ED	0,0001	0,0044	0,0001	0,2332	0,0008
D	0,6626	0,1071	0,0510	0,0001	0,0001
ED x D	0,8961	0,0153	0,8930	0,0001	0,0001

Nota - Valores médios ($n=8$) \pm desvio padrão

Na Figura 30 encontram-se os resultados obtidos para a concentração de ceras solúveis quantificadas neste estudo.

Em relação às ceras, não há dados disponíveis sobre a sua presença em *Salvia officinalis*, embora a variação causada pela idade da folha e data de amostragem serem encontradas noutras espécies tal como nas folhas de *Fagus sylvatica* L. por Prasad e seus colaboradores (1990), em folhas de *Prunus laurocerasus* por Jetter e seus colaboradores (2001) e em folhas de *Populus trichocarpa* por Kahmen e seus colaboradores (2011).

Observou-se que as folhas jovens apresentaram maior concentração de ceras que as adultas em ambos os anos de colheitas, ainda que apenas as amostras de 2013 tenham mostrado significância estatística.

Estes resultados vão de encontro aos estudos efetuados por Bringe *et al.* (2006) com folhas de macieiras, que registaram um aumento da área foliar, mas que não acompanhou a produção de ceras. Estes dados, face a estudos recentes, não são no entanto suficientes para determinar que as folhas jovens apresentem elevada resistência à secura, uma vez que esta característica irá depender da composição da própria cera (Riederer *et al.*, 2001; Kerstiens, 2006).

As ceras cuticulares estão sobrepostas (disposição epicuticular) e integradas (disposição intracuticular) na rede de cutina, (Kerstiens, 1996; Gostin, 2009). As ceras epicuticulares, uma camada contínua ou parcial de matriz extracelular, mais externa, tornam-se a primeira barreira contra os fatores que podem entrar em contacto com a planta: fungos, bactérias, insetos e radiação solar, entre outras. Assim, para além de reduzir as perdas de água por transpiração, diminuem o risco de danos por excesso de radiação solar, refletindo e atenuando a luz solar (Gostin, 2009; Cohu *et al.*, 2014). As ceras intracuticulares funcionam como a principal barreira ao transporte, prevenindo a perda de água e a lixiviação de moléculas do interior das células.

A espessura da camada cuticular pode variar com as espécies vegetais e com as condições ambientais em que as folhas se desenvolveram (Meyer, 1983). Segundo este autor, a porção de ceras é geralmente mais espessa nas folhas da mesma espécie que se desenvolveram sob luz solar intensa do que nas folhas da mesma espécie que se desenvolveram à sombra.

Riederer *et al.* (2001) referem, por outro lado, que a hipótese de que a espessura da cutícula determina a permeabilidade para a água não foi confirmada experimentalmente. Kerstiens (2006) acrescenta ainda, que se trata de um equívoco o facto de uma maior espessura de cutícula criar uma melhor barreira. Oliveira *et al.* (2003) verificaram que o aumento da espessura dos depósitos cerosos não alterou significativamente a resistência à transpiração, mas que a natureza química dos componentes das ceras revelou-se um fator importante na determinação do grau de resistência à transpiração. No entanto, Cutler *et al.* (2008) consideram que a cutícula formada por cutina e ceras dificulta a perda de água e aumenta a refletância.

Segundo Lichston *et al.* (2006) e Shepherd *et al.* (2006), a diminuição do teor de ceras pode ser agravado pelo efeito acumulativo dos poluentes depositados na superfície foliar, danificando a morfologia e o teor de ceras, podendo ser prejudiciais à planta.

Ainda segundo Shepherd *et al.* (2006) as temperaturas, a intensidade luminosa e a humidade influenciam a morfologia e a concentração das ceras. De facto estudos efetuados por estes autores em *Brassica* sp. mostraram que temperaturas mais baixas promovem maior deposição de ceras. No nosso estudo observou-se que a temperatura do ano de 2013 foi superior a 2011, dado este que, poderá ter tido influência na diminuição da concentração de ceras, associado ao facto de no mês de junho de 2011 ter ocorrido um pico de radiação, que segundo os mesmos autores em estudos efetuados em *Nicotiana tabacum*, influencia pela positiva a deposição de ceras (Figura 20, Figura 22).

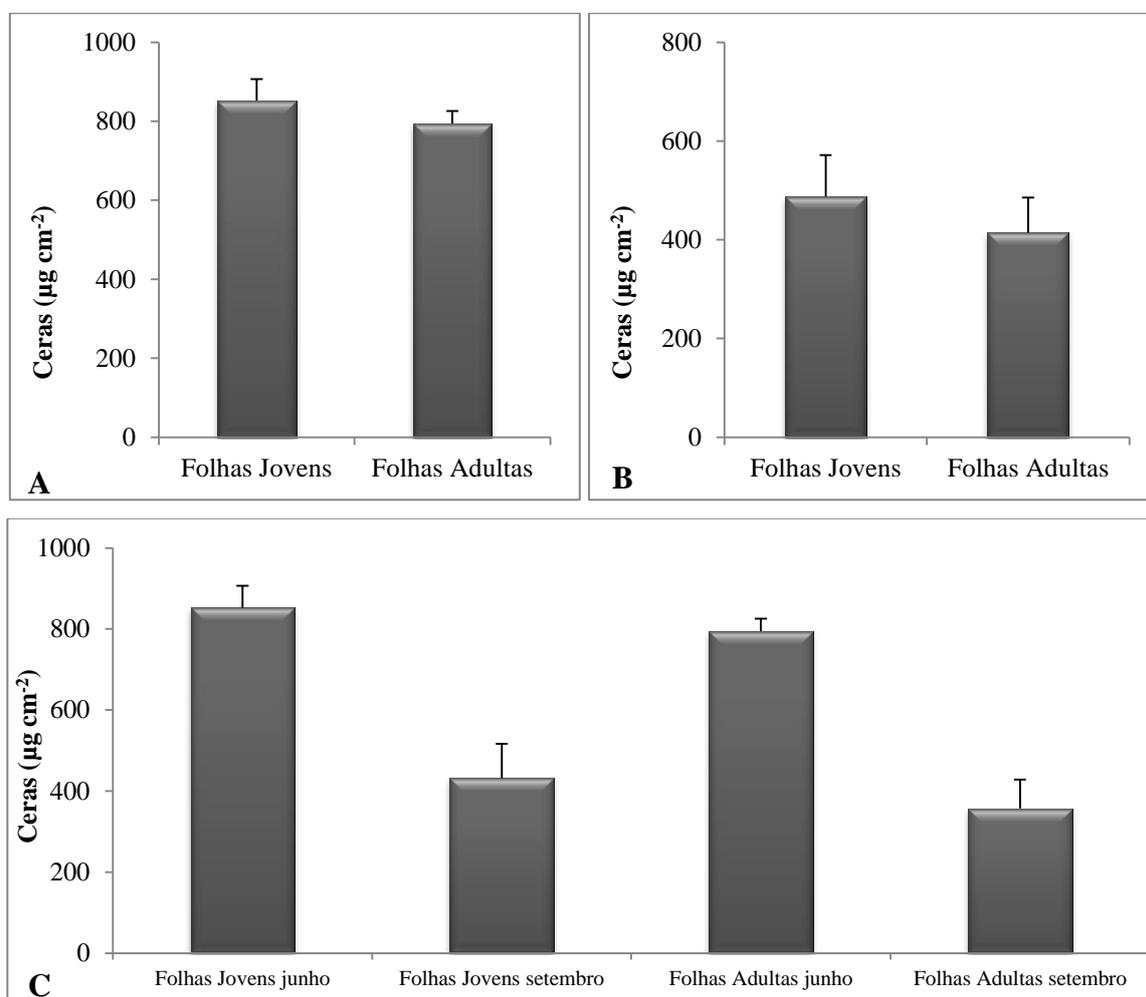


Figura 30 - Concentração de ceras cuticulares solúveis de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo dos ciclos vegetativos 2011/2013. Colheita de 2011 $p=0,410$ (A); Colheita de 2013 $p=0,022$ (B); Colheita de 2011 e 2013 $p=0,0129$ (C). Os valores representam a média ($n=8$) \pm DP

III.2 Parâmetros do Estado Hídrico e Esclerofilia

Segundo Castro-Díez *et al.* (2000), a razão entre a área foliar e massa seca ou a área foliar específica (SLA) tem sido utilizada como uma forma fácil de determinar as funções da folha e da planta. Está implicada em muitos aspetos funcionais da planta, como as trocas gasosas, taxa fotossintética potencial, resistência da folha e taxa relativa de crescimento. Este parâmetro é ainda indicador da posição da espécie ao longo do eixo entre ambiente rico ou pobre em recursos. Assim, folhas de sombra com uma elevada SLA são mais eficientes em habitats de baixa intensidade luminosa.

Os valores médios referentes aos parâmetros do estado hídrico e esclerofilia do ano de 2011 apresentam-se na Tabela 7.

A área foliar (AF) aumentou significativamente (88%) entre as folhas jovens e as adultas. O aumento da AF pode conduzir a uma melhor capacidade fotossintética devido à melhor interceção da luz (Gratani *et al.*, 2002).

No entanto, de junho para setembro verificou-se uma diminuição significativa da área foliar (cerca de 42%) relacionada com uma diminuição significativa da densidade do tecido foliar.

Estudos efetuados com *Pseudoroegneria spicata*, Fraser e colaboradores (2009) e Meier e seus colaboradores (2008) em *Fagus sylvatica*, relacionaram as modificações morfoanatômicas das folhas com a temperatura do ar. Resultados semelhantes tiveram Vile *et al.* (2012) com *Arabidopsis* e Ayub *et al.* (2011) em *Eucalyptus saligna*.

Quanto à ontogenia *versus* data de colheita, observou-se uma diminuição significativa entre junho e setembro na área foliar, sendo bastante visível a diferença nas folhas adultas (-45,7%).

Segundo Larcher (2003), a quantidade de água varia com o estado de desenvolvimento da planta. Em estado de desidratação as folhas adultas tendem a envelhecer mais depressa devido aos processos catabólicos. Ainda segundo o mesmo autor, as plantas recorrem a vários mecanismos para evitar a dessecação, nomeadamente, melhorar a captação de água existente solo.

Situação corroborada por Letts *et al.* (2012) e Poorter *et al.* (2009), referindo que o aumento da espessura foliar está relacionado com uma elevada intensidade luminosa, o que tende a diminuir a SLA, promovendo a longevidade da folha em ambientes secos. Reforçado por Castro-Díez *et al.* (2000), que mencionam que as folhas mais espessas possuem uma

capacidade de condução superior, reduzem as perdas de água, armazenando grandes quantidades de água.

Não foram observadas diferenças significativas no conteúdo relativo de água e na suculência entre as várias origens de variação estudadas.

Tabela 7 - Área foliar (AF), área foliar específica (SLA), densidade do tecido foliar, conteúdo relativo de água (RWC) e suculência (S) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ano de 2011

	AF (cm ²)	SLA (m ² g ⁻¹)	Densidade (g kg ⁻¹)	RWC (%)	S (g H ₂ Omm ⁻²)
Estádio de Desenvolvimento (ED)					
Folhas Jovens (FJ)	9,90±2,00	9,02±0,84	290,01±27,22	89,13±2,92	0,26±0,08
Folhas Adultas (FA)	18,61±6,00	9,79±0,94	273,02±28,17	90,81±2,77	0,29±0,03
Data (D)					
junho (1D)	18,52±7,01	9,27±0,96	300,18±23,22	90,52±2,19	0,25±0,02
setembro (2D)	10,76±3,15	9,45±0,98	262,91±19,93	89,30±3,48	0,28±0,08
ED x D					
FJ x 1D	11,71±4,12	8,65±0,78	311,82±20,21	90,02±2,43	0,26±0,02
FJ x 2D	8,30±2,16	9,36±0,81	268,17±8,47	88,16±3,27	0,25±0,11
FA x 1D	24,20±2,26	8,62±0,67	288,30±21,11	91,14±1,99	0,25±0,02
FA x 2D	13,15±1,63	9,31±1,20	257,70±27,16	90,42±3,59	0,31±0,07
Valor de P					
ED	0,0010	0,0514	0,0552	0,1649	0,3370
D	0,0010	0,6410	0,0002	0,2967	0,3120
ED x D	0,0020	0,1747	0,4394	0,6309	0,2147

Nota - Valores médios (n=8) ± desvio padrão

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos para as medições referidas anteriormente nas amostras de 2013.

Pela sua análise é possível verificar que a AF é significativamente maior em folhas adultas, e não houve efeito do estágio de desenvolvimento nos outros parâmetros estudados.

O efeito da data de colheita foi significativo nos parâmetros AF, densidade, RWC e suculência, não tendo tido efeitos na SLA. É de salientar, à semelhança do que se verificou em 2011, valores mais elevados de AF e densidade nas folhas que se desenvolveram no primeiro ciclo vegetativo. Esta ocorrência pode estar associada a temperaturas mais amenas e a uma maior disponibilidade de água no solo em junho.

Este aumento de biomassa por unidade de área pode ser o resultado de um maior número de células (maior proporção de paredes celulares por volume celular), e/ou possuírem mais massa. Uma maior biomassa das células pode ser devida a uma maior acumulação de compostos provenientes do metabolismo secundário na parede celular, no citoplasma ou nos vacúolos (Castro-Díez *et al.*, 2000).

Tabela 8 - Área foliar (AF), área foliar específica (SLA), densidade do tecido foliar, conteúdo relativo de água (RWC) e suculência (S) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ano de 2013

	AF (cm ²)	SLA (m ² g ⁻¹)	Densidade (g kg ⁻¹)	RWC (%)	S (g H ₂ Omm ⁻²)
Estádio de Desenvolvimento (ED)					
Folhas Jovens (FJ)	10,00±0,05	13,51±2,13	264,81±40,53	92,48±5,29	0,21±0,03
Folhas Adultas (FA)	11,00±0,05	14,02±1,74	253,24±40,20	88,01±10,16	0,22±0,07
Data (D)					
junho (1D)	15,01±0,02	13,34±1,93	277,40±26,60	87,32±4,69	0,20±0,03
setembro (2D)	6,11±0,01	14,23±1,90	240,61±43,71	93,15±10,09	0,24±0,06
ED x D					
FJ x 1D	14,44±0,03	12,66±1,99	300,36±13,02	90,01±2,44	0,19±0,03
FJ x 2D	5,32±0,01	14,40±1,98	229,35±22,37	94,81±6,32	0,24±0,02
FA x 1D	15,43±0,01	14,02±1,65	254,53±12,59	84,63±4,90	0,21±0,03
FA x 2D	6,12±0,02	14,01±1,90	251,92±57,01	91,42±12,96	0,23±0,09
Valor de P					
ED	0,0242	0,3893	0,2579	0,0765	0,6134
D	0,0001	0,1728	0,0008	0,0220	0,0527
ED x D	0,6165	0,1318	0,0017	0,6920	0,4114

Nota - Valores médios (n=8) ± desvio padrão

Quanto ao conteúdo relativo de água (RWC) o seu aumento significativo entre junho e setembro poderá estar relacionado com a maior pluviosidade ocorrida no mês de setembro (Figura 22).

Na Tabela 9 estão os resultados que permitem comparar o efeito do ano de colheita. Salienta-se o aumento significativo da SLA, e diminuição da densidade foliar e suculência de 2011 para 2013. Contudo não se observaram diferenças significativas no RWC entre os anos de colheita.

Relativamente à área foliar ocorreu uma diminuição bastante significativa de 38% da primeira para a segunda colheita, esta diminuição tanto sucedeu nas folhas jovens, 18% como nas folhas adultas 53%. O ano de colheita também atuou na área foliar, pois verificou-se uma diminuição de 43% de 2011 para 2013, as folhas jovens tiveram uma diminuição de 43% e as folhas adultas de 42%.

Como já referido, a quantidade de água dos tecidos poderá variar com o tipo de órgão, o estágio de desenvolvimento, a estação, o hábito de crescimento e a espécie. Existem diversas técnicas para medir as relações hídricas das plantas. Ao contrário do potencial hídrico foliar que dá uma informação sobre a energia livre da água na planta, o RWC expressa a relação entre a quantidade real de água de um tecido e quantidade máxima que ele pode reter. De uma maneira geral, os valores de RWC não sofreram variações significativas no nosso estudo.

Estudos mostram que o estado hídrico da planta condiciona as trocas gasosas, tal como referem Jorba *et al.* (1985), que registaram que a redução de RWC de 96% para 65%, induz uma redução de 85% na fotossíntese de oliveiras cultivadas em vaso.

A dessecação da planta é atrasada por todos os mecanismos disponíveis, para manter um conteúdo hídrico favorável apesar das condições climatéricas adversas à sua volta. Assim sendo a planta possui mecanismos de aperfeiçoamento da absorção da água, de capacidade de condução da água; pela redução da perda de água; e pelo armazenamento da água (Larcher, 1995).

Tabela 9 - Área foliar (AF), área foliar específica (SLA), densidade do tecido foliar, conteúdo relativo de água (RWC), suculência (S), de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo dos anos de 2011/2013

	AF (cm ²)	SLA (m ² g ⁻¹)	Densidade (g kg ⁻¹)	RWC (%)	S (g H ₂ Omm ⁻²)
Estádio de desenvolvimento (ED)					
Folhas Jovens (FJ)	11,91±6,78	11,79±2,55	274,24±37,70	91,15±4,78	0,23±0,05
Folhas Adultas (FA)	13,68±6,69	12,40±2,81	260,63±36,90	89,01±8,24	0,24±0,06
Data (D)					
junho (1D)	15,83±4,84	11,80±2,56	285,90±27,38	88,49±4,21	0,22±0,03
setembro (2D)	9,76±5,92	12,39±2,81	248,97±37,80	91,67±8,38	0,25±0,07
Ano (A)					
2011 (1A)	17,43±10,51	9,37±0,95	281,48±28,44	89,91±2,91	0,27±0,05
2013 (2A)	10,01±4,97	13,74±1,93	259,00±40,28	90,19±8,30	0,22±0,05
ED x D					
FJ x 1D	13,06±2,51	11,12±2,55	304,63±16,47	89,98±2,22	0,22±0,03
FJ x 2D	10,77±6,59	12,47±2,98	243,85±26,45	92,33±6,29	0,24±0,08
FA x 1D	18,60±5,08	12,49±2,46	267,17±23,02	87,01±5,21	0,23±0,04
FA x 2D	8,75±3,86	12,31±2,73	254,09±46,95	91,01±10,23	0,26±0,06
ED x A					
FJ x 1A	16,24±8,41	8,98±0,84	289,96±27,21	89,06±2,92	0,26±0,07
FJ x 2A	9,32±5,07	13,48±2,13	264,81±40,53	92,41±5,29	0,21±0,03
FA x 1A	18,62±6,46	9,74±0,94	273,01±28,17	90,76±2,77	0,78±0,03
FA x 2A	10,71±4,90	14,00±1,73	253,20±40,20	87,96±10,16	0,22±0,07
D x A					
1D x 1A	17,89±7,15	9,27±0,96	300,08±23,22	90,54±2,19	0,25±0,02
1D x 2A	14,60±2,08	13,32±1,93	277,38±26,60	87,27±4,68	0,20±0,03
2D x 1A	16,97±7,25	9,45±0,98	262,88±19,93	89,28±3,48	0,28±0,08
2D x 2A	5,43±1,53	14,15±1,90	240,62±43,70	93,11±10,08	0,24±0,06
Valor de P					
ED	0,2541	0,1269	0,0561	0,4107	0,2703
D	0,0001	0,2314	0,0001	0,1730	0,0449
A	0,0001	0,0001	0,0033	0,8684	0,0013
ED x D	0,0001	0,0892	0,0073	0,6421	0,5811
ED x A	0,0512	0,7784	0,7165	0,0690	0,6169
D x A	0,0314	0,4307	0,9762	0,0365	0,7297

Nota - Valores médios (n=8) ± desvio padrão

III.3 Parâmetros Fisiológicos

III.3.1 Trocas Gasosas

Dos resultados apresentados na Tabela 10, referentes às trocas gasosas medidas não foram observadas diferenças significativas na (A) entre folhas jovens e adultas apesar das folhas adultas apresentarem valores de taxa fotossintética (A) e de condutância estomática para o vapor de água (g_s) ligeiramente superiores. Segundo Peri *et al.* (2011), o aumento do valor da taxa fotossintética poderá estar associado ao incremento da condutância estomática. No entanto, foram as folhas jovens que exibiram valores de taxa de transpiração (E) significativamente maiores (33%). Este facto deve-se provavelmente à sua posição mais exposta à radiação relativamente às folhas adultas.

A data de colheita induziu uma diminuição significativa de 40% no valor (g_s) da primeira para a segunda colheita em ambas as idades foliares, acompanhada por um aumento significativo da transpiração (87%). A redução de g_s , em folhas adultas de junho ($445 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-2}$) para folhas adultas de setembro ($145 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-2}$) poderá estar relacionada com a exposição da planta a situações de stresse hídrico moderado, como se pode verificar pela Figura 20. De facto, os meses de julho e agosto apresentaram uma precipitação reduzida, pelo que o encerramento estomático pode ser interpretado como uma forma de reduzir as perdas de água por transpiração.

Lambrecht *et al.* (2011) correlacionaram esta redução de valores de g_s com uma diminuição do potencial hídrico da folha ou a uma maior de pressão do vapor de água, já Damour *et al.* (2010) relacionam esta redução com um aumento de temperatura.

O valor da eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s) aumentou significativamente entre junho e setembro, como resultado da grande diminuição de g_s . Esse aumento estará relacionado com o aumento de A/g_s das folhas adultas em setembro. A redução da condutância estomática tem sido referida como o primeiro mecanismo de defesa de manutenção da condição hídrica da planta (*e.g.* Suzy *et al.*, 2011).

Foram encontradas variações significativas na taxa de transpiração (E) relativamente à data de colheita observando-se valores mais altos em setembro. Os valores de E estão segundo Sánchez-Díaz *et al.* (2000) relacionadas com fatores ambientais, tais como a temperatura, o défice de pressão de vapor de água ou a radiação solar. As altas temperaturas registadas em setembro podem ter conduzido a um aumento desse parâmetro. Além disso, a redução de precipitação em junho também pode ter contribuído para os valores mais baixos de

E registados neste mês, pois as folhas tendem a fechar os estomas para reduzir a transpiração, evitando mais perda de água. A redução de E em folhas adultas segue uma tendência já observada em muitas outras espécies (Constable *et al.*, 1980; Kositsup *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014), podendo ser associada a uma maior radiação solar a que essas folhas estiveram sujeitas.

No que respeita à interação ED×D, esta resultou em variações significativas para g_s , A/ g_s , C_i (concentração intercelular de CO₂) e E. Provavelmente, a diminuição verificada nas taxas de assimilação líquida de CO₂ em folhas jovens ocorreu devido a limitações estomáticas. No entanto, na segunda colheita observou-se um aumento da g_s e de C_i que incrementaram a taxa fotossintética.

O valor de C_i alterou-se significativamente na interação ED×D, contribuindo essencialmente para esta redução as folhas adultas (63%), não influenciando no entanto, a taxa fotossintética. Com efeito, a redução da abertura dos estomas é uma das primeiras respostas ao stresse hídrico, privando as folhas de CO₂ (Nunes, 2007).

Tabela 10 - Trocas gasosas - taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática para o vapor de água (g_s), concentração intercelular de CO₂ (C_i), eficiência intrínseca do uso de água (A/ g_s) e taxa de transpiração (E) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ano de 2011

	A ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	g_s ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	A/ g_s ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Estádio de Desenvolvimento (ED)					
Folhas Jovens (FJ)	18,92±3,05	266,55±129,95	190,01±79,47	90,84±40,52	3,61±1,59
Folhas Adultas (FA)	20,63±1,75	294,89±130,65	169,02±99,42	104,41±64,86	2,72±0,78
Data (D)					
junho (1D)	19,43±2,95	351,90±198,30	201,20±85,87	81,19±54,99	2,23±0,66
setembro (2D)	20,17±2,25	209,51±76,55	157,91±89,76	114,14±56,16	4,17±1,10
ED x D					
FJ x 1D	18,24±3,17	258,83±188,28	155,96±100,34	109,63±65,19	2,22±0,88
FJ x 2D	19,66±2,98	274,37±24,59	224,28±28,29	72,14±14,18	5,01±0,24
FA x 1D	20,67±2,28	444,93±170,40	246,61±32,22	52,61±19,46	2,28±0,39
FA x 2D	20,61±1,16	144,85±48,76	91,54±80,02	156,10±50,25	3,11±0,80
Valor de P					
ED	0,0630	0,5430	0,3870	0,3800	0,0010
D	0,4700	0,0040	0,0800	0,0380	0,0010
ED x D	0,4390	0,0020	0,0010	0,0010	0,0010

Nota - Valores médios ($n=8$) ± desvio padrão

O controlo da entrada e saída de água nos espaços intercelulares da planta faz-se pela regulação da abertura dos estomas. Assim, a assimilação líquida de CO₂ pode ser dificultada pelo fecho dos estomas, em resposta a uma situação de stresse (Meyer *et al.*, 1983; Chaves *et al.*, 2003).

Como se verifica na Figura 31 existe uma correlação não-linear, polinomial e significativamente positiva entre g_s e C_i , mostrando uma base estreita de relacionamento entre as variáveis analisadas de trocas gasosas. Esta relação apresentou coeficiente de determinação elevado ($R^2=0,6451$), o que indica que g_s variou proporcionalmente a C_i , o que seria esperado, uma vez que o aumento da abertura dos estomas permite uma maior difusão do CO_2 para os espaços intercelulares do mesófilo.

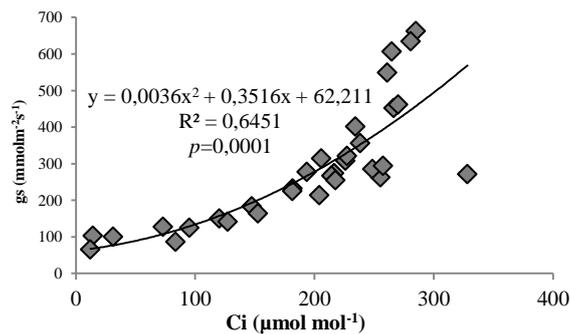


Figura 31 - Correlação entre g_s ($mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$) e C_i ($\mu mol\ mol^{-1}$) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo dos anos em estudo

Como se verifica na Figura 32, existe uma correlação linear significativamente negativa entre os valores de C_i e A/g_s . Esta relação apresentou coeficiente de determinação elevado ($R^2=0,9914$), o que mostra que C_i é inversamente proporcional a A/g_s . Resultados similares foram obtidos por Nunes (2007) em *Medicago truncatula* cv. Jemalong em condições de stresse hídrico.

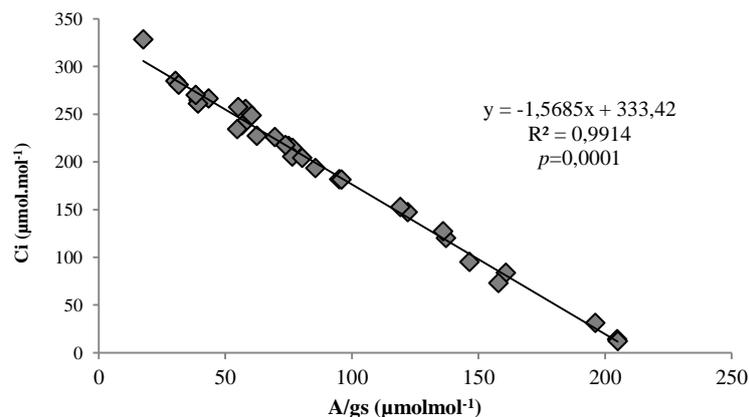


Figura 32 - Correlação entre C_i ($\mu mol\ mol^{-1}$) e g_s ($mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$) e A/g_s de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo dos anos em estudo

III.3.2 Fluorescência da Clorofila *a in vivo*

Nas plantas vasculares, a fotossíntese ocorre principalmente nas folhas que, na maioria das espécies, são órgãos finos e expandidos, possuidores de uma enorme superfície externa em relação ao seu volume. Este tipo de estrutura permite uma exposição à luz de um grande número (relativamente ao volume da folha) de células possuidoras de cloroplastos. O labirinto de espaços intercelulares do interior da folha, contendo ar, é tão extenso que praticamente todas as células clorofilinas estão em contacto com a atmosfera interna da folha (Meyer, 1983).

Os pigmentos fotossintéticos localizados nas membranas dos tilacoides dos cloroplastos absorvem a energia luminosa que irá ser utilizada no processo fotossintético. Como qualquer outro processo de troca de energia, a conversão da energia luminosa em energia química no processo fotossintético não é perfeita. Nem todos os elétrons que estão num nível energético elevado (molécula de clorofila excitada) são passados para a cadeia aceitadora de elétrons. Estes elétrons retornam ao estado inicial (estado antes das moléculas receberem a energia dos fótons), sem a produção de ATP e NADPH. Ao retornar ao estado inicial, a energia é dissipada em forma de calor ou luz (fluorescência) (Bólhar-Nordenkampf *et al.*, 1993).

Detalhadamente, os pigmentos fotossintéticos após captarem a energia luminosa, dissipam-na por meio de três vias: dissipação fotoquímica ou *quenching* fotoquímico (qP), em que é utilizada a energia luminosa para os processos fotossintéticos; fluorescência, emissão de radiação na região do visível (682nm) e na região do infravermelho (740nm) e dissipação não-fotoquímica ou *quenching* não-fotoquímico (qNP), com produção de calor sob a forma de radiação infravermelha (Bólhar-Nordenkampf *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 2010).

Em situações de fraca luminosidade, ou de elevados rendimentos quânticos (quantidade molar de O₂ libertado ou CO₂ fixado por cada mole de fótons absorvido pelo aparelho fotossintético), cerca de 97% da energia de fótons absorvida é usada no processo fotoquímico, 2,5% é transformada em calor e 0,5% é reemitida sob a forma de fluorescência. Todavia, em situações que originem a saturação dos centros de reação, 95 a 97% da energia pode ser dissipada na forma de calor e 2,5 a 5% na forma de fluorescência (Bólhar-Nordenkampf *et al.*, 1993). Sendo assim, a medição da fluorescência da clorofila *a* pode ser um instrumento muito importante no estudo do desempenho fotossintético das plantas (Baker, 2008).

Ao adaptar-se um tecido clorofilino ao escuro, o rendimento quântico da fluorescência do PSII será dependente somente do estado redox do *quenching* fotoquímico. Todos os outros processos relacionados com o *quenching* não-fotoquímico serão inibidos. A fluorescência da clorofila *a in vivo* é uma maneira não invasiva e rápida de detetar mudanças na atividade fotossintética de folhas e pode ser influenciada por mudanças no ambiente ou ser provocado por um stresse antropogénico (Gitari *et al.*, 2004).

Com base na Tabela 11, é possível constatar que existem diferenças significativas causadas pela ontogenia no coeficiente de extinção não-fotoquímico (qNP) e na eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m).

As folhas adultas apresentaram valores mais elevados de qNP, o que poderá estar associado à dissipação do excesso de energia que é essencial para a sobrevivência da planta, uma vez que previne danos oxidativos. Por outro lado, as folhas adultas registaram valores inferiores de F_v/F_m comparativamente às folhas jovens, em oposição ao verificado por Bertamini *et al.* (2002) em videira. Contudo, os valores de F_v/F_m foram sempre superiores a 0,8, o que é indicativo, segundo Bôlhar-Nordenkampf *et al.* (1993), Lüttge *et al.* (1998) e Maxwell *et al.* (2000) de um bom funcionamento do aparelho fotossintético, não existindo danos no PSII.

Também Demmig *et al.* (1987) verificaram que a eficiência fotoquímica das reações primárias do fotossietma II (PSII) é máxima quando a razão F_v/F_m , medida a 77K, é de $0,832 \pm 0,004$ num grande número de folhas de diferentes espécies vegetais saudáveis e iluminadas.

No final do período estival, os valores mais altos de F_v/F_m , quer de folhas ovens quer de folhas adultas, sugerem uma melhoria na eficiência fotoquímica do PSII.

Os valores inferiores de F_v/F_m registados em junho podem ter sido devidos a uma medida de proteção da oxidação dos fotossistemas (Baker, 2008), já que as folhas estiveram expostas a elevada radiação solar durante este mês. Isto é ainda confirmado pelos elevados valores de qNP, que é um mecanismo usado pela planta para dissipar o excesso de energia na forma de calor, tal como anteriormente referido (Maxwell *et al.*, 2000).

Já pela análise da interação ED x D verificou-se um aumento dos valores de qNP em folhas jovens ao longo do ciclo vegetativo desta variedade, e o contrário foi verificado em folhas adultas.

Tabela 11 - Rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}); Coeficientes de extinção fotoquímico (qP) e não-fotoquímico (qNP); Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m); de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ano de 2011

	Φ_{PSII}	qP	qNP	F_v/F_m
Estádio de Desenvolvimento (ED)				
Folhas Jovens (FJ)	0,48±0,08	0,71±0,11	0,60±0,22	0,86±0,03
Folhas Adultas (FA)	0,42±0,10	0,69±0,13	0,90±0,10	0,84±0,04
Data (D)				
junho (1D)	0,45±0,09	0,72±0,12	0,69±0,31	0,83±0,02
setembro (2D)	0,45±0,10	0,68±0,12	0,81±0,08	0,87±0,04
ED x D				
FJ x 1D	0,50±0,10	0,76±0,12	0,41±0,17	0,84±0,02
FJ x 2D	0,47±0,06	0,67±0,07	0,79±0,06	0,88±0,02
FA x 1D	0,41±0,07	0,68±0,12	0,96±0,06	0,82±0,02
FA x 2D	0,43±0,13	0,69±0,16	0,84±0,10	0,85±0,05
Valor de P				
ED	0,0720	0,5750	0,0001	0,0730
D	0,9720	0,4090	0,0040	0,0020
ED x D	0,4830	0,2800	0,0001	0,8110

Nota - Valores médios ($n=8$) \pm desvio padrão

A água intervém em numerosas reações enzimáticas, particularmente na fase luminosa do processo fotossintético (Fahn, 1990; Moreira, 1993). Em condições de déficit hídrico os estomas têm tendência a fechar originando uma diminuição da taxa de transpiração (Fahn, 1990; Nunes, 2007).

Observando a Figura 33, relativamente aos valores de E verificou-se que a planta em estudo *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* apresentou uma tendência para um maior valor de F_v/F_m à medida que a taxa de transpiração aumentava ($R^2=0,3609$) (coeficiente de determinação significativamente positiva $p=0,0001$).

Cerca de 36% da variação observada em F_v/F_m é explicada pela taxa de transpiração. Com efeito, as plantas de salva rubra com maiores taxas de transpiração, apresentam maior eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II, isto é as plantas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* encontravam-se bem do ponto de vista fisiológico. Esta eficiência poderá estar associada à progressiva abertura dos estomas que induziu o aumento da assimilação de CO_2 e a uma maior eficiência do sistema antena para a absorção e transferência de energia luminosa que ocorre à medida que a taxa de transpiração aumenta.

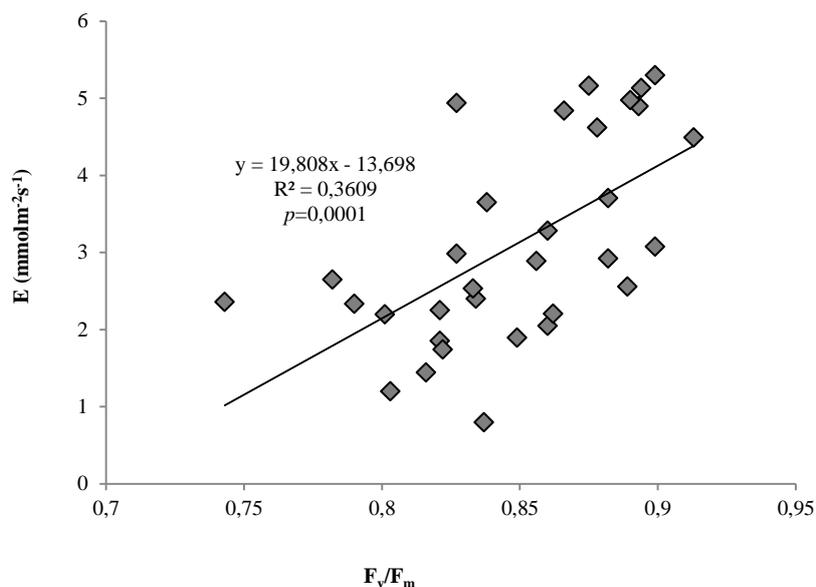


Figura 33 - Correlação entre E ($\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$) e F_v/F_m de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo dos anos em estudo

III.4 Parâmetros Bioquímicos

III.4.1 Pigmentos Fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos (*Cl_a*, *Cl_b*, Carotenoides) foram quantificados por espectrofotometria e as concentrações encontram-se expressas quer por área, quer por peso seco nas Tabela 12, Tabela 13 e Tabela 14. Apresentam-se ainda nestas tabelas os valores da estimativa da clorofila obtidos por um método não destrutivo, usando um aparelho SPAD.

Em 2011, as concentrações de *Cl_a*, *Cl_b*, Cl_{tot} , Carotenoides e teor de clorofila foram significativamente mais elevadas nas folhas jovens (Tabela 12). De facto, a concentração de *Cl_a* tanto por área como por peso seco das folhas adultas é inferior às folhas jovens, cerca de 17% em 2011 e 20% em 2013 quando é expressa por área. Estes resultados vão de encontro ao obtido em *Acer platanoides* L. por Lefsrud *et al.* (2007) e em *Brassica oleracea* L. var. *acephala* por Lepeduš *et al.* (2011) que verificaram um decréscimo das concentrações de *Cl_a* com o seu desenvolvimento.

A partir da análise dos resultados da Tabela 12 constata-se que a data de colheita teve um efeito significativo na variação da concentração de pigmentos fotossintéticos, verificando-se um aumento em setembro. Esse acréscimo representou cerca de 38% de *Cl_a* (mg dm^{-2}) e 60% de *Cl_b* (mg g^{-1}), enquanto que para os carotenoides (mg g^{-1}) o aumento foi de 37%, o que provavelmente aumentou a capacidade de fotoproteção por parte dos carotenoides às

clorofilas. De facto, os carotenoides, para além de absorverem luz em comprimentos de onda nos quais as clorofilas não conseguem, protegem as clorofilas contra o stresse foto-oxidativo evitando a sua fotodestruição (Correia *et al.*, 2005; Zervoudakis *et al.*, 2012). Estes pigmentos acessórios têm assim um importante papel na dissipação do excesso de energia no sistema fotossintético (Taiz e Zeiger, 2006).

Não se observaram diferenças significativas na razão *Cl_a/Cl_b* e *Cl_{tot}/Cartot* para as várias origens de variação (Tabela 12). Em 2013, de uma maneira geral, verificou-se que as folhas jovens continuam a registar maior concentração de pigmentos fotossintéticos, comparativamente às folhas adultas (Tabela 13). Já quanto ao efeito da data de colheita, há a salientar um aumento no teor em clorofila total, de 36 para 40 unidades SPAD, assim como na razão *Cl_a/Cl_b*, de 2,3 para 2,8. A razão clorofila *a/b* é um bom indicador de resposta da planta ao ambiente luminoso, pois, segundo García-Plazaola *et al.* (2008), esta razão é inversamente proporcional à quantidade de radiação luminosa.

Relativamente à influência do ano de colheita, verificou-se geralmente uma maior concentração de pigmentos fotossintéticos em 2011 e uma maior razão *Cl_{tot}/Cartot* em 2013 (Tabela 14), o que provavelmente se deveu às diferentes condições climáticas registadas nos dois anos de estudo.

Tabela 12 - Concentração de pigmentos fotossintéticos (Clorofila *a* - Cl_a, Clorofila *b* - Cl_b, Clorofila total - Cl_{tot}, Cl_{a/b}, Carotenoides Totais - Car_{tot}, Cl_{tot}/Car_{tot}) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ciclo vegetativo de 2011

	Cl _a (mg dm ⁻²)	Cl _a (mg g ⁻¹)	Cl _b (mg dm ⁻²)	Cl _b (mg g ⁻¹)	Cl _{tot} (mg dm ⁻²)	Cl _{tot} (mg g ⁻¹)	Cl _{a/b}	Car _{tot} (mg dm ⁻²)	Car _{tot} (mg g ⁻¹)	Cl _{tot} /Car _{tot}	Teor de Cl (SPAD)
Estádio de Desenvolvimento (ED)											
Folhas Jovens (FJ)	3,63±0,72	4,25±1,94	1,48±0,50	1,73±0,92	5,11±1,17	5,98±2,79	2,55±0,36	1,17±0,21	1,34±0,52	4,37±0,73	41,29±1,65
Folhas Adultas (FA)	3,03±0,67	3,39±0,88	1,17±0,51	1,29±0,56	4,20±1,16	4,68±1,40	2,76±0,41	0,92±0,12	1,03±0,19	4,51±0,91	35,83±2,25
Data (D)											
junho (1D)	2,80±0,39	2,94±0,69	1,01±0,19	1,06±0,28	3,81±0,57	4,00±0,90	2,79±0,20	0,97±0,17	1,00±0,17	3,97±0,39	38,09±3,78
setembro (2D)	3,87±0,63	4,69±1,68	1,63±0,57	1,96±0,87	5,50±1,14	6,65±2,44	2,53±0,50	1,13±0,22	1,37±0,51	4,92±0,87	39,02±2,98
EDx D											
FJ x 1D	3,04±0,32	2,81±0,59	1,15±0,12	1,06±0,22	4,18±0,44	3,87±0,81	2,65±0,10	1,08±0,16	0,99±0,18	3,90±0,31	41,16±1,72
FJ x 2D	4,23±0,47	5,68±1,75	1,81±1,80	2,40±0,86	6,03±0,88	8,08±2,43	2,46±0,51	1,26±0,22	1,69±0,52	4,84±0,75	41,41±1,69
FA x 1D	2,55±0,30	3,07±0,80	0,88±0,87	1,07±0,34	3,43±0,43	4,13±1,14	2,93±0,18	0,86±0,09	1,01±0,18	4,03±0,47	35,03±2,50
FA x 2D	3,51±0,59	3,70±0,88	1,45±0,60	1,52±0,66	4,96±1,17	5,23±1,48	2,60±0,51	0,99±0,10	1,04±0,21	5,01±1,01	36,63±1,76
Valor de P											
ED	0,0007	0,0357	0,0410	0,0431	0,0032	0,0288	0,1292	0,0002	0,0092	0,5538	0,0001
D	0,0001	0,0001	0,0002	0,0002	0,0001	0,0001	0,0679	0,0085	0,0026	0,0006	0,1910
ED x D	0,4637	0,0076	0,7734	0,0415	0,5799	0,0097	0,6039	0,6742	0,0053	0,9223	0,3365

Nota - Valores médios (n=8) ± desvio padrão

Tabela 13 - Concentração de pigmentos fotossintéticos (Clorofila *a* - Cl_a, Clorofila *b* - Cl_b, Clorofila total - Cl_{tot}, Cl_{a/b}, Carotenoides Totais - Car_{tot}, Cl_{tot}/Car_{tot}) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ciclo vegetativo de 2013

	Cl _a (mg dm ⁻²)	Cl _a (mg g ⁻¹)	Cl _b (mg dm ⁻²)	Cl _b (mg g ⁻¹)	Cl _{tot} (mg dm ⁻²)	Cl _{tot} (mg g ⁻¹)	Cl _{a/b}	Car _{tot} (mg dm ⁻²)	Car _{tot} (mg g ⁻¹)	Cl _{tot} /Car _{tot}	Teor de Cl (SPAD)
Estádio de Desenvolvimento (ED)											
Folhas Jovens (FJ)	3,44±0,58	3,22±0,69	1,45±0,68	1,38±0,75	4,89±1,21	4,60±1,42	2,56±0,48	0,97±0,13	0,90±0,10	5,06±1,2	39,82±3,33
Folhas Adultas (FA)	2,75±0,57	2,81±0,59	1,17±0,35	1,22±0,45	3,93±0,71	4,04±0,86	2,47±0,57	0,82±0,09	0,85±0,14	4,79±0,74	35,57±3,32
Data (D)											
junho (1D)	3,11±0,82	3,06±0,74	1,48±0,70	1,49±0,77	4,59±1,39	4,55±1,40	2,28±0,60	0,90±0,13	0,90±0,10	5,10±1,32	36,00±3,71
setembro (2D)	3,10±0,48	2,97±0,61	1,14±0,24	1,11±0,34	4,23±0,68	4,08±0,92	2,75±0,29	0,89±0,14	0,90±0,14	4,75±0,48	39,39±3,43
ED x D											
FJ x 1D	3,62±0,75	3,39±0,88	1,65±0,92	1,57±1,00	5,27±1,62	4,96±1,85	2,46±2,45	1,00±0,11	0,93±0,09	5,30±1,62	38,19±3,69
FJ x 2D	3,25±0,29	3,05±0,43	1,25±0,21	1,19±0,36	4,50±0,42	4,24±0,78	2,66±2,65	0,95±0,15	0,89±0,11	4,82±0,52	41,45±1,91
FA x 1D	2,59±0,53	2,73±0,38	1,32±0,40	1,42±0,50	3,91±0,66	4,15±0,62	2,11±2,10	0,81±0,07	0,86±0,11	4,90±0,97	33,81±2,14
FA x 2D	2,91±0,59	2,89±0,77	1,03±0,22	1,03±0,31	3,95±0,80	3,92±1,02	2,84±2,84	0,84±0,11	0,83±0,17	4,69±0,46	37,33±3,41
Valor de P											
ED	0,0021	0,0906	0,1557	0,4783	0,0108	0,1905	0,6170	0,0015	0,2172	0,4665	0,0001
D	0,9215	0,7076	0,0775	0,0889	0,3101	0,2727	0,0084	0,7957	0,3760	0,3487	0,0001
EDx D	0,0978	0,2889	0,7600	0,9774	0,2607	0,5647	0,1184	0,3169	0,8417	0,7143	0,8521

Nota - Valores médios (n=8) ± desvio padrão

Tabela 14 - Concentração de pigmentos fotossintéticos (Clorofila *a* - Cl_a , Clorofila *b* - Cl_b , Clorofila total - Cl_{tot} , $Cl_{a/b}$, Carotenoides Totais - Car_{tot} , Cl_{tot}/Car_{tot}) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ciclo vegetativo 2011 e 2013

	Cl_a (mg dm ⁻²)	Cl_a (mg g ⁻¹)	Cl_b (mg dm ⁻²)	Cl_b (mg g ⁻¹)	Cl_{tot} (mg dm ⁻²)	Cl_{tot} (mg g ⁻¹)	$Cl_{a/b}$	Car_{tot} (mg dm ⁻²)	Car_{tot} (mg g ⁻¹)	Cl_{tot}/Car_{tot}	Teor de Cl (SPAD)
Estádio de Desenvolvimento (ED)											
Folhas Jovens (FJ)	3,54±0,65	3,73±1,53	1,46±0,58	1,55±0,84	5,00±1,17	5,29±2,29	2,56±0,42	1,07±0,20	1,12±0,43	4,72±1,04	9,82±3,33
Folhas Adultas (FA)	2,89±0,63	3,11±0,79	1,17±0,43	1,26±0,50	4,06±0,96	4,36±1,18	2,62±0,51	0,87±0,12	0,94±0,19	4,66±0,83	5,57±3,32
Data (D)											
junho (1D)	2,95±0,65	3,00±0,71	1,25±0,56	1,28±0,61	4,20±1,12	4,28±1,21	2,53±0,51	0,94±0,15	0,95±0,15	4,53±1,12	36,00±3,71
setembro (2D)	3,48±0,68	3,83±1,52	1,38±0,50	1,54±0,78	4,86±1,13	5,37±2,23	2,64±0,42	1,01±0,22	1,11±0,45	4,84±0,69	39,39±3,43
Ano (A)											
2011 (1A)	3,30±0,75	3,82±1,55	1,32±0,52	1,51±0,78	4,65±1,23	5,33±2,27	2,66±0,39	1,05±0,21	1,18±0,41	4,45±0,82	38,56±3,38
2013 (2A)	3,10±0,66	3,02±0,67	1,31±0,55	1,30±0,61	4,41±1,09	4,32±1,19	2,51±0,52	0,90±0,13	0,87±0,12	4,93±0,99	37,01±4,24
ED x D											
FJ x 1D	3,33±0,63	3,10±0,78	1,40±0,68	1,31±0,74	4,73±1,28	4,41±1,49	2,55±0,42	1,04±0,14	0,96±0,14	4,60±1,35	38,19±3,69
FJ x 2D	3,74±0,63	4,37±1,83	1,53±0,48	1,80±0,89	5,27±1,03	6,16±2,64	2,56±0,43	1,11±0,24	1,28±0,55	4,83±0,63	41,45±1,91
FA x 1D	2,57±0,42	2,90±0,63	1,10±0,37	1,24±0,45	3,67±0,59	4,14±0,89	2,52±0,59	0,83±0,09	0,94±0,16	4,46±0,86	33,81±2,14
FA x 2D	3,21±0,65	3,30±0,90	1,24±0,49	1,28±0,56	4,46±1,10	4,57±1,42	2,72±0,40	0,92±0,14	0,94±0,21	4,85±0,78	37,33±3,41
ED x A											
FJ x 1 ^a	3,63±0,72	4,25±1,94	1,47±0,50	1,73±0,93	5,11±1,17	5,98±2,79	2,55±0,36	1,17±0,21	1,34±0,52	4,37±0,73	41,29±1,65
FJ x 2 ^a	3,44±0,58	3,22±0,69	1,45±0,68	1,83±0,75	4,89±1,21	4,60±1,42	2,56±0,48	0,97±0,13	0,90±0,10	5,06±1,21	38,65±3,88
FA x 1 ^a	3,03±0,67	3,39±0,88	1,17±0,51	1,30±0,56	4,20±1,16	4,68±1,40	2,76±0,41	0,92±0,12	1,04±0,19	4,52±0,91	35,83±2,25
FA x 2 ^a	2,75±0,57	2,81±0,59	1,17±0,35	1,22±0,45	3,93±0,71	4,04±0,86	2,47±0,57	0,82±0,09	0,85±0,14	4,79±0,74	35,37±4,03
D x A											
1D x 1 ^a	2,80±0,39	2,94±0,69	1,01±0,19	1,06±0,28	3,81±0,57	4,00±0,97	2,780±,20	0,97±0,17	1,00±0,17	3,90±0,39	38,09±3,78
1D x 2 ^a	3,11±0,82	3,06±0,74	1,48±0,70	1,49±0,77	4,58±1,39	4,55±1,40	2,28±0,60	0,90±0,13	0,90±0,10	5,10±1,32	34,33±2,72
2D x 1 ^a	3,88±0,63	4,69±1,68	1,63±0,57	1,96±0,87	5,50±1,14	6,65±2,44	2,53±0,50	1,13±0,22	1,37±0,51	4,92±0,87	39,02±2,98
2D x 2 ^a	3,09±0,48	2,97±0,61	1,14±0,24	1,11±0,34	4,23±0,68	4,08±0,92	2,75±0,29	0,89±0,14	0,85±0,14	4,75±0,48	39,69±3,81
Valor de P											
ED	0,0001	0,0070	0,0167	0,0524	0,0001	0,0104	0,5576	0,0001	0,0033	0,7862	0,0001
D	0,0001	0,0005	0,2544	0,0893	0,0046	0,0029	0,3160	0,0397	0,0089	0,1669	0,0001
A	0,0668	0,0009	0,9332	0,1607	0,2786	0,0056	0,1804	0,0001	0,0001	0,0321	0,0126
ED x D	0,3730	0,0602	0,9488	0,1406	0,5900	0,0657	0,3601	0,7869	0,0088	0,7195	0,7635
ED x A	0,7360	0,3228	0,8683	0,3507	0,9175	0,3001	0,1742	0,1754	0,0401	0,3474	0,0755
D x A	0,0001	0,0002	0,0002	0,0001	0,0001	0,0001	0,0012	0,0188	0,0013	0,0043	0,0005

Nota - Valores médios (n=8) ± desvio padrão

Na Figura 34 é possível observar uma relação diretamente proporcional entre as concentrações de *Cl_a*, *Cl_b* e *Cl_{total}* e a concentração de *Cartot*, indicando um aumento destes à medida que as concentrações de *Cl_a* e *Cl_b* aumentam.

A concentração de *Cl_a*, *Cl_b* e *Cl_{total}* correlacionaram-se positivamente com os carotenoides totais, apresentando-se altamente correlacionados pelo teste de Pearson ($R^2=0,8299$ para a *Cl_a* e $0,3961$ para a *Cl_b*), quando expressos por peso seco (Figura 32A e C). Outra correlação significativa foi obtida entre a concentração de *Cl_{total}* e *Cartot* ($R^2=0,7189$). Concentrações elevadas de *Cl_a* e *Cl_b* estão associadas a concentrações elevadas de carotenoides, já que estes últimos são fotoprotetores das clorofilas, segundo Correia *et al.* (2005) e Zervoudakis *et al.* (2012).

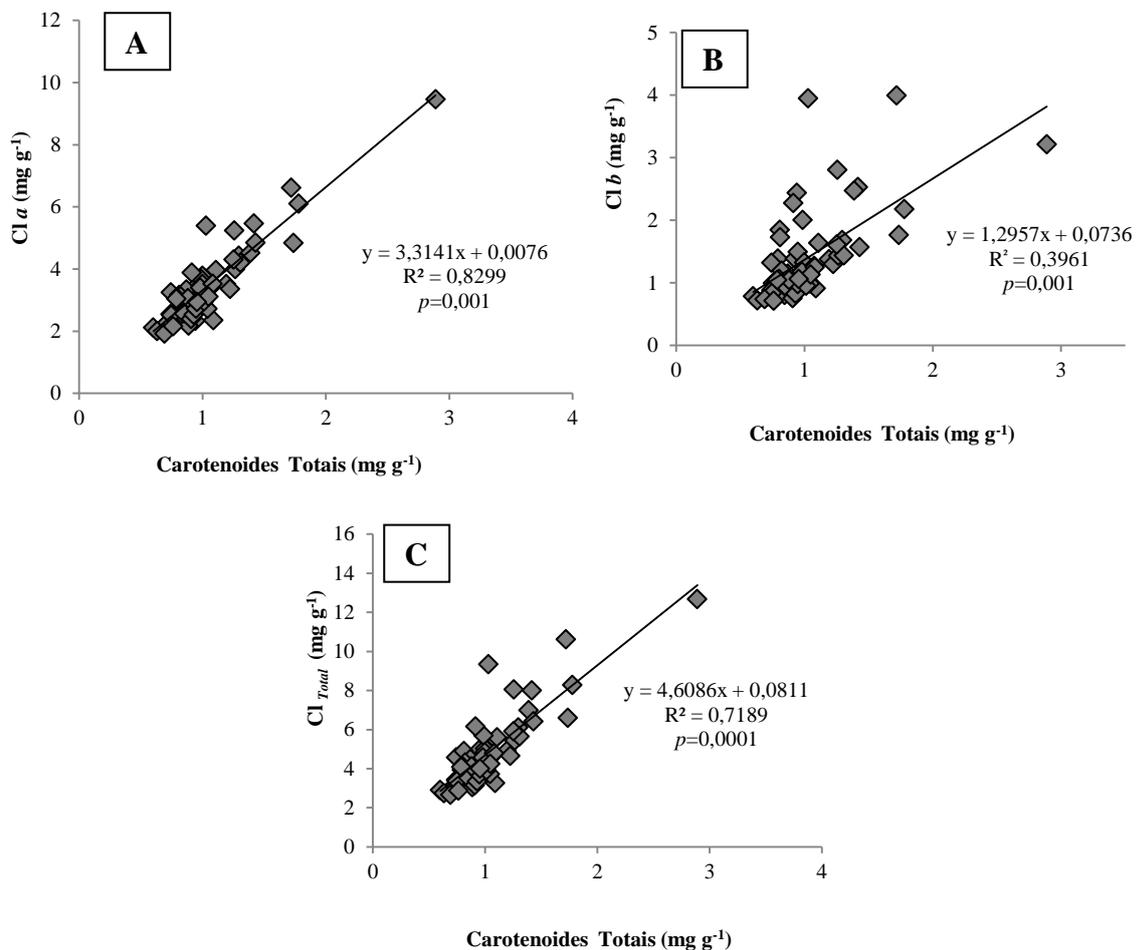


Figura 34 - (A) Correlação entre a concentração de Clorofila *a* (*Cl_a*) e Carotenoides totais; (B) Clorofila *b* e Carotenoides totais; (C) Clorofila Total e Carotenoides Totais de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*

Pela análise da Figura 35 verificou-se que a concentração de carotenoides totais correlacionou-se positivamente com a peroxidação lipídica ($R^2=0,3811$). Este aumento poderá estar relacionado com a função protetora destes pigmentos, uma vez que os carotenoides são compostos fotoprotetores das clorofilas (Meyer *et al.*, 1983).

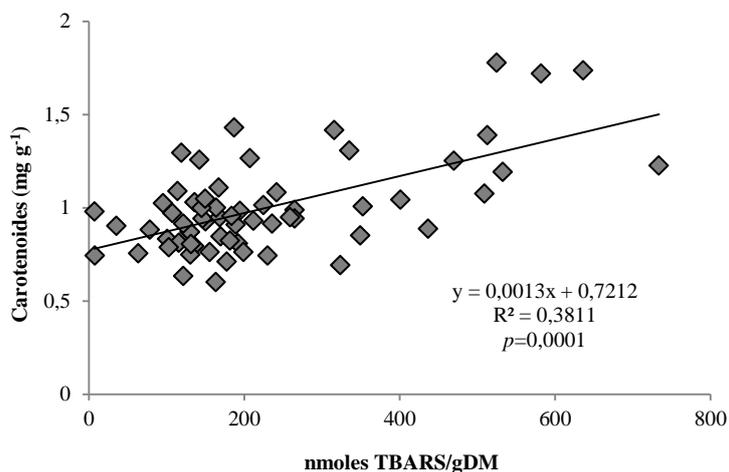


Figura 35 - Correlação entre a concentração de Carotenoides e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*

Observando a Figura 36, relativamente aos valores de E verificou-se que a planta em estudo *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* apresentou uma tendência para um maior valor de E à medida que a concentração de clorofilas totais aumentava ($R^2=0,5244$), coeficiente de determinação significativamente positivo $p=0,0001$.

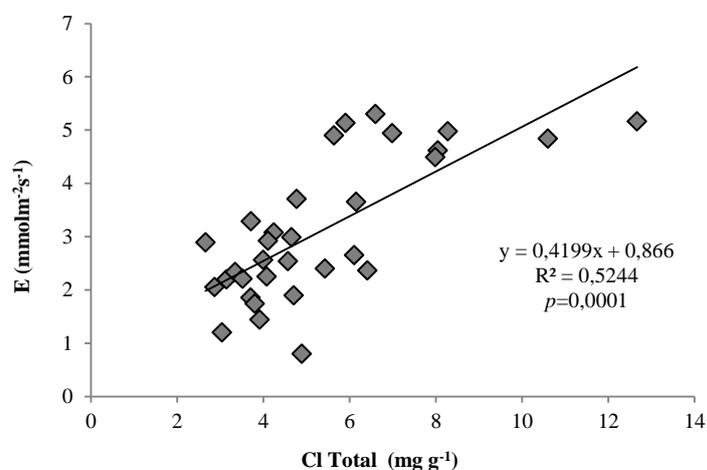


Figura 36 - Correlação entre E (mmolm⁻²s⁻¹) e Clorofila Total (mg g⁻¹) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo dos anos em estudo

III.4.2 Metabolitos

Todos os compostos celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo os radicais livres OH^\cdot fortes oxidantes, com capacidade de provocar a peroxidação dos lípidos membranares e a destruição das proteínas, entre outros danos celulares, que têm como consequência a alteração da permeabilidade das membranas citoplasmáticas (Gülçin *et al.*, 2007). Quando as trocas iônicas ocorrem de um modo desregulado, há liberação de enzimas hidrolíticas dos lisossomas, que podem levar à lise da célula (Foyer *et al.*, 1997; Shahidi, 1997; Augusto, 2006; Gülçin, *et al.*, 2007; Damodaran *et al.*, 2008). Assim, o stresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, favorecendo os oxidantes, levando ao aparecimento de danos fisiológicos e/ou estruturais (Azzi *et al.* 2004).

Os valores da concentração de proteínas solúveis (PS) e da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são apresentados nas Tabela 15, Tabela 16 e Tabela 17. Pela análise destas Tabelas observa-se que não há alterações significativas da concentração de PS com todas as origens de variação. Já no nível de peroxidação lipídica há a registrar algumas variações, nomeadamente maior concentração de TBARS em folhas jovens em 2011 (+64%) e em setembro de 2013 (+53%). Nestas duas situações, as plantas de salva rubra ficarão certamente mais suscetíveis aos radicais livres, pela degradação das membranas, principalmente devido à atividade da lipoxigenase (Berger *et al.*, 2001).

Quanto ao efeito do ano, verificou-se uma diminuição significativa (50%) da concentração de TBARS em 2013 (Tabela 17).

Tabela 15 - Concentração de proteínas solúveis (PS) e peroxidação lipídica (PL) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ciclo vegetativo de 2011

	PS (mg dm ⁻²)	PS (mg g ⁻¹)	PL (nmol TBARS cm ⁻²)	PL (nmol TBARS g ⁻¹)
Estádio de Desenvolvimento (ED)				
Folhas Jovens (FJ)	111,28±52,22	134,63±49,48	4,34±1,40	469,20±131,12
Folhas Adultas (FA)	126,68±42,55	139,13±50,68	1,57±0,50	173,04±51,46
Data (D)				
junho (1D)	108,56±68,76	114,43±68,16	3,27±1,92	319,55±166,08
setembro (2D)	129,40±71,46	159,33±61,27	2,65±1,54	322,69±197,56
ED x D				
FJ x 1D	98,90±69,49	94,73±68,46	4,84±1,4	443,94±148,94
FJ x 2D	123,67±70,72	174,53±78,31	3,84±1,24	494,47±116,02
FA x 1D	118,22±76,93	134,13±65,77	1,69±0,74	195,16±42,70
FA x 2D	135,14±78,06	144,13±70,31	1,45±0,52	150,91±52,27
Valor de P				
ED	0,6902	0,9266	0,0001	0,0001
D	0,5899	0,3616	0,0970	0,9298
ED x D	0,9191	0,4768	0,3044	0,1906

Nota - Valores médios (n=8) ± desvio padrão

Tabela 16 - Concentração de proteínas solúveis (PS) e peroxidação lipídica (PL) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ciclo vegetativo de 2013

	PS (mg dm ⁻²)	PS (mg g ⁻¹)	PL (nmol TBARS cm ⁻²)	PL (nmol TBARS g ⁻¹)
Estádio de Desenvolvimento (ED)				
Folhas Jovens (FJ)	161,63±89,50	157,89±50,09	1,69±0,90	158,57±86,04
Folhas Adultas (FA)	130,76±77,07	133,54±79,69	1,30±0,45	133,35±46,49
Data (D)				
Junho (1D)	182,90±95,74	186,23±86,60	1,09±0,54	110,95±58,59
Setembro (2D)	109,49±34,19	105,20±36,31	1,90±0,67	180,97±62,10
ED x D				
FJ x 1D	205,37±91,12	204,16±84,44	1,14±0,64	108,09±63,68
FJ x 2D	117,89±34,97	111,61±41,37	2,24±0,80	209,04±77,37
FA x 1D	160,43±97,96	168,29±99,13	1,03±0,47	113,81±57,29
FA x 2D	101,08±33,47	98,78±31,94	1,56±0,23	152,90±21,83
Valor de P				
ED	0,5500	0,6558	0,0621	0,2349
D	0,1613	0,1450	0,0004	0,0022
ED x D	0,7848	0,8327	0,1789	0,1476

Nota - Valores médios (n=8) ± desvio padrão

 Tabela 17 - Concentração de proteínas solúveis (PS) e peroxidação lipídica (PL) de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo de dois ciclo vegetativos (2011/2013)

	PS (mg dm ⁻²)	PS (mg g ⁻¹)	PL (nmol TBARS cm ⁻²)	PL (nmol TBARS g ⁻¹)
Estádio de Desenvolvimento (ED)				
Folhas Jovens (FJ)	136,46±51,45	146,26±76,91	3,01±1,77	313,89±161,84
Folhas Adultas (FA)	128,72±43,58	136,33±97,18	1,43±0,49	153,19±52,28
Data (D)				
junho (1D)	145,73±57,12	150,33±63,24	2,17±1,78	215,25±131,68
setembro (2D)	119,45±81,06	132,26±58,23	2,27±1,23	251,83±141,04
Ano (A)				
2011 (1A)	118,98±53,61	136,88±53,29	2,96±1,74	321,12±149,54
2013(2A)	146,19±43,19	145,71±51,61	1,49±0,73	145,96±69,23
ED x D				
FJ x 1D	152,14±96,13	149,45±64,69	2,99±1,19	276,02±105,42
FJ x 2D	120,78±79,85	143,07±46,71	3,04±1,30	351,76±175,50
FA x 1D	139,32±69,15	151,21±52,23	1,36±0,57	154,49±64,40
FA x 2D	118,11±74,16	121,46±78,34	1,51±0,23	151,90±38,71
ED x A				
FJ x 1A	111,28±69,55	134,63±53,48	4,34±1,40	469,21±131,12
FJ x 2A	161,63±89,50	157,89±45,09	1,69±0,90	158,57±86,04
FA x 1A	126,68±40,22	139,13±54,68	1,57±0,50	173,04±51,46
FA x 2A	130,76±77,07	133,54±69,69	1,30±0,45	133,35±46,49
D x A				
1D x 1A	108,56±68,76	114,43±68,16	3,27±1,92	319,55±166,08
1D x 2A	182,90±95,74	186,22±56,60	1,09±0,54	110,96±58,59
2D x 1A	129,40±53,46	159,32±59,27	2,65±1,54	322,69±167,56
2D x 2A	109,49±34,19	105,20±36,31	1,90±0,67	180,97±62,10
Valor de P				
ED	0,8090	0,7854	0,0001	0,0001
D	0,4134	0,6204	0,6382	0,0796
A	0,3969	0,8085	0,0001	0,0001
EDx D	0,8741	0,7484	0,8203	0,0611
ED x A	0,4710	0,6925	0,0001	0,0001
D x A	0,1449	0,0881	0,0010	0,1083

Nota - Valores médios (n=8) ± desvio padrão

A medição da perda de eletrólitos é um método clássico usado para estimar a integridade das membranas em resposta a vários stresses ambientais. Esta determinação permitiu verificar uma maior percentagem de perda de eletrólitos das folhas jovens, relativamente às folhas adultas na colheita de 2011 (Figura 37A). Contrariamente, em 2013 não se registaram diferenças significativas na perda de eletrólitos entre os dois estádios de desenvolvimento (Figura 37B) Relativamente à interação estágio de desenvolvimento x data observou-se uma maior perda de eletrólitos em folhas adultas de setembro (Figura 37C).

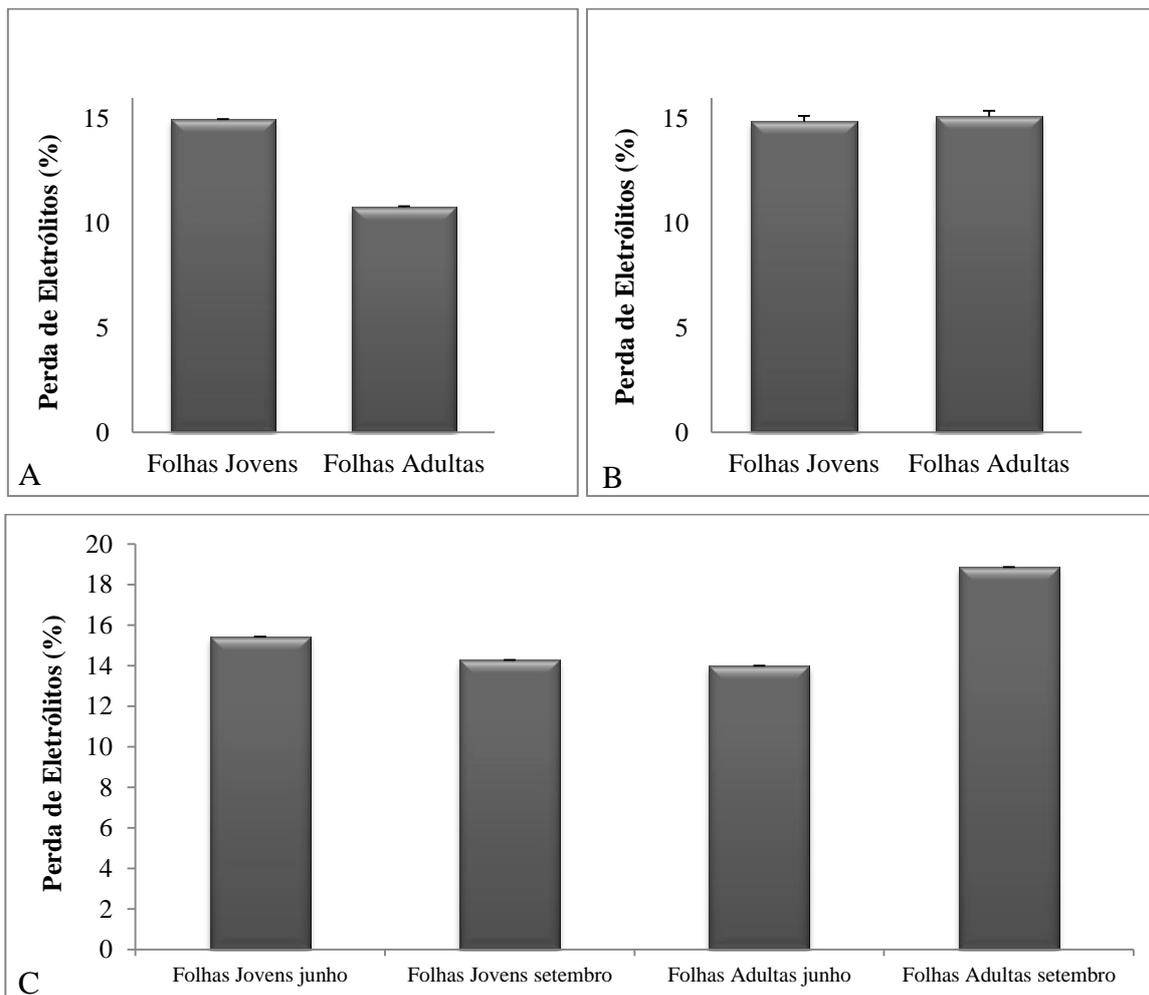


Figura 37 - Valores médios da perda de eletrólitos de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ciclo vegetativo, Colheita de 2011 $p=0,0017$ (A), Colheita de 2013 $p=0,1691$ (B) e 2011/2013 $p=0,0179$ (C). Os valores representam a média ($n=8$) \pm EP

A conjugação dos parâmetros nível de peroxidação lipídica e perda de eletrólitos levam a concluir que os danos membranares nas folhas jovens serão superiores.

Na Tabela 18 e Tabela 19 estão apresentados os resultados da concentração de açúcares solúveis (AS), de amido (AM) e de hidratos de carbono não estruturais de 2011 e 2013, respetivamente.

Pela análise da Tabela 18, pode-se verificar que as folhas jovens de salva rubra apresentaram uma concentração mais elevada de AS, quando expressa quer por peso seco quer por área, em 2011. Estes resultados vão de encontro ao trabalho efetuado por Salgado *et al.* (2005) em plantas de café, *Coffea arabica* L., mas são o oposto do verificado em *Agave tequilana* por Arrizon *et al.* (2010). Há ainda a salientar uma maior razão AS/AM em folhas jovens, que se deve à sua menor concentração de amido (Tabela 18).

Em ambos os anos em estudo, da primeira para a segunda colheita houve um decréscimo significativo nas concentrações de AS, de 22% em 2011 e 33% em 2013. Já os hidratos de carbono não-estruturais (HNE) diminuíram significativamente por área 21% em 2011, associado ao facto da condutância estomática também ter diminuído, o que poderá estar relacionado com uma diminuição do potencial hídrico do solo e uma diminuição na intensidade da radiação solar. Estes resultados vêm de encontro aos referidos nos estudos efetuados em Artemísia, *Tanacetum parthenium* L., por Carvalho *et al.* (2006).

Ao analisar a interação ED x D presente na Tabela 18, é possível referir uma diminuição da concentração de AS (mg g^{-1}) nas folhas adultas, mas um aumento nas folhas jovens entre junho e setembro de 2011. De igual modo, a concentração de AM diminuiu ao longo das datas nas folhas adultas o que no global se repercute na razão AS/AM que aumentou.

Quanto ao ano de 2013 (Tabela 19), verificou-se um aumento da concentração de AM entre junho e setembro, o que se refletiu numa menor razão AS/AM em setembro, provavelmente como forma de melhorar a capacidade de resistência ao stresse estival. Como a natureza e a intensidade da resposta variam com a idade, grau de adaptação e da atividade da planta (Salgado *et al.*, 2005), uma hipótese para explicar esse resultado está relacionada com a morfologia das folhas jovens, uma vez que estas são mais suscetíveis aos fatores externos, devido a pouca lenhificação, processo que aumenta com a maturidade. O período que antecede a maturação foliar é o mais vulnerável aos fatores bióticos e abióticos sendo, provavelmente, necessária a translocação de foto-assimilados para o metabolismo secundário nessas folhas (Salgado *et al.*, 2005). Com efeito, a acumulação de solutos como os açúcares solúveis contribui para uma diminuição do potencial osmótico das células, permitindo assim, a manutenção da absorção da água e da turgescência celular em situações de stresse (Chaves

et al., 2003), podendo estar relacionado com o aumento destes compostos em junho, mês com valores mais baixos de precipitação, comparativamente a setembro.

Tabela 18 - Concentração de açúcares solúveis (AS), amido (AM), hidratos de carbono não estruturais (HNE) e razão AS/AM de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ciclo vegetativo de 2011

	AS (mg dm ⁻²)	AS (mg g ⁻¹)	AM (mg dm ⁻²)	AM (mg g ⁻¹)	AS/AM	HNE (mg dm ⁻²)	HNE (mg g ⁻¹)
Estádio de Desenvolvimento (ED)							
Folhas Jovens (FJ)	53,90±15,70	59,26±18,82	103,59±42,87	121,29±78,87	0,62±0,30	157,49±45,59	180,55±92,63
Folhas Adultas (FA)	37,55±15,75	41,47±16,98	131,89±73,60	147,82±78,16	0,35±0,21	169,40±84,62	189,69±90,29
Data (D)							
junho (1D)	51,45±18,15	50,97±9,06	130,87±73,33	139,06±80,72	0,54±0,35	182,33±75,64	190,03±70,76
setembro (2D)	40,00±15,42	49,76±26,99	104,57±43,98	130,05±78,40	0,43±0,20	144,57±53,23	179,81±79,65
ED x D							
FJ x 1D	58,64±19,81	51,83±10,55	76,24±31,01	66,42±17,94	0,83±0,27	134,89±42,63	118,26±18,36
FJ x 2D	49,16±9,36	66,69±22,84	130,95±35,58	176,16±78,29	0,41±0,14	180,10±38,33	242,85±65,82
FA x 1D	44,26±13,97	50,11±7,92	185,50±61,16	211,70±39,75	0,24±0,04	229,76±72,80	261,81±43,18
FA x 2D	30,84±15,17	32,83±19,62	78,19±35,89	83,93±46,71	0,46±0,26	109,03±41,44	116,76±58,57
Valor de P							
ED	0,0047	0,0048	0,0711	0,1488	0,0009	0,5125	0,6879
D	0,0401	0,8364	0,0917	0,6177	0,1613	0,0445	0,6382
ED x D	0,7147	0,0100	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

Nota - Valores médios (n=8) ± desvio padrão

Tabela 19 - Concentração de açúcares solúveis (AS), amido (AM), hidratos de carbono não estruturais (HNE) e razão AS/AM de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo do ciclo vegetativo de 2013

	AS (mg dm ⁻²)	AS (mg g ⁻¹)	AM (mg dm ⁻²)	AM (mg g ⁻¹)	AS/AM	HNE (mg dm ⁻²)	HNE (mg g ⁻¹)
Estádio de Desenvolvimento(ED)							
Folhas Jovens (FJ)	146,15±40,28	135,29±35,35	86,33±39,60	78,00±36,90	5,50±4,82	232,33±67,34	213,29±43,78
Folhas Adultas (FA)	161,00±45,62	167,39±56,30	74,05±39,76	70,72±30,45	11,68±2,09	235,20±62,20	238,11±49,03
Data (D)							
junho (1D)	183,78±33,39	184,63±42,85	13,65±5,46	13,31±4,63	16,19±7,91	197,43±34,55	197,94±42,59
setembro (2D)	123,37±27,67	118,06±27,74	146,74±57,47	135,41±38,71	0,99±0,53	270,11±66,31	253,46±34,52
ED x D							
FJ x 1D	176,72±25,85	164,22±23,52	17,80±3,16	16,52±2,92	10,20±2,24	194,52±27,05	180,73±24,27
FJ x 2D	115,28±25,55	106,37±14,59	154,86±53,77	139,47±28,57	0,80±0,19	270,14±75,62	245,85±33,10
FA x 1D	190,83±40,08	205,04±49,28	9,49±3,88	10,10±3,72	22,18±6,85	200,33±42,51	215,14±51,20
FA x 2D	131,46±28,96	129,74±33,53	138,65±63,53	131,35±48,55	1,18±0,69	270,08±60,86	261,08±36,39
Valor de P							
ED	0,1737	0,0100	0,4122	0,4730	0,0001	0,8829	0,0718
D	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0008	0,0003
ED x D	0,9247	0,4587	0,7901	0,9324	0,0001	0,8807	0,4760

Nota - Valores médios (n=8) ± desvio padrão

Pela análise da Tabela 20, verificou-se um aumento significativo da razão AS/AM nas folhas adultas relativamente às folhas jovens, exatamente de 3 para 6. Em relação à data de colheita ocorreu uma diminuição significativa da concentração de AS tanto por área (31%), como por peso (29%) no mês de setembro. Apesar do mês de setembro ter uma precipitação superior ao mês de junho, o agosto foi um mês muito seco, nesse sentido é plausível que a salva rubra possa durante o seu crescimento ter a síntese e o armazenamento dos hidratos de carbono afetados pelo déficit hídrico, bem como, utilizá-los em compostos osmoticamente

ativos em resposta ao stresse hídrico. Já a concentração de amido aumentou significativamente em setembro (74%). Há ainda a salientar uma maior concentração de AS, HNE e razão AS/AM em 2013 e de AM em 2011.

Quanto à interação estágio de desenvolvimento x data de colheita verificou-se um aumento significativo, cerca de 3 vezes mais de amido nas folhas jovens em setembro, que se refletiu numa menor razão AS/AM. Na interação estágio de desenvolvimento x ano, registou-se um aumento significativo (cerca de 2x superior) da concentração de AS entre 2011 e 2013, tanto nas folhas jovens como nas folhas adultas, que se veio a refletir no aumento da razão AS/AM.

Relativamente à data de colheita *versus* ano, observou-se um aumento significativo (cerca de 3x superior) da concentração de AS em setembro. Também, a concentração de HNE aumentou consideravelmente no segundo ano de estudo em ambas as datas de colheita. Já a concentração de AM sofreu uma diminuição muito brusca em junho de 2013, o que conduziu a uma maior razão AS/AM.

Tabela 20 - Concentração de açúcares solúveis (AS), amido (AM), hidratos de carbono não estruturais (HNE) e razão AS/AM de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo dos ciclos vegetativos de 2011/2013

	AS (mg dm ⁻²)	AS (mg g ⁻¹)	AM (mg dm ⁻²)	AM (mg g ⁻¹)	AS/AM	HNE (mg dm ⁻²)	HNE (mg g ⁻¹)
Estádio de Desenvolvimento(AD)							
Folhas Jovens (FJ)	99,95±55,62	97,28±47,62	94,96±63,60	99,64±65,04	3,06±1,01	194,91±68,15	196,92±73,18
Folhas Adultas (FA)	99,35±71,19	104,43±75,92	102,95±80,93	109,27±83,19	6,02±2,90	202,30±80,34	213,70±75,42
Data (D)							
junho (1D)	117,61±72,23	117,80±74,41	72,26±58,50	76,19±45,11	8,36±3,67	189,88±58,35	193,99±63,64
setembro (2D)	81,69±47,74	83,91±43,91	125,65±54,71	132,73±60,88	0,71±0,48	207,34±86,98	216,64±82,92
Ano (A)							
2011 (1A)	45,73±17,56	50,37±19,81	117,72±60,96	134,55±78,41	0,48±0,29	163,44±67,14	184,92±89,90
2013 (2A)	153,57±43,03	151,31±49,03	80,19±48,63	74,35±47,69	8,59±4,49	233,77±63,78	225,70±47,43
ED x D							
FJ x 1D	117,68±64,90	108,02±60,64	47,02±26,93	41,47±28,60	5,52±2,07	164,71±46,24	149,50±38,38
FJ x 2D	82,22±38,88	86,53±27,62	145,90±45,74	157,82±60,00	0,60±0,25	225,12±74,27	244,35±69,27
FA x 1D	117,55±81,05	127,58±86,96	97,50±50,81	110,09±67,61	11,21±5,26	215,05±59,56	238,47±51,71
FA x 2D	81,15±38,88	81,28±56,64	108,41±58,81	107,64±52,13	0,82±0,63	189,56±97,19	188,92±88,16
ED x A							
FJ x 1A	53,90±15,75	59,26±18,82	103,59±42,87	121,29±78,16	0,63±0,30	157,49±45,59	180,55±92,63
FJ x 2A	146,00±40,28	135,29±35,35	86,33±59,76	77,99±40,90	5,51±2,09	232,33±67,34	213,29±43,78
FA x 1A	37,55±15,70	41,47±16,98	131,85±73,60	147,82±68,87	0,36±0,21	169,40±84,62	189,29±89,90
FA x 2A	161,15±45,62	167,39±56,30	74,05±49,60	70,72±46,45	11,68±5,82	235,20±62,20	238,11±49,03
D x A							
1D x 1A	51,45±18,15	50,97±17,30	130,87±73,33	139,06±70,72	0,54±0,35	182,33±75,64	190,03±80,76
1D x 2A	183,78±33,39	184,63±30,61	13,65±5,48	13,31±4,63	16,19±7,91	197,43±34,55	197,94±42,59
2D x 1A	40,00±15,42	49,76±18,93	104,57±43,98	130,05±68,40	0,43±0,20	144,57±53,23	179,81±100,60
2D x 2A	123,37±27,67	118,06±29,60	146,74±57,47	135,41±38,71	0,99±0,53	270,11±66,31	253,46±34,52
Valor de P							
ED	0,9211	0,2756	0,4514	0,3510	0,0001	0,5776	0,1897
D	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,1908	0,0785
A	0,0001	0,0001	0,0008	0,0001	0,0001	0,0001	0,0021
ED x D	0,9388	0,0614	0,0002	0,0001	0,0001	0,0019	0,0001
ED x A	0,0117	0,0003	0,0596	0,1044	0,0001	0,7333	0,5271
D x A	0,0002	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0119

Nota - Valores médios (n=8) ± desvio padrão

A composição bioquímica de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* é determinada essencialmente por fatores genéticos, no entanto, existem outros fatores que conduzem a alterações significativas na produção dos metabolitos secundários (Böszörményi *et al.*, 2009).

Os compostos fenólicos representam um grande grupo de moléculas que influenciam o crescimento, desenvolvimento e as defesas da planta. Estas moléculas podem ser sinalizadoras, repulsoras ou mesmo protetoras de insetos, fungos, bactérias ou vírus (Vermerris *et al.*, 2006).

Os teores fenólicos totais, flavonoides, *orto*-difenois extraídos e atividade antioxidante de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Atividade antioxidante, *orto*-difenóis, flavonoides, fenóis totais de folhas jovens (frescas e secadas) e adultas (frescas e secadas) de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo dos ciclos vegetativos de 2011/2013

	Data de Colheita	Ano Colheita 2011				Ano de Colheita 2013			
		Folhas jovens		Folhas adultas		Folhas jovens		Folhas adultas	
		Frescas	Secadas	Frescas	Secadas	Frescas	Secadas	Frescas	Secadas
Atividade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ peso fresco)	Junho	11,25 \pm 3,84 ^a	75,44 \pm 18,79 ^b	10,68 \pm 0,56 ^a	64,48 \pm 9,23 ^b	24,48 \pm 3,03 ^a	81,85 \pm 2,73 ^b	27,37 \pm 2,70 ^a	79,27 \pm 7,43 ^b
	Setembro	17,86 \pm 1,21 ^a	63,06 \pm 3,38 ^c	40,71 \pm 6,41 ^b	73,00 \pm 3,35 ^c	23,18 \pm 3,41 ^a	65,65 \pm 6,93 ^c	22,02 \pm 1,66 ^a	62,26 \pm 10,03 ^c
Orto-difenóis (mg ácido gálico.g ⁻¹ peso fresco)	Junho	12,87 \pm 0,87 ^a	34,90 \pm 2,86 ^c	12,72 \pm 0,47 ^a	44,30 \pm 2,14 ^d	19,78 \pm 3,62 ^b	20,26 \pm 0,06 ^b	12,72 \pm 1,83 ^a	55,52 \pm 1,78 ^c
	Setembro	15,54 \pm 2,00 ^a	41,57 \pm 2,29 ^{bc}	16,26 \pm 2,90 ^a	45,12 \pm 5,26 ^c	19,92 \pm 1,31 ^a	42,85 \pm 1,21 ^{bc}	14,11 \pm 0,63 ^a	37,24 \pm 2,07 ^b
Flavonóides (mg catequina.g ⁻¹ peso fresco)	Junho	4,04 \pm 0,53 ^b	11,20 \pm 0,48 ^c	2,94 \pm 0,37 ^{ab}	13,90 \pm 2,38 ^{cd}	2,39 \pm 0,27 ^{ab}	16,01 \pm 0,52 ^d	1,10 \pm 0,20 ^a	16,53 \pm 0,85 ^d
	Setembro	3,49 \pm 0,17 ^{ab}	14,58 \pm 0,96 ^d	5,61 \pm 0,81 ^b	14,88 \pm 1,16 ^d	10,99 \pm 0,74 ^c	9,86 \pm 1,16 ^c	2,58 \pm 0,38 ^a	9,59 \pm 0,35 ^c
Fenóis Totais (mg ácido gálico.g ⁻¹ peso fresco)	Junho	13,16 \pm 2,11 ^b	11,45 \pm 2,91 ^b	5,96 \pm 0,31 ^a	12,94 \pm 1,52 ^b	6,53 \pm 0,39 ^a	14,94 \pm 0,54 ^b	3,19 \pm 0,07 ^a	13,87 \pm 0,77 ^b
	Setembro	6,51 \pm 0,65 ^b	12,38 \pm 0,59 ^d	6,54 \pm 0,61 ^b	13,07 \pm 1,79 ^d	6,15 \pm 0,31 ^{ab}	9,26 \pm 0,48 ^c	3,94 \pm 0,33 ^a	8,90 \pm 0,52 ^c

Nota - Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0.05$) para cada parâmetro avaliado (teste Tukey)

Os compostos fenólicos, avaliados sob a forma de fenóis totais, *orto*-difenóis e flavonoides, têm, como já foi descrito anteriormente, atividade antioxidante, pelo que estes parâmetros foram avaliados a partir das amostras dos extratos.

Independentemente do ano e da data da colheita, relativamente às folhas jovens e adultas, verificou-se um aumento significativo em todos os parâmetros quando estas foram secadas. Estes resultados mostraram que a extração com folhas secadas é mais eficaz comparativamente com extratos provenientes de folhas frescas (Tabela 21). Estes resultados são semelhantes aos resultados publicados nos trabalhos efetuados por Tosun (2009) e seus colaboradores e Esturk (2012) com outras espécies de *Salvia*. As concentrações de *orto*-difenóis em particular e a atividade antioxidante aumentaram, podendo prever-se alguma correlação entre estes dois fatores.

A elevada atividade antioxidante das folhas secadas revelada por valores de $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ peso fresco, em detrimento das folhas frescas, pode ser explicada pelo melhor rendimento dos extratos, devido à redução da degradação enzimática e a consequente minimização das perdas de princípios ativos. O início da degradação dos metabolitos das plantas começa no momento da colheita e continua durante o tempo de armazenamento, que irá contribuir para a variação da composição em princípios ativos e da atividade antioxidante da planta (Chan *et al.*, 2009; Esturk, 2012).

Os valores dos flavonoides relativos aos extratos secados (com uma variação entre $9,59\text{mg catequina.g}^{-1}$ e $16,53\text{mg catequina.g}^{-1}$ peso fresco) foram inferiores aos resultados obtidos por Bahadori *et al.* (2015) que obtiveram $30\text{mg catequina.g}^{-1}$ amostra em estudos efetuados em *Salvia urmiensis* Bunge e $25\text{mg catequina.g}^{-1}$ amostra em *Salvia hydrangea*, resultados também superiores apresentaram Alimpić *et al.* (2014) $33,69\text{mg catequina.g}^{-1}$ amostra de flavonoides para *Salvia amplexicaulis*.

O teor de água é um dos fatores críticos quando o processamento inclui a secagem de várias plantas aromáticas (Soysal *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2006), incluindo *Salvia* (Kouhila *et al.*, 2001). Estes investigadores salientaram o facto do teor de humidade inicial poder influenciar a taxa de secagem. Este facto pode resultar na necessidade da utilização de mais tempo/temperatura para alcançar as condições ótimas de secagem, em relação ao armazenamento e processamento adicional, para que daí não resulte uma perda de qualidade do produto (Díaz-Maroto *et al.*, 2003; Tanko *et al.*, 2005; Esturk, 2012). Outro parâmetro importante relativo à secagem de *Salvia* é a área foliar. Uma maior área foliar permite uma

superfície maior de perda de água, que por sua vez favorece uma secagem rápida (Tanko *et al.*, 2005).

A secagem das plantas aromáticas e medicinais visa impedir as reações de hidrólise e o crescimento de microrganismos, minimizando assim a sua deterioração em decorrência da redução da atividade enzimática, permitindo a conservação das plantas por um maior período de tempo para a sua posterior comercialização e uso (Who, 2003; Costa *et al.*, 2005).

Segundo WHO, (2003), a Organização Mundial de Saúde recomenda que as plantas medicinais sejam secas a temperaturas inferiores a 60°C evitando perda de material volátil e degradação de princípios ativos. A amostra secada utilizada neste trabalho foi desidratada em ambiente seco ao abrigo da luz a 40°C, o ambiente de desidratação do material vegetal ocorreu pela redução da humidade do ar, sem grandes elevações de temperatura, preservando desta forma, as características originais da planta, uma vez que vários trabalhos indicam que a temperatura que menos danos provoca no material vegetal é a de 40°C (Who, 2003; Costa *et al.*, 2005; Blank *et al.*, 2007; Negri *et al.*, 2009).

Ainda que pela análise da Tabela 21 não seja possível verificar diferenças significativas entre as amostras recolhidas nos dois anos em estudo, os resultados da atividade antioxidante entre os meses de junho e setembro apresentaram algumas diferenças. No que se refere ao mês de junho, todas as amostras de folhas frescas, independentemente de serem jovens ou adultas têm similaridade entre si. Do mesmo modo, e para o mesmo mês, as amostras de folhas secadas agrupam-se, independentemente do seu estágio de desenvolvimento. Para o mesmo parâmetro avaliado, atividade antioxidante, e para o mês de setembro, ainda que seja visível a mesma tendência indicada para o mês de junho, os extratos obtidos de folhas adultas frescas, em 2011, não agrupam com as restantes amostras de folhas frescas, tendo apresentado um valor de atividade antioxidante ligeiramente superior.

Os parâmetros da atividade antioxidante e *orto*-difenóis da colheita de 2013 tiveram uma tendência de aumento relativamente à colheita de 2011 sendo esse aumento maior nas folhas frescas, o que poderá relacionar-se com o verão quente e seco ocorrido nesse ano (Figura 22) razão apresentada também por Gobbo-Neto *et al.* (2007) nos seus trabalhos. Quando se avaliam os valores registados para o parâmetro *orto*-difenóis verificou-se uma dispersão muito grande dos resultados obtidos para o mês de junho, não sendo possível encontrar similaridades nos anos de colheita, nem em nenhuma das variáveis analisadas. As amostras secadas, ainda que tenham originado valores mais elevados, não são todas semelhantes entre si. Se compararmos a atividade antioxidante registada, com as

concentrações de *orto*-difenóis das amostras, pode-se registrar o facto de que a maior atividade antioxidante está claramente associada aos maiores valores de *orto*-difenóis medidos nos extratos obtidos de folhas secadas. Esta tendência era a esperada já que vários estudos referenciam os *orto*-difenóis (Cioffi *et al.*, 2002) como sendo um dos compostos maioritariamente responsável por esta atividade (Generalic *et al.*, 2012; Bahadori *et al.*, 2015).

Comparando a atividade antioxidante das folhas jovens fresca de junho de 2011 que apresentaram valores de $11,3\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ amostra e as folhas jovens fresca da mesma data de colheita do ano de 2013 apresentaram valores de $24,5\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ amostra; as folhas jovens frescas de setembro de 2011 apresentaram valores de $17,9\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ amostra e as folhas jovens frescas da mesma data de colheita do ano de 2013 apresentaram valores de $23,18\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ amostra que poderá estar relacionado com o aumento dos *orto*-difenóis, já que o teor em fenóis totais nas folhas frescas jovens teve uma diminuição e as folhas adultas frescas não sofreram qualquer variação.

Os valores de flavonoides obtidos, à semelhança dos resultados obtidos para os *orto*-difenóis, também revelaram alguma dispersão e dissimilaridade entre amostras, que não puderam ser correlacionados com o ano da colheita, com o mês ou com o estágio de desenvolvimento das folhas. As amostras de junho revelaram uma elevada variação, sendo que a única tendência a manter-se foi que as amostras secadas apresentaram valores mais elevados. Nas amostras de setembro, esta tendência manteve-se. Há 4 agrupamentos com diferenças significativas entre si, sendo que, mais uma vez as amostras de folhas secadas apresentaram valores mais elevados deste parâmetro. Para os flavonoides, foi significativamente diferente o ano da colheita para as folhas secadas (independentemente de seres jovens ou adultas), tendo-se obtido valores mais elevados no ano de 2011. Estas diferenças não se refletiram na atividade antioxidante registada, porque, como já referimos anteriormente, não se detetaram diferenças entre anos na atividade antioxidante. No entanto houve um aumento dos flavonoides folhas jovens frescas de 2013 da primeira colheita junho para setembro, mas esse aumento foi inferior aos resultados obtidos por Almeida *et al.* (2014) em *Salvia officinalis*.

O parâmetro avaliado fenóis totais particularmente no que se refere às amostras do mês de junho, provenientes de folhas frescas têm similaridades entre si, e registam valores mais baixos, comparativamente com as amostras provenientes de folhas secadas. A amostra de folhas jovens frescas de 2011 apresentou mais similaridades com as restantes amostras de

folhas secadas. Os resultados obtidos no mês de setembro mostraram elevada dispersibilidade. Manteve-se a tendência já referida para os flavonoides: nas amostras de setembro, as secadas de 2013 apresentaram valores mais baixos do que as amostras de folhas secadas de 2011 (que revelaram os maiores teores entre todos os parâmetros). A atividade antioxidante não parece estar relacionada com este fator, pois ao contrário do verificado para os fenóis totais com valores mais elevados em 2011, a atividade antioxidante foi superior em 2013.

Os extratos das folhas frescas selecionadas para este estudo apresentaram um teor de fenóis totais baixo com uma variação de 6,5mg ácido gálico g^{-1} peso fresco e 13,2mg ácido gálico g^{-1} de peso fresco na colheita de 2011, 3,2mg ácido gálico g^{-1} de peso fresco e 6,5mg ácido gálico g^{-1} de peso fresco na colheita de 2013. Estes resultados são semelhantes aos descritos por Wojdylo *et al.* (2007) e Roby *et al.* (2013), em *Salvia officinalis* L., sendo no entanto mais baixos do que os apresentados nos estudos efetuados por Almeida *et al.*, (2014), com *Salvia officinalis* L. e por Dudonné e seus colaboradores (2009), em *Salvia sclarea* que obtiveram 50,1mg GAE. g^{-1} e 17,56mg GAE. g^{-1} ambas por peso fresco, respetivamente, tal como em estudos realizados por Tosun *et al.* (2009), efetuados com 8 espécies de *Salvia* em que o conteúdo fenólico total variou entre (50,3mg GAE. g^{-1} e 101,2mg GAE. g^{-1}), em estudos efetuados por Bahadori *et al.* (2015) em duas espécies de *Salvia* (*Salvia urmiensis* Bunge e *Salvia hydrangea*) e trabalhos realizados por Stagos *et al.* (2012), em diferentes espécies da família das Lamiaceae. Já a concentração de fenóis totais das folhas secadas de ambas as colheitas do presente estudo, foram inferiores aos resultados obtidos em *S. verticillata* 50,3mg GAE. g^{-1} e *Salvia nemorosa* 63,9mg GAE. g^{-1} peso fresco por Tosun *et al.* (2009).

Relativamente à atividade antioxidante das folhas jovens secadas, estas tiveram um decréscimo de junho para setembro, uma vez que o ABTS determina a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, sendo que esta discrepância poderá ser inerente às características e ao mecanismo de ação do(s) composto(s) bioativo(s). A atividade antioxidante dos extratos de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* pertencente à família Lamiaceae, família esta a que se atribuiu principalmente a presença de compostos fenólicos, voláteis e não voláteis, como os flavonoides, os ácidos fenólicos e os diterpenos fenólicos (Shan *et al.*, 2005; Grzegorzczuk *et al.*, 2007; Shan *et al.*, 2007; Roby *et al.*, 2013) e sendo que a maior parte desta atividade é atribuída aos compostos hidrofóbicos (Roby *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2015) sendo estes bastante instáveis e facilmente degradáveis, poderá ser uma das causas da diminuição da atividade antioxidante neste período.

A idade e o estágio de desenvolvimento da planta podem influenciar não apenas a quantidade total de metabolitos secundários produzidos, mas a proporção relativa destes compostos (Salgado *et al.*, 2005; Gobbo-Neto *et al.*, 2007). Tecidos mais jovens geralmente apresentam grande atividade biossintética, aumentando a produção de vários metabolitos secundários (Salgado *et al.*, 2005), tal como se verificou nesta espécie onde as folhas mais jovens das duas colheitas apresentaram teores de metabolitos significativamente superiores às folhas adultas. Na colheita de 2013 a diminuição dos teores das folhas jovens para as folhas adultas foi de 36% nos *orto*-difenóis, 54% nos flavonoides e 51% nos fenóis totais de junho. Já nos extratos de setembro a descida foi mais acentuada 29%, 77% e 36% nos *orto*-difenóis, flavonoides e fenóis totais, respetivamente.

Como a natureza e a intensidade da resposta variam com a idade, grau de adaptação e da atividade da planta, uma hipótese para explicar este aumento na folhas mais jovens poderá estar relacionado com a morfologia das folhas jovens, uma vez que as mesmas são mais suscetíveis aos fatores externos, devido à pouca lenhificação, processo que aumenta com a maturidade, bem como devido à sua localização nas extremidades das plantas. O período que antecede a maturação foliar é o mais vulnerável aos fatores bióticos e abióticos sendo, provavelmente, necessária a translocação de fotoassimilados para o metabolismo secundário nessas folhas (Castro-Díez *et al.*, 2000; Salgado *et al.*, 2005; Gobbo-Neto *et al.*, 2007; Pellegrini *et al.*, 2015).

Os resultados encontrados no presente trabalho, relativamente à atividade antioxidante das folhas fresca foram superiores aos valores obtidos por estudos efetuados por Dudonné *et al.* (2009), em *Salvia sclarea*. No entanto, comparando com o trabalho efetuado por Almeida *et al.* (2014) em *Salvia officinalis* L. obtiveram-se valores mais baixo da atividade antioxidante. Na colheita de 2013 ocorreu um aumento em relação a 2011, valores estes superiores aos obtidos por Bahadori *et al.* (2015) em estudos efetuados em *Salvia urmiensis* Bunge e *Salvia hydrangea*. Já Stagos *et al.* (2012), em estudos efetuados em espécies da família das Lamiaceae, Miliauskas *et al.* (2004) e Mariutti *et al.* (2008) em trabalhos realizados com espécies aromáticas, nomeadamente *Salvia officinalis*, obtiveram uma elevada capacidade antiradicalar, superiores a este estudo.

Apesar de não ser possível inferir com precisão quais são os compostos responsáveis pela ação antioxidante obtida, os *orto*-difenóis e os flavonoides devem ser parcialmente responsáveis por esta atividade. Esta inferência resulta da consulta às referências bibliográficas que consolidam as diferentes atividades exibidas por esta classe de metabolitos

secundários, os quais são descritos preponderantemente como potentes antioxidantes (Cioffi *et al.*, 2002; Generalić *et al.*, 2012; Bahadori *et al.*, 2015).

É, no entanto, difícil haver uma concordância relativamente aos resultados na literatura sobre a atividade antioxidante, pois existem uma panóplia de fatores a intervir neste parâmetro tais como: fatores genéticos, de cultivo, climáticos, os diferentes métodos de extração e análise, entre outros.

Tentando extrapolar a relação que existe entre o conteúdo em fenóis totais, flavonoides e *orto*-difenóis e a atividade antioxidante é possível verificar de acordo com a Figura 38, que houve uma correlação significativa entre estes parâmetros.

Verificou-se que à medida que as concentrações de fenóis totais, *orto*-difenóis e flavonoides aumentam, há como resposta um acréscimo da atividade antioxidante sendo que os coeficientes de determinação encontrados entre estas variáveis foram, de $R^2=0,9531$, $R^2=0,9736$ e $R^2=0,9522$ respetivamente. Verificou-se uma maior correlação entre o teor dos *orto*-difenóis e a atividade antioxidante comparativamente aos valores dos fenóis totais e flavonoides, sugerindo que os *orto*-difenóis têm uma contribuição maior para a capacidade antioxidante da *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*.

A resposta positiva indicativa que os fenóis totais contribuem para a atividade antioxidante observada através das análises efetuadas, está de acordo com trabalhos realizados por Tosun e seus colaboradores (2009), e Dudonné *et al.* (2009) com espécies de *Salvia*, onde verificaram uma correlação linear positiva entre os fenóis totais e a atividade antioxidante.

Estes resultados indicam uma tendência de relação entre a concentração dos metabolitos secundários dos extratos da planta em estudo e a capacidade de eliminação de radicais livres dos mesmos.

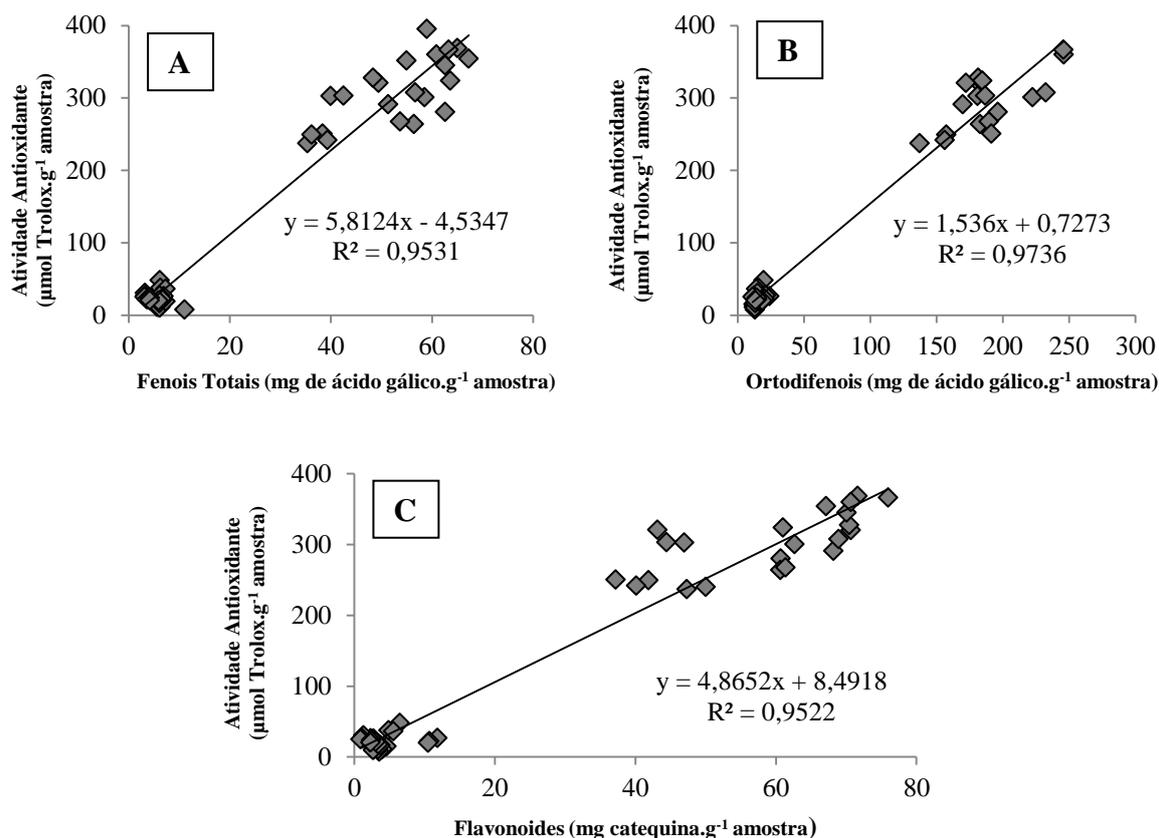


Figura 38 - (A) Correlação entre a composição fenólica e atividade antioxidante; (B) Correlação entre a composição de *orto*-difenóis e atividade antioxidante; (C) Correlação entre a composição em flavonoides e atividade antioxidante de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo dos anos em estudo

III.5 Análise de Componentes Principais (PCA)

Assim de forma a compilar toda a informação obtida na avaliação do teor em compostos fenólicos (fenóis totais, flavonoides e *orto*-difenóis) e atividade antioxidante registada nas 16 amostras de folhas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*, foi aplicada uma análise de componentes principais aos dados obtidos. Com a aplicação desta técnica à totalidade das amostras analisadas com o uso de apenas duas componentes principais, foi possível explicar 98,7% da variância observada (95,4% na primeira dimensão e 3,3% na segunda dimensão).

Tabela 22 - Pesos das distintas variáveis para a ponderação dos componentes principais PC1 e PC2 de folhas jovens e adultas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*

Variáveis:	2011/2013		2011		2013	
	PC1(95,4 %)	PC2 (3,3%)	PC1 (97,9 %)	PC2 (1,1 %)	PC1 (93,3 %)	PC2 (6,2 %)
Ativ. Antioxidante	0,50548	-0,14865	0,49726	0,75688	0,51397	-0,10386
Fenóis Totais	0,50341	-0,39675	0,50004	0,14226	0,50796	-0,37802
Flavonoides	0,50497	-0,28346	0,50037	-0,51080	0,50920	-0,31243
<i>Orto</i> -difenóis	0,48587	0,86032	0,50232	-0,38206	0,46747	0,86528

A primeira informação que se observou é a existência de uma clara diferenciação entre folhas frescas e as folhas secadas (Figura 39 A) as quais se encontram agrupadas em dois conjuntos bem distintos, sendo o primeiro conjunto constituído por todas as amostras de folhas frescas e o segundo por todas as amostras de folhas secadas, distinguidas pelo PC1.

A primeira componente, 95,4%, pode ser interpretada como um contraste, de um lado as folhas frescas com pesos negativos por outro as folhas secadas com peso positivo. Pela Tabela 21 e Tabela 22, confirmam-se os resultados da PCA pois observou-se uma menor concentração de componentes fenólicos nas folhas frescas quando comparadas com as amostras das folhas secadas.

Para as amostras de folhas secadas jovens, verificou-se que todas elas estão muito próximas entre si. Já para as amostras de folhas secadas adultas verifica-se uma maior variação relativamente a PC1. Apenas as amostras de folhas secadas adultas junho e setembro de 2013, (Figura 39 C), apresentam uma maior proximidade entre si, no que diz respeito a este componente.

Quanto aos anos de colheita 2011 e 2013 os dados para o extrato de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* correspondem a 99,0% da variância total acumulada (97,9% na primeira dimensão e 1,1% na segunda dimensão) e 99,5% da variância total acumulada (93,3% na primeira dimensão e 6,2% na segunda dimensão), respetivamente. Tal como para as amostras totais, também existem dois grupos bastante distintos nestes dois anos de colheita, sendo que as folhas frescas correlacionam-se negativamente com o PC1, revelando que o fator responsável pela variabilidade são os teores em *orto*-difenóis.

Consultando a Tabela 22 confirma-se que as folhas frescas têm concentrações de *orto*-difenóis significativamente mais baixos que as folhas secadas. No ano de colheita de 2011 as amostras de folhas secadas de junho afastam-se positivamente das restantes amostras de folhas secadas, segundo a componente PC2 aparentando valores mais altos que poderá estar relacionado com os *orto*-difenóis.

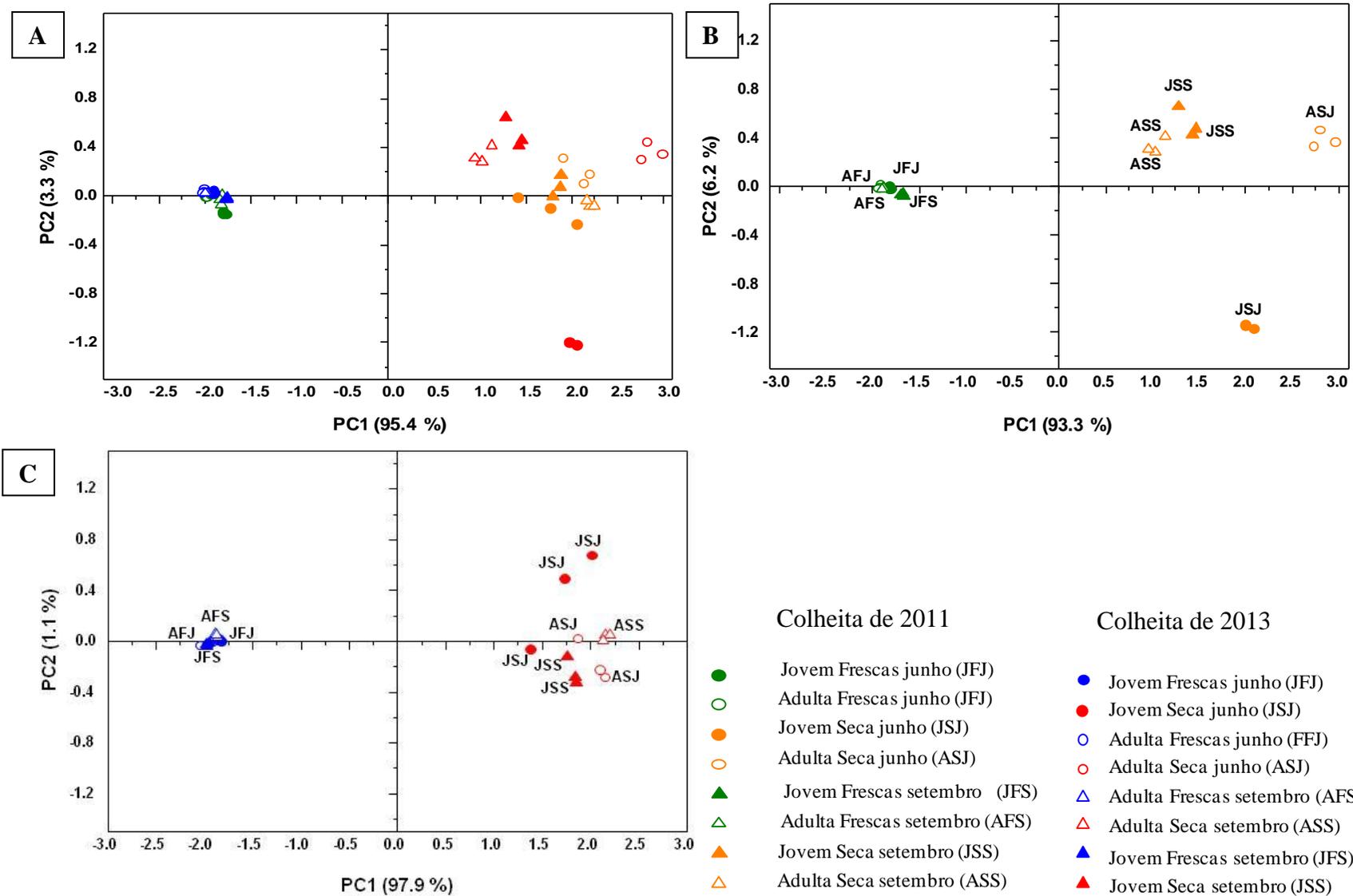


Figura 39 - Análise de componentes principais usando o perfil em fenóis totais, flavonoides e *orto*-difenóis assim como a atividade antioxidante de (A) amostras dos dois anos; (B) amostras de 2011; (C) amostras de 2013 de folhas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* ao longo dos anos em estudo

O dendograma da Figura 40 corrobora os resultados previamente discutidos na Figura 39, onde fica claro o agrupamento existente entre os conjuntos formados pelas amostras de folhas frescas e as amostras de folhas secadas. Os dados mostram uma clara relação entre as amostras de cada tipo, ou seja, estas encontram-se em ramos distintos na árvore hierárquica, sendo a distância euclidiana máxima entre estes dois grupos. Verificou-se que as amostras de folhas frescas são mais próximas entre si, tal como havia sido observado na análise por componentes principais com uma distância euclidiana inferior a 0,25 relativamente aos parâmetros em estudo, comparando com as amostras de folhas secadas em que a distância Euclidiana apresentou-se superior a 0,25 na maior parte das amostras.

No que respeita às amostras frescas, a amostra de folhas jovens de junho de 2011 é a que se apresenta menos similar em relação ao conjunto. Aparentemente a maior concentração em fenóis totais registada neste momento de colheita pode ter contribuído para esta discriminação. Quanto às folhas secadas, a amostra de folhas jovens colhida em junho de 2013, tem menos similaridade com as restantes, particularmente com as amostras de folhas secadas de 2013. A análise da Tabela 21 mostra que para os *orto*-difenois, nesta data em particular, os valores medidos foram anormalmente baixos, comparativamente com os obtidos para as restantes amostras secas.

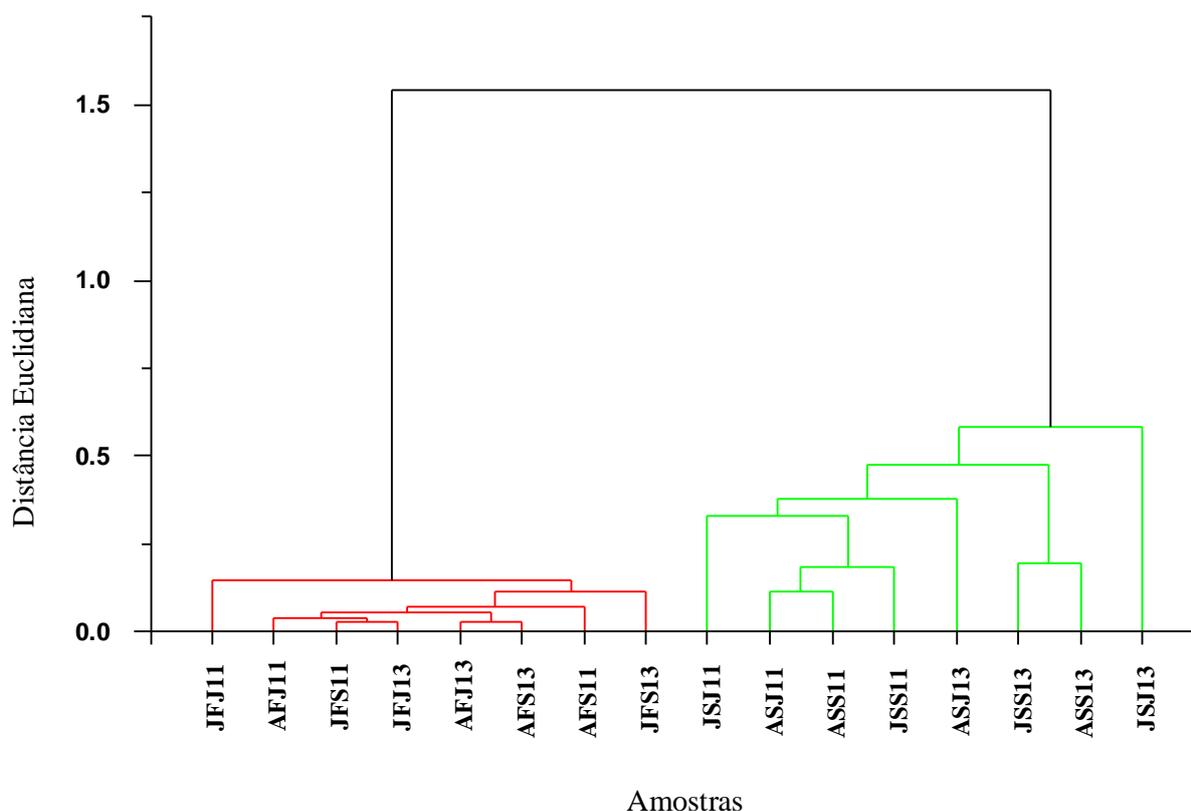


Figura 40 - Dendrograma obtido através de análise de “Clusters”, recorrendo às quantificações de fenóis totais presentes em todas as amostras do extrato de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*

III.6 Estudos da Atividade Antimicrobiana

Neste trabalho, procedeu-se à avaliação da bioatividade de extratos etanólicos de folhas de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*, usando como metodologia a medição do halo de inibição de crescimento em meio agarizado, sobre microrganismos patogénicos, oportunistas e não patogénicos, causadores de infeções de origem hospitalar e alimentar. Testou-se a ação dos extratos sobre bactérias, seres procariontes, mais simples, e sobre leveduras, seres eucariontes, pertencentes ao Reino Fungi, mas com crescimento unicelular.

A medição dos halos de inibição de crescimento foi efetuada, em todos os ensaios, após 48h de incubação, pois em nenhuma das experiências se obteve crescimento visível no final das primeiras 24h. A apresentação dos resultados é dada nas Tabela 23 e Tabela 24 (Tabela 23 para os EHE, e Tabela 24 para os EE). Na Tabela 24 apresentam-se ainda os resultados obtidos quando se testou o efeito potenciador do extrato EHE associado ao Fluconazole (meio MHFII), antifúngico de uso rotineiro em patologias provocadas por leveduras do género *Candida*.

As medidas apresentadas resultam do cálculo da média aritmética de dois ensaios com 3 réplicas cada um, para cada um dos extratos, sendo que os extratos per si são eles próprios uma réplica, conforme explicado no ponto II.4.5.6.1. Os resultados qualitativos expressos como presença/ausência de halo de inibição, foram convertidos numa escala semiquantitativa de acordo com Martins *et al.* (2015), com ligeiras alterações conforme indicado a seguir: (-) ausência de halo (0,0mm); (+) halo fraco - 1,5 - 7,0mm; (++) halo moderado - 8,0 - 10,0mm; (+++); halo forte - superior a 11,0mm.

Não foi verificada qualquer inibição sobre o crescimento da espécie *Candida albicans* quando os extratos foram testados no meio MHII. Alguma inibição sobre o crescimento desta espécie foi obtida apenas quando se associou a ação dos extratos com fluconazole (meio MHFII).

Os resultados mais promissores foram obtidos com a espécie *C. parapsilosis*, onde, com exceção dos extratos relativos à colheita de junho de folhas adultas frescas e setembro de folhas jovens frescas obtiveram-se halos de inibição.

Considerando a classificação normalizada para este tipo de ensaios (NCCLS, 2004a) todas as espécies de *Candida* se revelaram resistentes, uma vez que o halo de inibição apresentado deveria exceder os 14mm para que a classificação se modificasse para suscetível dose dependente ou suscetível.

O crescimento dos isolados de *C. oleophila* foi parcialmente inibido pelos extratos resultantes das colheitas de junho, mas em ambos os ensaios reportados, apenas quando se utilizaram extratos de folhas frescas, quer jovens quer adultas.

O efeito dos extratos EHE sobre os isolados de bactérias testados foram igualmente baixos. Apenas se obteve algum efeito inibitório no crescimento da espécie de *S. aureus*, não tendo sido registada qualquer inibição sobre as espécies de *E. coli* e de *L. monocytogenes*.

Para *S. aureus*, foram os extratos de folhas frescas adultas que não tiveram efeito. Comparando este resultado com a avaliação do teor em compostos fenólicos, discutido no capítulo anterior pode estimar-se que o menor teor destes compostos registados está relacionado com a menor atividade inibitória registada.

Tabela 23 - Resultados da inibição no crescimento das leveduras: *Candida parapsilosis*, *Candida oleophila*, *Candida albicans* e das bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Candida oleophila*, *Listeria monocytogenes*, na presença dos EHE (Extratos hidroalcoólicos) de folhas jovens frescas e secas e de folhas adultas frescas e secas ambas de junho e setembro de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* em meio MHII (Meio de Mueller Hinton II) e MHFII (Meio de Mueller Hinton II com fluconazole)

MEIOS	Microrganismo	Colheita de junho				Colheita de setembro			
		Folhas jovens		Folhas adultas		Folhas jovens		Folhas adultas	
		Frescas	Secas	Frescas	Secas	Frescas	Secas	Frescas	Secas
MHII	<i>Candida parapsilosis</i>	+	++	-	+	-	+	+	+
	<i>Candida oleophila</i>	++	-	++	-	-	-	-	-
	<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
MHFII	<i>Candida parapsilosis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>Candida oleophila</i>	+	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>Candida albicans</i>	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
MHII	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	+	+	+	-	+
	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: (-) Ausência de halos, 0,0mm; (+) halos fracos, 1,5-7,0mm; (++) halo moderado, 8,0-10,0mm; (+++) halo forte, >11,0mm (adaptado de Martins *et al.*, 2015)

Tabela 24 - Resultados da inibição no crescimento das leveduras: *Candida parapsilosis*, *Candida oleophila*, *Candida albicans* e das bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Candida oleophila*, *Listeria monocytogenes*, na presença dos EE (Extratos alcoólicos) de folhas jovens frescas e secas e de folhas adultas frescas e secas ambas de junho e setembro de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* em meio MHII (Meio de Mueller Hinton II) e MHFII (Meio de Mueller Hinton II com fluconazole)

	Microrganismo	Folhas jovens	Folhas adultas
MHII	<i>Candida parapsilosis</i>	+	++
	<i>Candida oleophila</i>	-	-
	<i>Candida albicans</i>	-	-
MHFII	<i>Candida parapsilosis</i>	+++	+++
	<i>Candida oleophila</i>	+++	+++
	<i>Candida albicans</i>	+++	++
MHII	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-

Nota: (-) Ausência de halos, 0,0mm; (+) halos fracos, 1,5-7,0mm; (++) halo moderado, 8,0-10,0mm; (+++) halo forte, >11,0mm (adaptado de Martins *et al.*, 2015)

A análise da Tabela 23 permitiu verificar que os extratos EHE apresentam uma atividade antimicrobiana bastante modesta, o que se confirma pelas fotografias do crescimento apresentadas na Figura 41.

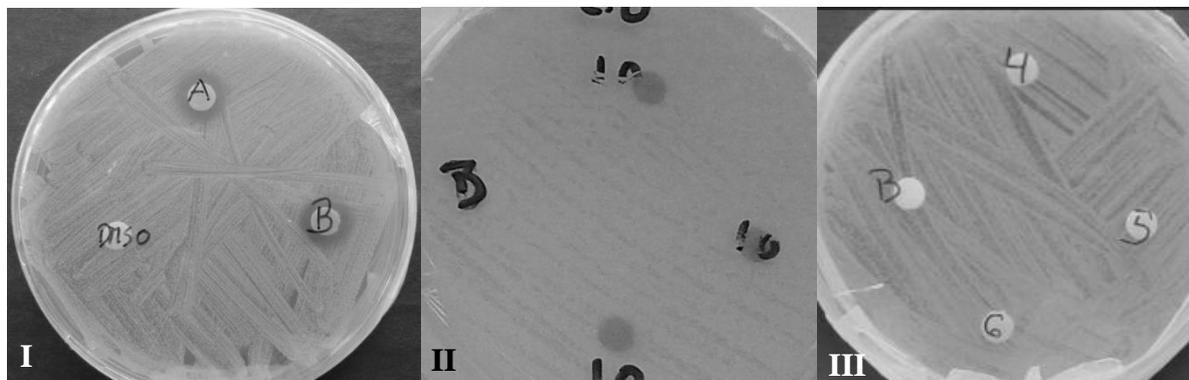


Figura 41 - Crescimento de leveduras da espécie: (I) *Candida parapsilosis*; (II) *Candida oleophila*; (III) *Candida albicans* em agar Sabouraud dextrose e discos embebidos em extratos de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*

Quando se testou o efeito potenciador do EHE o suplementado meio com fluconazole (MHIIF) os resultados revelaram-se bastante mais promissores (Tabela 23, Tabela 24 e Figura 42). Obtiveram-se halos de inibição de crescimento superiores a 25mm em todas as amostras, com exceção do isolado de *C. oleophila* para as amostras de junho de folhas jovens frescas (menor inibição) e adultas frescas, e ainda para o isolado de *C. oleophila*, no mesmo período de colheita, mas apenas para folhas frescas, quer as jovens, quer as adultas.

Na Figura 42 é notório o efeito potenciador dos extratos sobre a ação do fluconazole. Quando se utiliza fluconazole isoladamente contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* os valores estão de acordo com o que está protocolado.

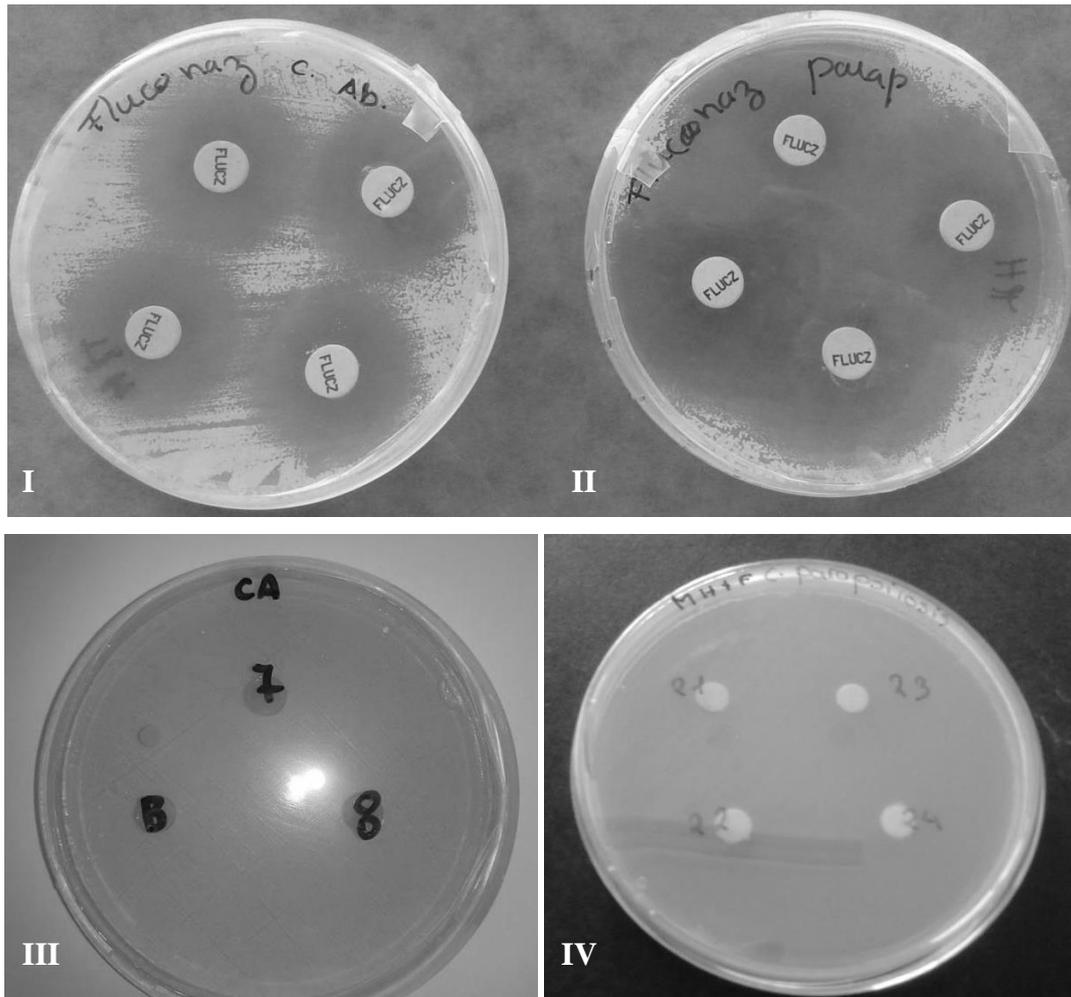


Figura 42 - Crescimento de leveduras das espécies *Candida albicans* (I) e *Candida parapsilosis*, (II) em agar Sabouraud dextrose com fluconazole; *Candida albicans* (III) e *Candida parapsilosis*, (IV) em agar Sabouraud dextrose sem fluconazole e discos embebidos em extratos de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*

Na literatura disponível, a atividade antimicrobiana do género *Salvia* está já descrita, mas tanto quanto é do nosso conhecimento, não está publicada bibliografia referente a esta variedade, *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*. Os resultados obtidos neste estudo são corroborados por outros trabalhos já publicados que testaram a atividade antimicrobiana para extratos de plantas do mesmo género *Salvia* apesar de existir uma grande controvérsia relativamente aos resultados dessa mesma atividade antimicrobiana (Nascimento *et al.*, 2000; Veličković *et al.*, 2003; Abu-Shanab *et al.*, 2004; Hassawi *et al.*, 2006; Veličković *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2012; Stagos *et al.*, 2012; Mosafa *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2015).

De acordo com o referido nos resultados, no que respeita aos extratos EHE sem suplemento de fluconazole, não houve inibição de crescimento para *C. albicans*, *E. coli* e *L. monocytogenes* enquanto relativamente ao *Staphylococcus aureus*, já se notou alguma suscetibilidade.

Estes resultados são concordantes com o trabalho efetuado por Garcia e colaboradores (2012), que avaliaram a ação antimicrobiana pelo ensaio de difusão em agar com discos, e concluíram que os extratos hidroalcoólicos de *Salvia officinalis* L. não apresentaram eficácia contra *Candida albicans* mas promoveram inibição do crescimento sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*. Esta ação foi atribuída à composição dos extratos em flavonoides, particularmente as isoflavonas, flavanonas e flavonas, cuja atividade promove a permeabilização da membrana celular, com conseqüente libertação do conteúdo celular seguida de morte (Porte e Godoy, 2001; Celikel e Kavas, 2008; Garcia *et al.*, 2012). É ainda importante realçar que a concentração final de extrato usada no trabalho de Garcia e colegas (2012) (30µL) foi duplicada relativamente à que se testou no nosso trabalho (15µL), e a obtenção do extrato foi por nós efetuada com percentagem superior de solvente (etanol). Estes dois factos potenciaram a concentração de bioativos nos extratos testados, o que poderá ter contribuído para a diferença da intensidade da inibição que foi publicada. No nosso trabalho tivemos a formação de halos fracos, enquanto no trabalho acima indicado, houve formação de halos fortes.

Abu-Shanab e colegas (2004), utilizando extratos etanólicos 80% (v/v), extratos metanólicos 80% (v/v) e decocção de partes vegetais de *S. officinalis* L., bem como a equipa de Stagos *et al.* (2012), com extratos metanólicos e aquosos de *Salvia officinalis* L. reportaram igualmente atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Neste trabalho Abu-Shanab e seus colegas (2004), testaram a atividade antimicrobiana de extratos de etanol 80% (v/v) cujas concentrações variaram entre 6,25-0,781mg mL⁻¹, extratos metanólicos 80% (v/v) e decocção de *Salvia officinalis* L.. Concluíram que os extratos etanólico e metanólico possuem um efeito superior em *S. aureus* relativamente às restantes extrações. A Concentração Mínima Inibitória (MIC) variou entre 0,78 a 3,125mg mL⁻¹. Já Stagos e seus colaboradores (2012) testaram extratos aquosos de várias espécies do género *Salvia*, tendo *S. officinalis* sido a que mostrou maior atividade com valor de MIC de apenas 2,5mg mL⁻¹.

A atividade antimicrobiana da família Lamiaceae depende da espécie, podendo estar correlacionada com o teor total de polifenóis ou com a variedade/tipo de polifenóis presentes em cada extrato, o que acontece também com outras famílias de plantas (Stagos *et al.*, 2012). Os mesmos autores sublinham ainda que o uso de solventes aquosos, etanólicos ou metanólicos, não interferiu na constituição polifenólica dos extratos testados, ainda que haja trabalhos que apresentam resultados que contradizem esta conclusão como os efetuados por Abu-Shanab *et al.*, (2004), que concluíram que o efeito dos extratos etanólicos e metanólicos

são mais intensos em oposição aos aquosos, pois estes solventes são mais eficazes na remoção da fração com suposta atividade antimicrobiana.

A suscetibilidade que alguns microrganismos apresentam a estes extratos com elevada composição fenólica poderá, segundo Abu-Shanab e seus colegas (2004), estar relacionada com a permeabilidade da parede celular ou pela presença de um mecanismo de acumulação de polifenóis pela membrana celular, que alguns microrganismos de *gram*-negativo apresentam como por exemplo *E. coli*. Estes autores, Abu-Shanab *et al.*, (2004) e Stagos *et al.* (2012), sugeriram que as bactérias de *gram*-positivo pareciam ser mais sensíveis do que as de *gram*-negativo aos extratos em estudo, afirmação que vem de encontro ao observado no nosso trabalho. Uma das explicações poderá ser atribuída à diferença de atuação dos poli fenóis na membrana celular destas bactérias uma vez que a estrutura membranar é diferente como já foi referenciado anteriormente. Shan *et al.* (2007) apresentaram também estudos que corroboram estes dados.

Na avaliação da atividade antimicrobiana através do método de difusão em agar com extratos hidroetanólicos a 50% com amostras finais de 50µL, Nascimento e seus colaboradores (2000), obtiveram uma fraca atividade antifúngica e antibacteriana, a qual associaram à presença de fitoquímicos como o eugenol, com elevada atividade antimicrobiana. Verificaram no entanto que, quando este está presente em associação com o ácido cinâmico perde essa atividade. Acrescentaram ainda que por outro lado, o ácido benzóico apresenta uma fraca atividade contra *S. aureus* ao contrário de outras bactérias.

Trabalhos efetuados por Garcia *et al.* (2012), com extratos secos hidroalcoólicos de *Salvia officinalis* L. pelos métodos de difusão em agar, tanto em discos como em poços, obtiveram uma fraca atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e resultados nulos para a *Candida albicans*, tal como neste trabalho. Estes resultados foram mais uma vez explicados pela presença de fenóis totais nos extratos obtidos, particularmente o grupo dos flavonoides que têm a capacidade de atuar sobre a membrana celular das bactérias *gram*-positivo, alterando a permeabilidade dos canais de cálcio, aumentando-a, pondo em causa a viabilidade destas células. Já relativamente à espécie *C. albicans* os mesmos autores justificam os seus resultados associando-os aos fatores de virulência desta espécie, que lhe confere grande capacidade de promover o aparecimento de diversas patologias. Os fatores apontados são normalmente a grande capacidade de aderência aos substratos biológicos e a formação de tubos de germinação, a grande variabilidade fenotípica e genotípica bem como a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares.

Com resultados opostos aos referidos no parágrafo anterior, o trabalho de Carvalho *et al.* (2005), mostrou que obtiveram atividade antimicrobiana contra a bactéria *Escherichia coli* promovida por extratos etanólicos 50%, de concentração 4g mL^{-1} , avaliado pelo teste de diluição, através da técnica de tubos múltiplos, de *S. officinalis* L.. Os resultados obtidos nestes ensaios com leveduras revelaram-se, como já foi referido, menos promissores. Quando se testou o efeito do extrato EHE sem suplemento de fluconazole, obtiveram-se resultados de inibição apenas contra *C. parapsilosis*. Num estudo recente, Martins e colaboradores (2015), avaliaram o efeito de extratos de *Salvia officinalis* sobre o crescimento de espécies de *Candida* não-*albicans*, onde se inclui o género *C. parapsilosis*, pela sua importância em ambiente hospitalar. Verificaram que o solvente interferiu na atividade antifúngica de todas as *Candidas* não *albicans* testadas, mas a inibição que obtiveram revelou-se modesta tal como a que se obteve neste nosso trabalho. O extrato aquoso obtido por decocção teve maior potencial do que o aquoso obtido por infusão. Concluíram que o solvente de extração tem influência sobre a bioatividade desta espécie. O extrato aquoso obtido por decocção apresenta uma concentração superior de ácidos fenólicos e flavonoides seguido do metanólico/água e aquoso obtido por infusão. Resultados semelhantes foram obtidos por Veličković e seus colegas (2011), que compararam espécies de *Salvia* quanto à atividade antimicrobiana em extratos metanólicos a 70% (v/v) e etanólicos a 70% (v/v) de 20mg mL^{-1} , concluindo que a concentração de ácidos fenólicos depende do método de extração usado nas diferentes metodologias, bem como dos meios de cultura. Martins *et al.* (2015) relacionam uma maior atividade antimicrobiana dos extratos obtidos por decocção, pelo facto dos mesmos terem apresentado maior concentração de ácidos fenólicos e flavonoides, como já foi referido anteriormente, em particular, destacaram o ácido rosmarínico e luteolina-7-glucoronídeo. Estas conclusões foram apresentadas por outros grupos de investigação, Wang *et al.* (1998), Lu e Foo (1999), (2000), (2001), Topçu *et al.* (2008); Scheckel *et al.* (2008) que referiram que estes são os compostos mais frequentemente identificados nesta espécie de *Salvia*.

Shan e colaboradores (2007) verificaram a existência de correlações entre a atividade antimicrobiana verificada nos extratos metanólicos 80% (v/v) de 46 plantas testadas, onde se incluiu *S. officinalis*, com os compostos fenólicos existentes nessas plantas. Os resultados obtidos por estes autores enfatizam a importância dos fenóis totais na atividade antimicrobiana, assim como uma correlação entre a atividade antimicrobiana e a capacidade antioxidante dos extratos.

Estudos efetuados por Hassawi *et al.* (2006) revelaram valores mais promissores relativos à inibição do crescimento da *Candida albicans* usando extratos hidroalcoólicos a 95% de *Salvia officinalis* L., ainda que a (s) razão/razões que expliquem estes resultados tão expressivos (inibições variáveis entre 8 e 11mm) sejam os fatores genéticos e a concentração utilizada (50µL/disco) nos testes da atividade antimicrobiana.

Mosafa *et al.* (2014) compararam a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de folhas e caules de *Salvia officinalis*, usando diluições de 50, 100, 400 mg/mL e obtiveram efeitos antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus* (MIC=18,75mg mL⁻¹) e *Escherichia coli* (MIC = 26,56 mg mL⁻¹). Neste estudo, os melhores resultados de inibição de crescimento foram obtidos contra a bactéria multirresistente de gram-positivo *Staphylococcus aureus*. Já *E. coli* mostrou uma sensibilidade moderada. Os extratos de *S. officinalis* mostraram ter um efeito dose dependente sobre a inibição da atividade microbiana, tendo mostrado uma relação direta entre o aumento da concentração e a inibição. Estes resultados indicaram ainda que estes extratos etanólicos previnem o crescimento de bactérias de gram-positivo e gram-negativo. Segundo estes autores a diferença de resultados que obtiveram comparativamente com outros trabalhos publicados, está relacionado com o método de extração e com a utilização de elevadas temperaturas de extração, que pode promover a alteração da composição química dos extratos.

Segundo Generalić e seus colaboradores (2012), que avaliaram a atividade antimicrobiana pelo teste da microdiluição em caldo de extratos hidroetanólico 80% (v/v), de folhas de *Salvia officinalis* colhidas em diferentes épocas, com bactérias de gram-positivo da espécie *S. aureus* e bactérias de gram-negativo da espécie *E. coli*, concluíram que existe atividade antimicrobiana contra esses microrganismos. A MIC variou entre 0,02 e 0,99 mg GAE mL⁻¹. Observaram ainda que a MIC relativamente ao *S. aureus* e à *E. coli* aumentou entre as amostras de maio para novembro. Estes resultados foram associados à variação da concentração de poli fenóis encontrada nesses meses. Estes autores concluíram que os fatores de variabilidade ambiental e o modo de extração dos extratos influenciam a composição de fenóis que como consequência irão influenciar as propriedades biológicas.

Mosafa *et al.* (2014) e Shan *et al.* (2007) sugeriram que as bactérias de gram-positivo são mais sensíveis aos componentes externos do que as de gram-negativo, afirmação que vai de encontro ao resultado obtido no nosso trabalho. Segundo Winn *et al.* (2006), Shan *et al.* (2007) e Generalić *et al.* (2012), a diferença de suscetibilidade entre estes dois grupos de bactérias estará relacionada com a constituição da membrana celular das bactérias de gram-

negativo, que por possuírem uma espessa camada de peptidoglicanos dificulta a difusão de determinados compostos, tendo ainda acrescentado o efeito da presença de enzimas capazes de quebrar ligações de algumas moléculas no periplasma celular.

A diferença de resultados existente entre as investigações dos vários autores referenciados anteriormente e os verificados neste trabalho pode ser explicada pelas diferenças de concentração e proporções dos componentes ativos existentes nos extratos, no método utilizado, na quantidade utilizada de amostra de extrato, no material vegetal que pode variar com a origem (flores, folhas e caules), com o período de colheita e até mesmo com as diferentes condições de processamento e armazenamento dos extratos.

A combinação entre antifúngicos e extratos vegetais pode aumentar a atividade antimicrobiana se comparada com o espectro alcançado por cada isoladamente, representando assim, uma alternativa aos fármacos sintéticos. Um dos objetivos deste estudo foi avaliar o possível efeito sinérgico da associação entre o antifúngico fluconazole e os extratos vegetais de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* sobre as estirpes de fungos anteriormente avaliadas.

Segundo Cuenca-Estrella (2004), os compostos antifúngicos associados podem promover maior eficácia contra os agentes infecciosos, permitindo, assim, a utilização de menores doses de cada fármaco.

Esta associação do antifúngico fluconazole e extratos vegetais da planta em estudo, sobre fungos resistentes aos fármacos sintéticos antifúngicos, mostrou que ocorreu sinergismo.

As placas em que foram aplicados extratos hidroalcoólicos e que foram preparadas com suplemento de fluconazole mostraram um efeito potenciador, pois os halos de inibição obtidos aumentaram de forma claramente observável e mensurável. Acresce que este efeito foi verificado para todas as espécies de fungos testados, *Candida albicans* e não-*albicans*. Tal como ocorreu em estudos de avaliação da atividade antifúngica, determinado pelo método de difusão em disco, efetuados por (Endo *et al.*, 2010) em extratos hidroalcoólicos 50% (v/v) de cascas de *Punica granatum* associadas ao fluconazole contra *Candida albicans*. Estes autores verificaram uma interação sinérgica, tal como no nosso trabalho, quando associaram ao extrato o antifúngico, fluconazole, estudos estes, efetuados *in vitro*. Os mesmos resultados obtiveram Souza e seus colaboradores (2014), quando combinaram extratos acetónicos de folhas de *Eugenia pyriformis* Cambess. Myrtaceae, com fluconazole onde alcançaram sinergismo contra *C. parapsilosis*. Já o extrato da mesma planta mas extraído com acetato de etilo para além de atuar sobre a *C. parapsilosis* mostrou eficácia contra *Candida albicans*,

possibilitando assim, a sua utilização em algumas estirpes de fungos com resistência demonstrada aos fármacos. Os estudos efetuados por Mertas *et al.* (2015) em *Melaleuca alternifolia* demonstraram, que a combinação de substâncias naturais e fármacos convencionais, tais como o fluconazole pode ajudar no tratamento de infecções fúngicas verificando-se um efeito sinérgico quando se adicionava óleo desta planta ao fluconazole no combate às *Candidas albican* mais resistentes.

Capítulo IV. Conclusão e Perspetivas Futuras

Este estudo teve como objetivo principal a caracterização química e biológica de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens*, a salva rubra, existente na coleção de plantas aromáticas e medicinais do Jardim Botânico da Universidade de Trás-os Montes e Alto Douro. O ensaio experimental decorreu entre 2011 e 2013 e as principais conclusões acerca do efeito da ontogenia foliar na morfoanatomia, fisiologia, química e atividades antioxidante e antimicrobiana apresentam-se de seguida.

As folhas de salva rubra apresentam uma anatomia típica das plantas pertencentes à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida. Exibem mesófilo heterogéneo, são dorsiventrais e com estomas reniformes de distribuição hipoestomática. Em ambas as páginas dos dois tipos de folhas surgem tricomas glandulares e não glandulares.

Em resposta à ontogenia foliar, a salva rubra apresentou diferenças significativas ao nível da anatomia, fisiologia e bioquímica. De facto, as folhas adultas de coloração verde apresentaram uma maior área, bem como uma maior espessura da lâmina total e dos tecidos condutores. Adicionalmente, estas folhas registaram menores condutâncias estomáticas e taxas de transpiração, melhorando a eficiência intrínseca do uso da água ao longo dos ciclos vegetativos. Verificou-se ainda uma menor peroxidação lipídica das membranas celulares de folhas adultas, que contribuíram certamente para a diminuição da perda de eletrólitos. Por outro lado, as folhas jovens de coloração arroxeadada registaram maior concentração de pigmentos fotossintéticos e de ceras intra e epicuticulares solúveis. Relativamente ao efeito da data de colheita, determinou-se uma maior concentração de pigmentos fotossintéticos e amido, bem como de ceras solúveis e de suculência foliar, mas menor área foliar e concentração de açúcares solúveis em setembro. Já quanto ao efeito do ano, verificou-se uma maior concentração de pigmentos fotossintéticos e de amido e ainda de suculência foliar no ano 2011, considerado o mais quente desde 1930.

Em todas as amostras foram avaliados os teores de fenóis totais, flavonoides e *orto*-difenóis. Estes polifenóis apresentam um papel fundamental de proteção das plantas contra agentes foto-oxidantes, sobretudo na neutralização de ROS e ainda capacidade antibacteriana e antifúngica. Concluiu-se que os extratos provenientes de folhas secadas apresentaram um teor superior relativamente aos extratos de folhas frescas, o que poderá ter contribuído para uma atividade antioxidante mais alta. A elevada atividade antioxidante das folhas secadas, em detrimento das folhas frescas poderá ser explicada pelo melhor rendimento dos extratos, devido à redução da degradação enzimática, uma vez que a secagem impede as reações de hidrólise.

Pelos parâmetros analisados não foi possível identificar diferenças significativas na composição fenólica bem como na atividade antioxidante dos extratos de folhas jovens e adultas.

A atividade antioxidante da primeira para a segunda colheita teve um aumento significativo que poderá estar relacionado com o aumento dos *orto*-difenóis e flavonoides.

Foi verificado um aumento dos metabolitos secundários nas folhas jovens comparativamente às folhas adultas. A idade e o estágio de desenvolvimento da planta podem influenciar não apenas a quantidade de metabolitos secundários produzidos, mas a proporção relativa destes compostos, tecidos mais jovens geralmente apresentam grande atividade biossintética, aumentando a produção de vários compostos.

No que respeita à atividade antimicrobiana, as amostras testadas revelaram ser pouco inibidoras do crescimento de bactérias e fungos testados, no entanto os resultados foram diferentes de acordo com a estirpe avaliada.

Os microrganismos mais suscetíveis aos extratos de *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* foram *Candida parapsilosis* e *Staphylococcus aureus*, enquanto que os menos suscetíveis foram a *Candida oleophila*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*.

Verificou-se uma inibição consideravelmente menor para a bactéria *Escherichia coli* e para o fungo *Candida albicans*, quando comparada com a inibição promovida sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* e sobre o fungo *Candida parapsilosis*. Esta diferença de valores médios de inibição entre estas duas bactérias estará associada às diferenças que estes dois microrganismos apresentam a nível estrutural, fisiológico ou bioquímico, reagindo assim de modo diferente perante a ação de extratos vegetais.

Não ocorreu qualquer inibição sobre o crescimento da espécie *C. albicans*. Este resultado poderá estar associado aos fatores de virulência desta espécie, que lhe confere grande capacidade de se desenvolver em diferentes condições. Resultados mais promissores foram obtidos com a espécie *C. parapsilosis*, no entanto todas as espécies de *Candida* testadas revelaram-se resistentes.

Este estudo permitiu ainda verificar que os extratos testados, quando associados com o fluconazole possuem um efeito potenciador, inibitório do crescimento das espécies testadas ao nível antimicrobiano pois apresentou neste caso, uma interação sinérgica contra os microrganismos em teste. Os dados obtidos no presente estudo permitiram aferir que se deverá continuar com estudos mais detalhados sobre o uso terapêutico de extratos de salva,

principalmente sobre bactérias e fungos resistentes a fármacos, seja pela sua ação individual ou associando-os a fármacos, podendo estes últimos serem usados em menores concentrações, o que poderá diminuir alguns efeitos adversos.

Terminada esta fase do trabalho seria de todo importante prosseguir com o estudo da salva rubra, dada a importância que cada vez mais esta planta apresenta ao nível industrial tanto para a indústria alimentar como para a cosmética e farmacêutica.

Assim este trabalho vem colmatar a falta de conhecimento científico sobre esta variedade em particular, contribuindo fundamentalmente para a sua caracterização morfoanatômica e fisiológica. A caracterização química e da potencial bioatividade necessitam de um estudo mais aprofundado, uma vez que os parâmetros analisados não permitiram obter conclusões indubitáveis sobre as mesmas. Assim, consideramos que como perspetivas de trabalho a desenvolver deveriam realizar-se estudos que permitam:

- Testar e caracterizar extratos obtidos com outros solventes e metodologias de extração;
- Identificar os componentes das frações fenólicas obtidas a partir dos extratos;
- Extrair e caracterizar óleos essenciais;
- Avaliar as enzimas do stresse oxidativo;
- Pesquisar outras bioatividades, nomeadamente a atividade anti-inflamatória e anti proliferativa;
- Avaliar o efeito da disponibilidade da água e adubação no comportamento da planta;
- Avaliar se a coloração púrpura influencia a existência de outros metabolitos;
- Comparar a composição fenólica desta variedade *Salvia officinalis* L. var. *purpurascens* com outras variedades de *Salvia officinalis*.

Capítulo V. Referências Bibliográficas

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2012). Cellular and Molecular Immunology. 7^a Edition. *Elsevier Health Sciences*.15-18.
- Abranche, M. (2010). Plantas Medicinais e Fitoterápicos - Abordagem teórica com ênfase em nutrição. A. S. Sistemas. Mod 1.
- Abreu, M., Heggie, W. (2007). Terpenóides e Esteróides. *Lobo, A., Lourenço, A.* 123-150.
- Abu-Shanab, B., Adwan, G., Abu-Safiya, D., Jarrar, N., Adwan, K. (2004). Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Utilized in Popular Medicine in Palestine. *Turkey Journal Biology*. **28**(2): 99-102.
- Aherne, S., O'Brien, N. (2002). Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition*. **18**(1): 75-81.
- Alimpić, A., Oaldj, W., Watevski, V., Duletić-Laušević, S. (2014). Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Salvia amplexicaulis* Lam. *Archives of Biological Science Belgrade*. **66**(1): 307-316.
- Almeida, C., Albuquerque, U. (2002). Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **45**(3): 343-353.
- Almeida, J., Carpes, S., Oviedo, M., Serafini, L., Pereira. (2014). Atividade Antioxidante in vitro e Micropropagação por spray drying de extratos hidroalcoólicos de Salvia (*Salvia officinalis* L.). *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*. **5**(2): 41-49.
- Al-Sereiti, M., Abu-Amer, K., Sen, P. (1999). Pharmacology of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its Therapeutic Potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*. **37**: 124-130.
- Arnon, D. (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts: Polyphenol Oxydase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. **24**(1): 1-15.
- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., Monsan, P. (2010). Comparison of the Water-Soluble Carbohydrate Composition and Fructan Structures of *Agave tequilana* Plants of Different Ages. *Food Chemistry*. **122**(1): 123-130.
- Ascensão, L. (2007). Estrutura Secretora em Plantas. Uma Abordagem Morfo-Anatômica. Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático. 3^a Edição, Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal. 19-28.
- Ascensão, L., Marques, N., Pais, M. (1995). Glandular Trichomes on Vegetative and Reproductive Organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany*. **75**(6): 619-626.
- Ascensão, L., Mota, L., M. Dem. Castro, M. (1999). Glandular Trichomes on the Leaves and Flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, Distribution and Histochemistry. *Annals of Botany*. **84**(4): 437-447.
- Ascensão, L., Pais, M. (1998). The Leaf Capitate Trichomes on *Leonotis leonurus*: Histochemistry, Ultrastructure and Secretion. *Annals of Botany*. **81**(2): 263-271.
- Atlas, R. (1993). Handbook of Microbiology Media. Edited by Lawrence C. Parks. CRC Press. 628; 666; 683; 784; 1006.
- Augusto, O. (2006). Radicais Livres: Bons, Maus e Naturais. Oficina de Textos: São Paulo. Edição Digital 2014. 2-11.
- Avalos, G., Mulkey, S. (2004). Photochemical Efficiency of Adult and Young Leaves of the Neotropical Understory Shrub *Psychotria limonensis* (Rubiaceae) in Response to Changes in the Light Environment. *Revista de Biologia Tropical*. **52**: 839-844.
- Avato, P., Fortunato, M., Ruta, C., D'Elia, R. (2005). Glandular Hairs and Essential Oils in Micropropagated Plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Science*. **169**(1): 29-36.

- Ayub, G., Smith, R., Tissue, D., Atkin, O. (2011). Impacts of Drought on Leaf Respiration in Darkness and Light in *Eucalyptus saligna* Exposed to Industrial-Age Atmospheric CO₂ and Growth Temperature. *New Phytologist*. **190**: 1003-1018.
- Azzi, A., Davies, K., Kelly, F. (2004). Free Radical Biology - Terminology and Critical Thinking. *FEBS Letters*. **558**(1): 3-6.
- Bacelar, E., Santos, D., Moutinho-Pereira, B., Gonçalves, B., Ferreira, H., Correia, C. (2006). Immediate Responses and Adaptative Strategies of Three Olive Cultivars Under Contrasting Water Availability Regimes: Changes on Structure and Chemical Composition of Foliage and Oxidative Damage. *Plant Science*. **170**(3): 596-605.
- Bahadori, M., Mirzaei, M. (2015). Cytotoxicity, Antioxidant Activity, Total Flavonoid and Phenolic Contents of *Salvia urmiensis* Bunge and *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Journal of Pharmacognosy*. **2**(2): 27-32.
- Baker, N. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *In Vivo*. *Annual Review Plant Physiology*. **59**: 89-113.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological Effects of Essential Oils - A Review. *Food and Chemical Toxicology*. **46**(2): 446-475.
- Bal, A. (2010). The Echinocandins: Three Useful Choices or Three Too Many? *International Journal of Antimicrobial Agents*. **35**(1): 13-18.
- Baricevic, D., Bartol, T. (2000). The Biological/Pharmacological Activity of the *Salvia* Genus V. Pharmacology. In: *Kintzios, S.E.* (Ed.). Sage: the Genus *Salvia*. Marston: Harwood Academic. **14**: 143-184.
- Barnett, J., Payen, R., Yarrow, D. (2000). Yeasts: Characteristics and Identification. Third Edition. Cambridge University Press. 130-132; 219;224.
- Barros, A., Nunes, F., Gonçalves, B., Silva, A. (2011). Effect of Cooking on Total Vitamin C Contents and Antioxidant Activity oh Sweet Chest nuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry*. **128**(1): 165-172.
- Barry, A., Pfaller, M., Rennie, R., Fuchs, P., Brown, S. (2002). Precision and Accuracy of Fluconazol Susceptibility Testing by Broth Microdilution, Etest, and Disk Diffusion Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1781-1784.
- Baruah, J. (2011). Polyphenolic Compounds: Nature Materials. *Chemistry of Phenolic Compounds: State of the Art*. Editor: Jubaraj Bikash Baruah. 1-7.
- Ben Hamed, A., Gajdoova, D., Havel, J. (2006). Analysis of *Salvia officinalis* Plant Extracts by Capillary Electrophoresis. *Journal Separation Science*. **29**(8):1188-1192.
- Ben Taarit, M., Msaada, K., Hosni, K., Marzouk, B. (2010). Changes in Fatty Acid and Essential Oil Composition of Sage (*Salvia officinalis* L.) Leaves Under NaCl Stress. *Food Chemistry*. **119**(3): 951-956.
- Berger, S., Weichert, H., Porzel, A., Wasternack, C., Kühn, H., Feussner, I. (2001). Enzymatic and Non-Enzymatic Lipid Peroxidation in Leaf Development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. **1533**(3): 266-276.
- Bertamini, M., Nedunchezian, N. (2002). Leaf Age Effects on Chlorophyll, RuBisCO, Photosynthetic Electron Transport Activities and Thylakoid Membrane Protein in Field Grown Grapevine Leaves. *Journal of Plant Physiology*. **159**(7): 799-803.
- Bertamini, M., Nedunchezian, N. (2003). Photoinhibition of Photosynthesis in Mature and Young Leaves of Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Science*. **164**(4): 635-644.
- Bettaieb, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F., Marzouk, B. (2011). Drought Effects on Polyphenol Composition and Antioxidant Activities in Aerial Parts of *Salvia officinalis* L.. *Acta Physiologiae Plantarum*. **33**(4): 1103-1111.

- Bettaieb, I., Zakhama, N., Wannes, A., Kchouk, E., Marzouk, B. (2009). Water Deficit Effects on *Salvia officinalis* Fatty Acids and Essential Oils Composition. *Scientia Horticulturae*. **120**(2): 271-275.
- Bianchi, M., Antunes, L. (1999). Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. *Revista de Nutrição*. **12**(2): 123-30.
- Bilger, W., Schreiber, U. (1986). Energy-Dependent Quenching of Dark-Level Chlorophyll Fluorescence in Intact Leaves. *Photosynthesis Research*. **10**: 303-308.
- Blank, A.F., Costa, A.G., Arrigoni-Blank, M.F., Cavalcanti, S.C.H., Alves, P.B., Innecco, R., Ehlert, P.A.D., Sousa, I.F. (2007). Influence of Season, Harvest Time and Drying on *Java citronella* (*Cymbopogon Winterianus* Jowitt) Volatile Oil. *Revista Brasileira de Farmacognósia*. **17**: 557-564.
- Bölhar-Nordenkamp, H., Öquist, G. (1993). Chlorophyll Fluorescence as a Tool in Photosynthesis Research. Photosynthesis and Production in a Changing Environment. *Springer Netherlands*. 193-206.
- Böszörményi, A. (2010). Phytochemical Characterization of *Salvia*, *Lavandula* and *Morus* Taxa by its Terpene Compounds. Doctoral Thesis Semmelweis University. Doctoral School of Pharmaceutical Sciences. 7-15.
- Böszörményi, A., Héthelyi, A., Farkas, A., Horváth, G., Papp, N., Lemberkovics, E., Szoke. (2009). Chemical and Genetic Relationships Among Sage (*Salvia officinalis* L.) Cultivars and Judean Sage (*Salvia judaica* Boiss). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**(11): 4663-4667
- Bouaziz, M., Yangui, T., Sayadi, S., Dhouib, A. (2009). Desinfectant Properties of Essential Oils from *Salvia officinalis* L. Cultivated in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*. **47**(11): 2755-2760.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). Production of Plant Secondary Metabolites: a Historical Perspective. *Plant Science*. **161**(5): 839-851.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Using the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. **72**(1-2): 248-254.
- Bringe, K., Schumacher, A., Schmitz-Eiberger, M., Steiner, U., Oerke, C. (2006). Ontogenetic Variation in Chemical and Physical Characteristics of Adaxial Apple Leaf Surfaces. *Phytochemistry*. **67**(2): 161-170.
- Bueno, M. (2008). História de las Hierbas Mágicas y Medicinales. Ediciones Nowtilus S.L.
- Cardoso, A., Smith, A. (2009). O tratado dos Olhos. Secretariado Nacional da Pastoral da Cultura. (Acedido em 12 de julho de 2015). Disponível: http://www.snpcultura.org/id_o_tratado_dos_olhos_de_pedro_hispano.html.
- Carlquist, S. (1988). Comparative Wood Anatomy. Springer, Berlin, New York. 140-103.
- Carrillo-Muñoz, A., Giusiano, G., Ezkurra, P., Quindós, G. (2006). Antifungal Agents: Mode of Action in Yeast Cells. *Review Española Quimioterapia*. **19**(2): 130-139.
- Carvalhinho, S., Costa, A., Coelho, A., Martins, E., Sampaio, A. (2012). Susceptibility of *Candida albicans* Mouth Isolates to Antifungal Agents, Essentials Oils and Mouth Rinses. *Mycopathologia*. **174**: 69-76.
- Carvalho, C., Gosmann, G., Schenkel, E. (2000). Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos. *Simões, C., Schenkel, E., Gosmann, G., Mell*. 433-449.
- Carvalho, H., Cruz, F., Wiest, J. (2005). Atividade Antimicrobiana em Plantas com Indicativo Etnográfico Condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. **7**(3): 25-32.

- Carvalho, L., Casali V., Lisboa, S., Barbosa, L., Cecon, P. (2006). Crescimento e Metabolismo em Artemísia em Função do Nível de Irradiância. *Horticultura Brasileira*. **24**(3): 289-294.
- Castón-Osorio, J., Torre-Cisneros, A. (2008). Epidemiology of Invasive Fungal Infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **32**(2): 103-109.
- Castro-Díez, P., Puyravaud, J.P., Cornelissen, J.H.C: (2000). Leaf Structure and Anatomy as Related to Leaf Mass per Área Variation in Seedlings of a Wide Range of Woody Plant Species and Types. *Oecologia*. **124**(4): 476-486.
- Castroviejo, S., Aedo, C., Lainz, M., Morales, R., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G., Paiva, J. (2010). Flora Iberica. Volume 12. Real Jardín Botánico, C.S.I.C., Madrid. 298-326.
- Celikel, N., Kavas, G. (2008). Antimicrobial Properties of Some Essential Oils Against Some Pathogenic Microorganisms. *Czech Journal Food*. **26**: 174-181.
- Chaillou, L., Nazareno, M. (2006). New Method to Determine Antioxidant Activity of Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**(22): 8397-8402.
- Chang, X., Robison, J., (2003). Nondestructive and Rapid Estimation of Hardwood Foliarnitrogen Status Using the SPAD-502 Chlorophyll Meter. *Forest Ecology and Management*. **65**(11): 1526-1529.
- Chaves, M., Maroco, J., Pereira, J. (2003). Understanding Plant Responses to Drought From Gene to the Whole Plant. *Functional Plant Biology*. **30**(3): 239-264.
- Christensen, K., Jorgensen, M., Kotowska, D., Petersen, R., Kristiansen, K., Christensen, L. (2010). Activation of the Nuclear Receptor PPAR Gamma by Metabolites Isolated From Sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Ethnopharmacology*. **132**(1): 127-133.
- Cioffi, G., D' Auria, M., Braca, A., Mendez, J., Castillo, A., Morelli, I., Simone, F., Tommasi, N. (2002). Antioxidant and Free-Radical Scavenging Activity of Constituents of the Leaves of *Tachigalia paniculata*. *Journal of Natural Products*. **65**(11): 1526-1529.
- Claben-Bockhoff, R., Speck, T., Tweraser, P., Wester, S., Thimm, R., Reith, M. (2004). The Staminal Lever Mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): a Key Innovation for Adaptive Radiation? *Organisms Diversity & Evolution*. **4**(3): 189-205.
- Clebsch, B. (2003). A Book of Salvias: Sages For Every Garden (2nd Edition). Timber Press, Oregon. 13-18.
- CMVR. (2014). Câmara Municipal de Vila Real. (Acedido em 4 de agosto de 2014). Disponível: <http://www.cm-vilareal.pt/inio-mainmenu-1.html>.
- Cohu, C., Muller, O., Adams, W., Demmig-Adams, B. (2014). Leaf Anatomical and Photosynthetic Acclimation to Cool Temperature and High Light in Two Winter Versus Two Summer Annuals. *Physiologia Plantarum*. **152**: 164-173.
- Correia, C., Pereira, M., Coutinho, J., Bjorn, L., Torres-Pereira, G. (2005). Ultraviolet-B Radiation and Nitrogen Affect the Photosynthesis of Maize: a Mediterranean Field Study. *European Journal of Agronomy*. **22**(3): 337-347.
- Corsi, G., Bottega, S. (1999). Glandular Hairs of *Salvia officinalis*: New Data on Morphology, Localization and Histochemistry in Relation to Function. *Annals of Botany*. **84**(5): 657-664.
- Costa, D. (2012). Antocianinas como Fotoprotectores Naturais. Coimbra. Tese de Mestrado. 29-59.
- Costa, H., Gallego, M., Tomaro, L. (2002). Effect of UV-B Radiation on Antioxidant Defense System in Sunflower Cotyledons. *Plant Science*. **162**(6): 939-945.
- Cowan, M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Review*. **12**(4): 564-582.

- Crespi, L. (1998). Organografia Vegetal. II Curso Livre Flora e Vegetação de Agroecossistemas. UTAD, Vila Real. 54.
- Cuenca-Estrella, M. (2004). Combinations of Antifungal Agents in Therapy-What Value Are They? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **54**: 854-869.
- Cushnie, T., Cushnie, B., Lamb, A. (2014). Alkaloids: An Overview of Their Antibacterial, Antibiotic-Enhancing and Anivirulence Activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **44**(5): 377-386.
- Cutler, D., Botha, T., Botha, C., Stevenson, D. (2008). Plant Anatomy: An Applied Approach. Annals of Botany. First Edition. Oxford Blackwell Publishing. 70-119.
- Czelusniak, K., Brocco, A., Pereira, D., Freitas, G. (2012). Farmacobotânica, Fitoquímica e Farmacologia do Guaco: Revisão Considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucat*. **14**(2): 400-409.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as Antimicrobial Agents. Current Opinion in *Biotechnology*. **23**: 174-181.
- Damodaran, S., Parkin, K., Fennema, O. (2008). Química de Alimentos de Fennema. 4ª Edição. Artmed Editora S.A. 167-170.
- Daughtry, C., Walthall, C., Kim, M., De Colstoun, E., McMurtrey, J. (2000). Estimating Corn Leaf Chlorophyll Concentration From Leaf and Canopy Reflectance. *Remote Sensing of Environment*. **74**(2): 229-239.
- Debersac, P., Heydel, J., Amiot, M., Goudonnet, H., Artur, Y., Suschetet, M., Siess, M. (2001) Induction of Cytochrome P450 and/or Detoxication Enzymes by Various Extracts of Rosemary: Description of Especific Patterns. *Food and Chemical Toxicology*. **39**(9): 907-918.
- Delamare, A., Moschen-Pistorello, I., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. Cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*. **100**(2): 603-608.
- Demmig, B., Björkman, O. (1987). Comparison of the Effect of Excessive Light on Chlorophyll Fluorescence (77K) and Photon Yield of O₂ Evolution in Leaves of Higher Plants, *Planta*. **171**(2):171-184.
- Dijkstra, P. (1989). Cause and Effect of Differences in Specific Leaf Area. In Causes and Consequences of Variation in Growth Rate and Productivity of Higher Plants. Lambers, H., Cambridge, M., Konings, H. and Pons, T.L. The Hague, SPB Academic. 125-140.
- Diniz, F., Poeta, A., Silva, C., Pinto, L., Abreu, S. (2003). Relatório da Cidade de Vila Real Portugal: O Papel das Pequenas e Médias Cidades no Desenvolvimento Rural. Universidade de Trás-os Montes e Alto Douro. 2-3.
- Downey, M.O., Mazza, M., Krstic, M.P. (2007). Development of a Stable Extract for Anthocyanins and Flavonols from Grape Skin. *American Journal of Enology and Viticulture*. **58**(3): 358-364.
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, V., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E., Porat, R. (2002). Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida oleophila*. *American Phytopathological Society*. **92**(4): 392.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillion, J-M. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**(5): 1768-1774.

- Durling, N., Catchpole, O., Grey, J., Webby, R., Mitchell, K., Foo, L., Perry, N. (2007). Extraction of Phenolics and Essential Oil From Dried Sage (*Salvia officinalis*) Using Ethanol-Water Mixtures. *Food Chemistry*. 101, 1417-1424.
- Durling, N., Catchpole, O., Grey, J., Webby, R., Mitchell, K., Foo, L., Perry, N. (2007). Extration of Phenolic and Essential Oil from Dried Sage (*Salvia officinalis*) Using Ethanol-Water Mixtures. *Food Chemistry*. **101**: 1417-1424.
- Díaz-Maroto, M., Perez-Coello, M., González Villas, M., Cabezudo, M. (2003). Influence of Drying on the Flavor Quality of Spearmint (*Mentha spicata* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**: 1265-1269.
- Egwaikhide, P., Okeniyi, S., Gimba, C. (2009). Screening for Anti-Microbial Activity and Phytochemical Constituents of Some Nigerian Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. **3**(12): 1088-1091.
- Ekanayake, I., Ortiz, R., Vuylsteke, D. (1995). Physiological Factors in Drought Tolerance of Various *Musa* Genotypes. *IITA Research, International Institute of Tropical Agriculture*. **11**: 7-10.
- Endo, E., Cortez, D., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C., Filho, B. (2010). Potent Antifungal Activity of Extratcts and Pure Compound Isolated from Pomegranate Peels and Synergism With Fluconazol Against *Candida albicans*. *Research in Microbiology*. **161**: 534-540.
- Esturk, O. (2012). Intermittent and Continuous Microwave-Convective Air-Drying Characteristics of Sage (*Salvia officinalis*) Leaves. *Food and Bioprocess Technology*. **5**: 1664-1673.
- Fahn, A. (1990). Plant Anatomy 4^a edition. Pergamon Press. Oxford. 540-551.
- Fahn, A., Werker, E., Baas, P. (1986). Wood Anatomy and Identification of Trees and Shrubs from Israel and Adjacent Regions. Israel Academy of Sciences and Humanities: Jerusalem, Israel.
- Farkas, Á., Papp, N., Horváth, G., Molnár, R., Németh, A., Németh, T., Németh, T. (2007). Anatomical and Genetic Differences Between *Salvia* Taxa. *European Journal of Pharmaceutical*. **32**(1): S20.
- Ferreira, A., Lourenço, A. (2007). Alcaloides. *Lobo, A.M., Lourenço, A.* 197-222.
- Ferreira, J. (2015). Vila Real. *press-net do Douro*. (Acedido em 12 de julho de 2015). Disponível:<http://www.dodouropress.pt/index.asp?idedicao=66&idSeccao=753&Actio n=seccao>.
- Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L., Scheffer, J. (1997). Pysiological Aspects of Essential Oil Production. In: *Essential Oils: Basic and Applied Research*, Ch. Franz, Á. Máthé, G. Buchbauer (Edições). 95-107.
- Figueiredo, C., Barroso, G., Pedro, G. (2007). Plantas Aromáticas e Medicinais. Fatores que Afetam a Produção. Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático. 3^a Edição. Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal. 1-18.
- Figueiredo, C., Barroso, G., Pedro, G., Scheffer, C. (2008). Factors Affecting Secondary Metabolite Production in Plants: Volatile Components and Essential Oils. *Flavour and Fragrance Journal*. **23**(4): 213-226.
- Flores, A., Melo, C. (2015). Principais Bactérias Causadoras de Doença de Origem Alimentar. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. **37**(1): 65-72.
- Folin, O., Ciocalteu, V. (1927). On Tyrosine and Tryptophane Determination in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. **73**(2): 627-650.

- Fraga, C., Celep, G., Galleano, M. (2010). Biochemicals Actions of Plant Phenolics Compounds: Thermodynamic and Kinetic Aspects. *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. Edited by Cesar G. Fraga. 92-103.
- Fraser, L., Greenall, A., Carlyle, C., Turkington, R., Friedman, C. (2009). Adaptive Phenotypic Plasticity of *Pseudoroegneria spicata*: Response of Stomatal Density, Leaf Area and Biomass to Changes in Water Supply and Increased Temperature. *Annals of Botany*. **103**: 769-775.
- Gamagae, S., Sivakumar, D., Wilson Wijeratman, R., Wijesundera, C. (2003). Use of Sodium Bicarbonate and *Candida oleophila* to Control Anthracnose in Papaya During Storage. *Crop Protection*. **22**: 775-779.
- García, A., Carril. E., (2009). Metabolismo Secundário e Plantas. *Reduca (Biologia)*. Serie Fisiología Vegetal. **2**(3): 119-145.
- García-Plazaola, J., Esteban, R., Hormaetxe, K. e Becerril, J. (2008). Seasonal Reversibility of Acclimation to Irradiance in Leaves of Common Box (*Buxus sempervirens* L.) in a *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. **203**(3): 254-260.
- Garland, S. (2004). The Complete Book of Herbs and Spices. International Official Publisher: Frances Lincoln Limited. 19.
- Gellingk, X., Verbeke, W., Vermeire, B. (2006). Pathways to Increase Consumer Trust in Meat as a Safe and Wholesom Food. *Meat Science*. **74**(161): 161-171.
- Generalic, I., Skroza, D., Šurjak, J., Možina, S., Ljubenkov, I., Katalinić, A., Šimate, V., Katalinić, V. (2012). Seasonal Variations of Phenolic Compounds and Biological Properties in Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry & Biodiversity*. **9**(2): 441-457.
- Geneva, P., Stancheva, V., Boychinova, M., Mincheva, H., Yonova, A. (2010). Effects of Foliar Fertilization and Arbuscular Mycorrhizal Colonization on *Salvia officinalis* L. Growth, Antioxidant Capacity, and Essential Oil Composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **90**(4). 696-702.
- Genty, B., Briantais, J., Baker, N. (1989). The Relationship Between the Quantum Yield of Photosynthetic Electron Transport and Quenching of Chlorophyll Fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. **990**(1): 87-92.
- Gird, C., Nencu, I., Costea, T., Dutu, L., Popescu, M., Ciupitu, N. (2014). Quantitative Analysis of Phenolic Compounds from *Salvia officinalis* L. Leaves. *Farmacia*. **62**, 649-657.
- Gitari, J., Friesen, D., Palmer, A. (2004). Integrated Approaches to Higher Maize Productivity in the New Millennium: Proceedings of the Seventh Eastern and Southern Africa Regional Maize Conference, CIMMYT, African Livelihoods Program. 367-371.
- Glimn-Lacy, J., Kaufman, P. (2006). Botany Illustrated: Introduction to Plants, Major Groups, Flowering Plant Families. *Springer Science & Business Media*. 18-38.
- Gobbo-Neto, L., Lopes N. (2007). Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Química Nova*. **3**(2): 374-381.
- Gomes-Laranjo, J., Galhano, V., Pereira, J., Torres-Pereira, J. (2003). Fotossíntese Bioenergética, Série Didáctica. Ciências Aplicadas: 220. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 190.
- Gonçalves, B. (2000). Estudos sobre o Desenvolvimento em Viveiro de Porta-Enxertos de Cerejeira. Dissertação de Mestrado em Horticultura, Fruticultura e Viticultura, UTAD, Vila Real. 198.
- Gonçalves, L., Azevedo, A., Otoni, W. (2010). Characterization and Ontogeny of the Glandular Trichomes of *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae), *Acta Botanica Brasilica*. **24**(4): 909-915.

- Gostin, N. (2009). Leaf Micromorphology in *Buxus sempervirens* L. During the Ontogenesis. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*. **16**(1): 57-60.
- Götz, F., Bannerman, T., Schleifer, K-H. (2006). The Genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. *The Prokaryotes*. Springer US. 5-75.
- Gould, K., Davies, K., Winefield, C. (2008). Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications. *Springer Science & Business Media*. 5.
- GPP. (2013). As Plantas Aromáticas Mediciniais e Condimentares. Portugal Continental. Gabinete de Planeamento e Políticas. Ministério da Agricultura e do Mar. 4.
- Gratani, L., Bombelli, A. (2000). Correlation Between Leaf Age and Other Leaf Traits in Three Mediterranean Maquis Shrub Species: *Quercus ilex*, *Phillyrea latifolia* and *Cistus incanus*. *Environmental and Experimental Botany*. **43**(2): 141-153.
- Gratani, L., Ghia, E. (2002). Changes in Morphological and Physiological Traits During Leaf Expansion of *Arbutus unedo*. *Environmental and Experimental Botany*. **48**(1): 51-60.
- Grausgruber-Groger, S., Schmiderer, C., Steinborn, R., Novak, J. (2012). Seasonal Influence on Gene Expression of Monoterpene Synthases in *Salvia officinalis* (Lamiaceae). *Journal of Plant Physiology*. **169**(4): 353-359.
- Grieve, M. (1995). A Modern Herbal. World Wide Web, by Ed Greenwood, Arcata Califórnia, USA. (Acedido em 24 de janeiro de 2013). Disponível: <http://botanical.com/botanical/mgmh/mgmh.html>.
- Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C. (2000). PDR for Herbal Medicines. 2 edition Montvale: *Medical Economics Company*. 655-656.
- Grzegorzczuk, I., Matkowski, A., Wysokinska, H. (2007). Antioxidant Activity of Extracts from in Vitro Cultures of *Salvia officinalis* L.. *Food Chemistry*. **104**(2): 536-541.
- Grzegorzczuk, I., Wysokinska, H. (2010). Antioxidant Compounds in *Salvia officinalis* L. Shoot and Hairy Root Cultures in Nutrients Sprinkle Bioreactor. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. **79**(1): 7-10.
- Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A. (1999). Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**(3): 454-500.
- Gülçin, I., Elmastas, G., Aboul-Enein, Y. (2007). Determination of Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) Assayed by Different Methodologies. *Phytherapy Research*. **21**(4): 354-361.
- Haida, K., Baron, A., Silva, F., Arceles, M., Fernandes, A., Andrezza, A., Costa, J. (2011). Propriedade Sequestrante de Radicais Livres e Determinação do Teor de Fenólicos Totais da Sálvia e Eucalipto. *Revista Saúde e Pesquisa*. **4**(1): 61-66.
- Hall, C., Cuppett, S. (1997). Structure-Activities of Natural Antioxidants. *Antioxidant Methodology In Vivo and In Vitro Concepts*. 2-29.
- Hallahan, D., Gray, J. (2000). Plant Trichomes. *Advances in Botanical Research, Incorporating Advances in Plant Pathology*. vol. 31, Academic Press, London. 77-120.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Ageing and Disease: from Darwinian Medicine to Antioxidant? *Science Food Agriculture*. **540**: 3-6.
- Hamburger, M., e Hostettmann, K. (1991). 7. Bioactivity in Plants: the Link Between Phytochemistry and Medicine. *Phytochemistry*. **30**(12): 3864-3874.
- Hamilton, R. (1995). Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions. Edinburgh, Oily Press. 91-130.
- Hamrouni-Sellami, I., Rahali, F., Rebey, I., Bourgou, S., Limam, F., Marzouk, B. (2013). Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Plants as Affected by Different Drying Methods. *Food and Bioprocess Technology*. **6**: 806-817.

- Harborne, J. (2012). General Procedures and Measurement of Total Phenolics in Dey, P., Harborne, J.. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol 1 Plant Phenolic. Edited by Harborne, J.B. Academic Press. 2-27.
- Harley, R.M., Atrins, N.S., Butansev, A.L., Cantino, P.D., Conn, B.J., Grayer, R., Haley, M.M., Kok, R., Krestovskaja, T., Morales, R., Paton, A.J., Ryding, O., Upson, T. (2004). Labiatae. The families and Genera of Vascular Plants: Flowering Plants, Dicotyledons. Lamiales (Except Acanthaceae Including Avicenniaceae). Edited by Kubitzki, K., Kadereit. *Springer-Verlag*. 167-275.
- Hassawi, D., Kharma, A. (2006). Antimicrobial of Some Medicinal Plants Against *Candida albicans*. *Journal of Biological Sciences*. **6**(1): 109-114.
- Hayouni, E., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau. Mohammed, H., Hamdi, M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. Essential Oils: Their Chemical Compositions and Their Preservative Effects Against *Salmonella* Inoculated in Minced Beef Meat. *International Journal of Food Microbiology*. **125**(3): 242-251.
- Heath, R., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts: I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **125**(1): 189-198.
- Henriques, A., Kerber, V., Moreno, P., Simões C. (2004). Alcaloides: Generalidades e Aspectos Básicos. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. **5**: 765-792.
- Hobson, R. (2003). The Global Epidemiology of Invasive *Candida* Infections-is the Turning. *Journal of Hospital Infection*. **55**: 159-168.
- Hoefler, C., Fleurentin, J., Mortier, F., Pelt, J., Guillemain, J. (1987). Comparative Choleric and Hepatoprotective Properties of Young Sprouts and Total Plant Extracts of *Rosmarinus officinalis* in Rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **19**(2): 133-143.
- Howes, M., Perry, E. (2011). The Role of Phytochemicals in the Treatment and Prevention of Dementia. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. **28**(6): 439-468.
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society For Microbiology*. (Acedido em 28 de junho de 2015). Disponível: <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>.
- IPMA, 2015. Normais Climatológicas. *Instituto Português do Mar e da Atmosfera*. (Acedido em 15 de julho de 2015). Disponível: <https://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/?print=true>.
- Irigoyen, J., Einerich, W., Sánchez-Díaz, M. (1992). Water Stress Induced Changes in Concentrations of Proline and Total Soluble Sugars in Nodulated Alfalfa (*Medicago sativa*) Plants. *Plant Physiology*. **84**(1): 55-60.
- Jaganath, I., Crozier, A. (2010). Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds. *Plant Phenolic and Human Health, Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. Edited by Fraga, C. 1-50.
- JBUTAD. (2015a). Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. (Acedido em 12 de julho de 2015). Disponível: http://aguiar.hvr.utad.pt/pt/herbario/cons_reg_es.
- JBUTAD. (2015b). Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. (Acedido em 13 de março de 2015). Disponível: http://aguiar.hvr.utad.pt/pt/herbario/cons_reg_es.
- Jetter, R., Schäffer, S. (2001). Chemical Composition of the *Prunus laurocerasus* Leaf Surface. Dynamic Changes of the Epicuticular Wax Film During Leaf Development. *Plant Physiology*. **126**(4): 1725-1737

- Joaquim, A. (2007). Plantas Aromáticas e Medicinais (PAM's). Produção, Transformação e Comercialização. Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático. 3ª Edição. Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal. 155-157.
- Jorba, J., Tapia, L., Sant, D. (1985). Photosynthesis, Leaf Water Potential, and Stomatal Conductance in *Olea europaea* Under Wet and Drought Conditions. *International Symposium on Water Relations in Fruit Crop*. **171**: 237-246.
- Jorge, A. (2012). Microbiologia e Imunologia Oral. 1ª Edição. Elsevier Medicina Brasil. 103-189.
- Jorgensen, J., Ferrato. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Medical Microbiology*. **49**: 1749-1755.
- Joy, P., Thomas, J., Mathew, S., Skaria, P. (1998). Medicinal Plants, Aromatic and Medicinal Plants Research Station. Kerala Agricultural University. 19-26.
- Joy, P., Thomas, J., Mathew, S., Skaria, P. (2001). Medicinal Plants. *Tropical Agriculture*. **2**: 449-632.
- Jyotirekha, G. (2011). Polyphenols as Antioxidants. *Chemistry of Phenolic Compounds: State of the Art*. Editor: Jubaraj Bikash Baruah. 141-154.
- Kaefer, C., Milner, J. (2008). The Role of Herbs and Spices in Cancer Prevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **19**: 347-361.
- Kahmen, A., Dawson, T., Vieth, A., Sachse, D. (2011). Leaf Wax n-Alkane δD Values are Determined Early in the Ontogeny of *Populus trichocarpa* Leaves When Grown Under Controlled Environmental Conditions. *Plant Cell & Environment*. **34**(10): 1639-1651.
- Kamatou, P., Viljoen, M., Figueiredo, C., Tilney, M., Van Zyl, L., Barroso, G., Pedro, G., Van Vuuren., F. (2007). Trichomes, Essential Oil Composition and Biological Activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica* Codd, Two Species From the Cape Region of South Africa. *South African Journal of Botany*. **73**: 102-108.
- Karaback, E., Uysal, D., Dogan, M. (2009). Cultivated *Salvia* Species in Turkey. *Biological Diversity and Conservation (BioDiCon)*. **2**(1): 71-77.
- Kaya, A., Goger, F., Baser, K. (2007). Morphological, Anatomical and Palynological Characteristics of *Salvia halophila* Endemic to Turkey. *Nordic Journal of Botany*. **25**: 351-358.
- Kerstiens, G. (1996). Cuticular Water Permeability and its Physiological Significance. *Journal of Experimental Botany*. **47**(305): 1813-1832.
- Kerstiens, G. (2006). Water Transport in Plant Cuticles: an Update. *Journal of Experimental Botany*. **57**(11): 2493-2499.
- Keutgen, N., Chen, K. (2001). Responses of *Citrus* Leaf Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence, Macronutrient and Carbohydrate Contents to Elevated CO₂. *Journal of Plant Physiology*. **158**(10): 1307-1316.
- Keutgen, N., Chen, K., Lenz, F. (1997). Responses of Strawberry Leaf Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and Macronutrient Contents to Elevated CO₂. *Journal of Plant Physiology*. **150**(4): 395-400.
- Kingsley, R. (1998). Ervas: Guia Prático. Editora: Rebecca Kingsley. Livraria Nobel. 54-55.
- Kintzios, S. (2000). Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles, Sage, The Genus *Salvia*. Harwood Academic Publishers, The Netherlands. 243-250.
- Klepser, M. (2011). The Value of Amphotericin B in the Treatment of Invasive Fungal Infections. *Journal of Critical Care*. **26**: 225.e1-225.e10.

- Kolasani, A., Xu, H., Millikan, M. (2011). Evaluation of Mineral Content of Chinese Medicinal Herbs Used to Improve Kidney Function With Chemometrics. *Food Chemistry*. **127**(4): 1465-1471.
- Kositsup, B., Kasemsap, P., Thanisawanyangkura, S., Chairungsee, N., Satakhun, D., Teerawatanasuk, K., Ameglio, T., Thaler, P. (2010). Effect of Leaf Age and Position on Light-Saturated CO₂ Assimilation Rate, Photosynthetic Capacity, and Stomatal Conductance in Rubber Trees. *Photosynthetica*. **48**: 67-78.
- Kouhila, M., Belghit, A., Daguene, M., Boutaleb, B. (2001). Experimental Determination of the Sorption Isotherms of Mint (*Mentha viridis*), Sage (*Salvia officinalis*) and Verbena (*Lippia citriodora*). *Journal of Food Engineering*. **47**: 281-287.
- Kowalczyk, A., Raman, V., Galal, A., Khan, I., Siebert, D., Zjawiony, J. (2014). Vegetative Anatomy and Micromorphology of *Salvia divinorum* (Lamiaceae) from Mexico, Combined with Chromatographic Analysis of Salvinorin. *Journal of Natural Medicines*: **68**: 63-73.
- Krall, P., Edwards, E. (1993). PEP Carboxylases from Two C₄ Species of Panicum With Markedly Different Susceptibilities to Cold Inactivation. *Plant and Cell Physiology*. **34**(1): 1-11.
- Krause, G., Weiss, E. (1991). Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: the Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **42**(1): 313-349.
- Kurtzman, C., Fell, J. (2000). The Yeast. A Taxonomic Study. Fourth Edition. Part I. Edited by Kurtzman, C., Fell, J. 3-20; 65-85.
- Kurtzman, C., Fell, J., Boekhout, T. (2011). Yeast. A Taxonomic Study. Volume 1. Edited by Kurtzman, C., Fell, J., Boekhout, T. 476-480; 536-538; 553-554.
- Lamb, D., Kelly, D., Kelly, S. (1999). Molecular Aspects of Azole Antifungal Action and Resistance. *Drug Resistance Updates*. **2**: 390-402.
- Lambrecht, S., Santiago, L., DeVan, C., Cervera, J., Stripe, C., Buckingham, L., Pasquini, S. (2011). Plant Water Status and Hydraulic Conductance During Flowering in the Southern California Coastal Sage Shrub *Salvia mellifera* (Lamiaceae). *American Journal of Botany*. **98**: 1286-1292.
- Lamendin, H., Toscano, G., Requirand, P. (2004). Phytothérapie et Aromathérapie Buccodentaires. *EMC - Dentisterie*. **1**(2): 179-192.
- Landolino, A., Cook, D. (2010). Phenylpropanoid Metabolism in Plant: Biochemistry, Functional Biology, and Metabolic Engineering. *Plant Phenolic and Human Health, Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. Edited by Fraga, C. 490-519.
- Larcher, W. (1995). Physiological Plant Ecology, 3rd Edition. *Springer-Verlag*, Berlin. 506.
- Larcher, W. (2003). Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. *Springer Science & Business Media*. 231-238.
- Lassois, L., Lapeyre de Bellaire, L., Jijakli, M. (2008). Biological Control of Crown Rot of Bananas with *Pichia anomala* Strain K and *Candida oleophila* Strain O. *Biological Control*. **45**: 410-418.
- Lawlor, W. (1993). Photosynthesis: Molecular, Physiological and Environmental Processes. 2^a Edition, Longman Scientific & Technical. Harlow Essex. 318.
- Leal, P., Braga, M., Sato, D., Carvalho, J., Marques, M., Meireles, M. (2003). Functional Properties of Spice Extracts Obtained Via Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**(9): 2520-2525.
- Lefsrud, M., Kopsell, D., Wenzel, A., Sheehan, J. (2007). Changes in Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) Carotenoid and Chlorophyll Pigment Concentrations During Leaf Ontogeny. *Scientia Horticulturae*. **112**(2): 136-141.

- Lennette, E., Balows, A., Hausler, W., Shadomy, H. (1985). Manual of Clinical Microbiology. Fourth Edition. 526-539.
- Lepeduš, H., Gaća, V., Viljevac, M., Kovač, S., Fulgosi, H., Šimić, D., Jurković, V., Cesar, V. (2011). Changes in Photosynthetic Performance and Antioxidative Strategies During Maturation of Norway Maple (*Acer platanoides* L.) Leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. **49**(4): 368-376.
- Letts, M.G., Rodríguez-Calcerrada J., Rolo, V., Rambal, S. (2012). Long-Term Physiological and Morphological Acclimation by the Evergreen Shrub *Buxus sempervirens* L. to Understory and Canopy Gap Light Intensities. *Trees*. **26**(2): 479-491.
- Lichston, L., Pires de Godoy, S. (2006). Morfologia e Teor de Ceras Folhas de Café Após Aplicação de Fungicida. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **41**(6): 919-926.
- Lichtenthaler, H. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*. **148**: 350-382.
- Lima, C., Andrade, P., Seabra, R., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. (2005). The Drinking of a *Salvia officinalis* Infusion Improves Liver Antioxidant Status in Mice and Rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **972**(2): 383-389.
- Lin, C-C., Liu, C-P., Hsieh, F-C, Lee, C-M., Wang, W-S. (2014). Antimicrobial Susceptibility and Clinical Outcomes of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections in a Tertiary Teaching Hospital in Northern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. **xx**: 1-7.
- Lobo, A., Lourenço, A. (2007). Metabolitos Derivados do Ácido Xiquímico. Lobo, A., Lourenço, A. 155-191.
- Lu, Q., Zhang, J., Kuang, T. (2001). Characterization of Photosynthetic Pigment Composition, Photosystem II Photochemistry and Thermal Energy Dissipation During Leaf Senescence of Wheat Plants Grown in the Field. *Journal of Experimental Botany*. **52**(362): 1805-1810.
- Lu, Y., Foo, L. (1999). Rosmarinic Acid Derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*. **51**(1): 91-94.
- Lu, Y., Foo, L. (2000). Flavonoid and Phenolic Glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*. **55**(3): 263-267.
- Lu, Y., Foo, L. (2001). Antioxidant Activities of Polyphenols from Sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*. **75**(2): 197-202.
- Lugasi, A., Hovari J., Hagymasi K., Jakoczi I., Blazovics A. (2006). Antioxidant Properties of a Mixture of Lamiaceae Plants Intended to Use as Food Additive. *Acta Alimentaria*. **35**: 85-97.
- Lüttge, U., Haridasan, M., Fernandes, G., de Mattos, E., Trimborn, P., Franco, A., Caldas, L., Ziegler, H. (1998). Photosynthesis of Mistletoes in Relation to their Hosts at Various Sites in Tropical Brazil. *Trees - Structure and Function*. **12**(3): 167-174.
- Lutts, S., Kinet, J., Bouharmont, J. (1996). NaCl-Induced Senescence in Leaves of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars Differing in Salinity Resistance. *Annals of Botany*. **78**(3): 389-398.
- Mackinney, G. (1941). Absorption of Light by Chlorophyll Solutions. *The Journal of Biological Chemistry*. **140**(2): 315-322.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clarck, D. (2009). Microbiologia de Brock. 12ª Edição, Martinko, Dunlap. Artimed Editora S.A. 10-17.
- Marchi, S., Tognetti, R., Minnocci, A., Borghi, M., Sebastiani, L. (2008). Variation in Mesophyll Anatomy and Photosynthetic Capacity During Leaf Development in a Deciduous Mesophyte Fruit Tree (*Prunus persica*) and an Evergreen Sclerophyllous Mediterranean Shrub (*Olea europaea*). *Trees*. **22**: 559-571.

- Mariutti, L., Barreto, G., Bragagnolo, N., Mercadante, A. (2008). Free Radical Scavenging Activity of Ethanolic Extracts from Herbs and Spices Commercialized in Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **51**(6): 1225-1232.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, M., Tuñón, M. (2002). Los Flavonoides: Propriedades y Acciones Antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria XVII*. **17**(6): 271-278.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I. (2015). Evaluation of Bioactive Properties and Phenolic Compounds in Different Extracts Prepared from *Salvia officinalis* L.. *Food Chemistry*. **170**: 378-385.
- Masaki, H., Sakaki, S., Atsumi, T., Sakurai, H. (1995). Active-Oxygen Scavenging Activity of Plant Extracts. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **18**(1): 162-166.
- Mateos, R., Espartero, J.L., Trujillo, M., Rios, J.J., León-Camacho, M., Alcudia, F. (2001). Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **49**(5): 2185-2192.
- Matkowski, A. (2008). Plant in Vitro Culture for the Production of Antioxidants - A Review. *Biotechnology Advances*. **26**: 548-560.
- Maxwell, K., Johnson, G. (2000). Chlorophyll Fluorescence a Practical Guide. *Journal of Experimental Botany*. **51**: 659-668.
- McLeod, M. (1995). Arte de Viver. Guia Prático das Plantas Aromáticas. Cultura, Utilização Culinária e Medicinal. Publicações Europa-América. 99-101.
- McVicar, J. (2006). Le grand livre des herbes: jardin, Santé, Cuisine, Maison, Edition De Borée.
- Mehrotra, R., Aneja, K. (2005). An Introduction to Mycology. Department of Botany. Second Edition. New Age International Publishers. 251-430.
- Meier, I., Leuschner, C. (2008). Leaf Size and Leaf Area Index in *Fagus sylvatica* Forests: Competing Effects of Precipitation, Temperature, and Nitrogen Availability. *Ecosystems*. **11**(5): 655-669.
- Melis, A. (1999). Photosystem-II Damage and Repair Cycle in Chloroplasts: What Modulates the Rate of Photodamage In Vivo? *Trends in Plant Science*. **4**(4): 130-135.
- Mertas, A., Garbusińska, A., Szliszka, E., Jureczko, A., Kowalska, M., Król, W. (2015). The Influence of Tea Tree Oil (*Melaleuca alternifolia*) on Fluconazole Activity Against Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Strain. *BioMed Research International*. **2015**: 1-10.
- Meyer, B., Anderson, D., Böhning, R., Fratiante, D. (1983). Introdução à Fisiologia Vegetal. 2ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. 220-223; 226-236.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P., Van Beek, T. (2004). Screening of Radical Scavenging Activity of Medicinal and Aromatic Plant Extracts. *Food Chemistry*. **85**(2): 231-237.
- Moreira, I. (1993). Histologia Vegetal. Didáctica Editora. 206-207.
- Moreira, I., Teixeira G., Monteiro, A., (2010). Anatomia das Plantas, Estruturas Secretoras. Série Didáctica Botânica. ISA Press, Lisboa. 40-60.
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C., Vojnov, A. (2006). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Rosemary Extracts Linked to Their Polyphenol Composition. *Free Radical Research*. **40**(2): 223-231.
- Morrison, R., Boyd, R. (1996). Química Orgânica. 13ª Edição. Fundação Calouste Gulbenkian \ Lisboa. 1001-1028.
- Mosafa, E., Yahyaabadi, S., Doudi, M. (2014). In-Vitro Antibacterial Properties of Sage (*Salvia officinalis*) Ethanol Extract Against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. **16**(10): 42-46.

- Moutinho-Pereira, J. (2000). Caracterização Fisiológica e Agronômica de Diferentes Estratégias Culturais para Minimizar o Stress Estival em *Vitis vinifera* L. na Região Demarcada do Douro. Tese de Doutorado, UTAD, Vila Real.
- Müller, J., Heindl, A. (2006). Drying of Medicinal Plants. *Frontis*. 17: 237-252.
- Muñoz, F. (1993). Plantas Medicinales y Aromáticas. Estudio Custivo y Procesado. Ediciones Mundi-Prensa, Barcelona. Editorial Aedos, S.A. 15-31.
- Nascimento, G., Locatelli, J., Freitas, P., Silva, G. (2000). Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31(4): 247-256.
- Nasta, O., Akoumianaki-Ioannidou, A., Liakopoulos, G., Nikolopoulou, A. (2014). Effects of Salinity in the Form of Simulated Sea-Spray (NaCl or NaCl⁺ H₃BO₃ Solution) on Growth and Photosynthetic Performance of Sage (*Salvia officinalis*). *Australian Journal of Crop Science*. 8: 1186-1194.
- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2004a). Method of Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guidance M44-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania.
- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2004b). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada. Segunda Edição M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania.
- Negri, M.L.S., Possamai, J.C., Nakashim, T. (2009). Atividade Antioxidante das Folhas de Espinheira-Santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Secas em Diferentes Temperaturas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19(2B): 553-556.
- Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity *In Vitro* and *In Vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*. 49(4): 503-515.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S., Murata, N. (2006). A New Paradigm for the Action of Reactive Oxygen Species in the Photoinhibition of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*. 742-749.
- Nunes, C. (2007). Caracterização da Resposta ao Deficit Hídrico de Linhas Transgênicas de *Medicago truncatula* cv. Jemalong. Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia. Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências. 24-55.
- Odds, F., Brown, O., Gow. (2003). Antifungal Agents Mechanisms of Action. *Trends in Microbiology*. 11(6): 272-279.
- Ohe, M., Rapolu, M., Mieda, T., Miyagawa, Y., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Shigeoka, S. (2005). Decline in Leaf Photooxidative-Stress Tolerance With Age in Tobacco. *Plant Science*. 168(6): 1487-1493.
- Oliveira, A., Meirelles, S., Salatino, A. (2003). Epicuticular Waxes from Caatinga and Cerrado Species and their Efficiency Against Water Loss. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 75(4): 431-349.
- Oliveira, Costa, P., Atta, E., Silva, A. (2014). Infection with Multidrug-Resistant Gram-negative Bacteria in a Pediatric Oncology Intensive Care Unit: Risk Factors and Outcomes. *Sociedade Brasileira de Pediatria*. 270: 1-7.
- Oliveira, S., de Moura, F., Demarco, F., Nascente, P., Pino, F., Lund, R. (2012). An Ethnomedicinal Survey on Phytotherapy with Professionals and Patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. *Journal of Ethnopharmacology*. 140(2): 428-437.
- Oluwatuyi, M., Kaatz, G., Gibbons, S. (2004). Antibacterial and Resistance Modifying Activity of *Rosmarinus officinalis*. *Fitochemistry*. 65(24): 3249- 3254.

- Ortiz, D. G. (2009). Flora Ornamental Española: Aspectos Históricos y Principales Espécies. Monografias Bouteloua. **8**: 274.
- Osaki, M., Shinano, T., Tadano, T. (1991). Redistribution of Carbon and Nitrogen Compounds from the Shoot to the Harvesting Organs During Maturation in Field Crops. *Soil Science and Plant Nutrition*. **37**(1): 117-128.
- Ostrosky, E., Mizumoto, M., Lima, M., Kaneko, T., Nishikawa, S., Freitas, B. (2008). Métodos para Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de Plantas Medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **18**(2): 301-307.
- Ozgen, M., Reese, N., Tulio Jr, A., Scheerens, J., Miller, A. (2006). Modified 2,2-Azino-bis-3ethylbenzoline-6-sulfinic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2C-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**(4): 1151-1157.
- Pallardy, S. (2008). Physiology of Woody Plants. Scholl of Natural Resources, University of Missouri. Academic Press. 147-162.
- Pelczar, M., Reid, R., Chan, E. (1980). Microbiologia Volume I. McGraw-Hill. 345-363.
- Pelczar, M., Reid, R., Chan, E. (1981). Microbiologia Volume II. McGraw-Hill. 647-722; 724-776.
- Pellegrini, E., Francini, A., Lorenzini, G., Nali, C. (2015). Ecophysiological and Antioxidant Traits of *Salvia officinalis* Under Ozone Stress. *Environmental Science and Pollution Research*. 1-11.
- Pereira, J., Correia, C., Gonçalves, B., Bacelar, E., Laranjo, J. (2010). Manual de Trabalhos Práticos em Biologia Vegetal, Série Didáctica. Ciências Aplicadas: 398. UTAD. 91-94.
- Pereira-Müller, M. (2012). Ervas & Mezinhas na Cozinha e na Saúde. Colares Editora.
- Peri, P., Arena, M., Martínez Pastur, G., Lencinas, M. (2011). Photosynthetic Response to Different Light Intensities, Water Status and Leaf Age of Two Berberis Species (Berberidaceae) of Patagonian Steppe, Argentina. *Journal of Arid Environments*. **75**(11): 1218-1222.
- Pigatto, M., Uchoa, F., Costa, T. (2009). Farmococinética dos Novos Antifúngicos de Uso Sistêmico Utilizados em Pacientes Imunocomprometidos. *Revista Brasileira de Farmácia*. **90**(1): 86-94.
- Pinheiro, R., Carpes S. (2012). Caracterização Fenólica, Atividade Antioxidante *in vitro* de Artemísia (*Artemisia annua* L.) e Sálvia (*Salvia officinalis*). XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. *in* Sicite 2012.
- Pinto, E., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Goncalves, M. (2007). In Vitro Susceptibility of Some Species of Yeasts and Filamentous Fungi to Essential Oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products*. **26**(2): 135-141.
- Poorter, H., Niinemets, Ü., Poorter, L., Wright, I., Villar, R. (2009). Causes and Consequences of Variation in Leaf Mass Per Area (LMA): a Meta-Analysis. *New Phytologist*. **182**: 565-588.
- Poquet, L., Clifford, M., Williamson, G. (2010). Bioavailability of Flavanols and Phenolic Acids. *Plant Phenolic and Human Health, Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. Edited by Fraga, C. 51-82.
- Porte, A., Godoy R. (2001). Alecrim (*Rosmarinum officinalis* L.): Propriedades Antimicrobiana e Química do Óleo Essencial. *Boletim CEPPA*. **19**(2): 193-210.

- Pozzo, M., Santurio, D., Rossato, L., Soares, I., Alves, S., Costa, M. (2011). Atividade Antimicrobiana de Condimentos Frente a *Staphylococcus* spp. Isolados de Mastite Caprina. *Ciências Rurais*. **41**(4): 667-672.
- Prasad, R., Giilz, P. (1990). Developmental and Seasonal Variations in the Epicuticular Waxes of Beech Leaves (*Fagus sylvatica* L.). *Zeitschrift für Naturforschung C*. **45**: 805-812.
- Proença da Cunha, A., Ribeiro, J., Roque, O. (2007). Plantas Aromáticas em Portugal - Caracterização e Utilizações. *Edições Calouste Gulbenkian*.
- Proença da Cunha, A., Silva, A., Roque, O. (2003). Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. Edição. Lisboa: *Fundação Calouste Gulbenkian*. 578-581.
- Proença da Cunha, A., Silva, A., Roque, O. (2011). Cultura e Utilização das Plantas Medicinais e Aromáticas. Edição. Lisboa: *Fundação Calouste Gulbenkian*. 365-372.
- Reller, L., Weinstein, M., Jorgensen, J., Ferraro, M. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. **49**(11): 1749-1755.
- Riederer, M., Schreiber, L. (2001). Protecting Against Water Loss: Analysis of True Barrier Properties of Plant Cuticles. *Journal of Experimental Botany. Plants Under Stress Special Issue*. **52**(363): 2023-2032.
- Roby, M., Sarhan, M., Selim, K., Khalel, K. (2013). Evaluation of Antioxidant Activity, Total Phenols and Phenolic Compounds in Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Sage (*Salvia officinalis* L.), and Marjoram (*Origanum majorana* L.) Extracts. *Industrial Crops and Products*. **43**: 827-831.
- Rodrigues, J. (2007). Estudo Etnobotânico das Plantas Aromáticas e Medicinais. Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático. 3ª Edição. Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal. 168-174.
- Roldán, A. (2004). Las 40 Plantas Medicinales Más Populares. 4ª Edición. Editorial EDAF, S.A. 165-170.
- Rosini, J., Yu, C. (2011). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: New Treatment Guidelines for an Old Bug. *Journal of Emergency Nursing*. **37**(36): 590-593.
- Rosúa, L., Blanca, G. (1989). A Revision of the Genus *Salvia* L. Sect. *Aethiopsis* Benth. in Western Mediterranean. *Collectanea Botanica*. **17**(2): 205-236.
- Salgado, P., Favarin, J., Leandro, A. (2005). Fenóis Totais nas Folhas Dreno e Fonte de Cafeeiro (*Coffea arabica* L.) Com e Sem Produção. Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil *SPCB Londrina*.. Anais Brasilia.2-4.
- Saligkarias, I., Gravanis, F., Epton, H. (2002). Biological Control of *Botrytis cinerea* on Tomato Plants by the Use of Epiphytic Yeast *Candida guilliermondii* Strains 101 and Us 7 and *Candida oleophila* Strains I-182: I. in vivo Studies. *Biological Control*. **25**: 143-150.
- Sánchez-Díaz, M., Aquirreola, J. (2000). Movimientos Estomáticos y Transpiración. Azcon-Bieto, J. y M. Talon. Fundamentos de Fisiología Vegetal. 1ª Edição. Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid. 31-43.
- Santos, A., Santos, D., Freitas, C., Ferreira, B., Afonso, I., Rodrigues, C., Castro, H. (2007). *Staphylococcus aureus*: Visitando uma Cepa de Importância Hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. **43**(6): 413-423.
- Santos, R. (2000). Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. *Simões, C., Schenkel, E., Gosmann, G., Mello, J.* 323-354.

- Santos-Gomes, P., Seabra, R., Andrade, P., Fernandes-Ferreira, M. (2002). Phenolic Antioxidant Compounds Produced by in Vitro Shoots of Sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*. **162**(6): 981-987.
- Sarma, J. (2011). Naturally Occurring Polyphenols and Their Utility. *Chemistry of Phenolic Compounds: State of the Art*. Editor: Jubaraj Bikash Baruah. 19-28.
- Savio, Y., Robinson, C. (1998). Sage. in Specialty and Minor Crops Handbook, University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Communications Services-Publications. 107-109.
- Scheckel, K., Degner, S., Romagnolo, D. (2008). Rosmarinic Acid Antagonizes Activator Protein-1-Dependent Activation of Cyclooxygenase-2 Expressin in Human Cancer and Nonmalignant Cell Lines. *Journal Nutrition*. **138**: 2098-2105.
- Schippmann, U., Leaman, D., Cunningham, A. (2006). A Comparison of Cultivation and Wild Collection of Medicinal and Aromatic Plants Under Sustainability Aspects. In Medicinal and Aromatic Plants, Boger, R., Craker, L., Lange, D., Eds., Springer, The Netherlands. 75-95.
- Schultz, H. (1996). Leaf Absorptance of Visible Radiation in *Vitis vinifera* L.: Estimates of Age and Shade Effects With a Simple Field Method. *Scientia Horticulturae*. **66**(1-2): 93-102.
- Seidler-Łożykowska, K., Mordalski, R., Król, D., Bocianowski, J., Karpińska, E. (2014). Yield and Quality of Sage Herb (*Salvia officinalis* L.) from Organic Cultivation. *Biological Agriculture & Horticulture*, (ahead-of-print). 1-8.
- Sejas, L., Silbert, L., Reis, A., Sader, H. (2002). Avaliação da Qualidade dos Discos com Antimicrobianos para Testes de Disco-Difusão Disponíveis Comercialmente no Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. **39**(1): 27-35.
- Šesták, Z., Čatský, J., Jarvis, P. (1971). Plant Photosynthetic Production: Manual of Methods, Junk. 818.
- Shahidi, F. (1997). Natural Antioxidant: An Overview. *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects, and Applications*. 1-9.
- Shan, B., Cai, Y., Sun, M., Corke, H. (2005). Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **53**(20): 7749-7759.
- Shan, B., Cai, Y-Z., Brooks, J., Corke, H. (2007). The In vitro Antibacterial Activity of Dietary Spice and Medicinal Herb Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **117**: 112-119.
- Sharma, O. (2006). Textbook of Fungi. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited. 22-31.
- Shepherd, T., Griffiths, D. (2006). The Effects of Stress on Plant Cuticular Waxes. *New Phytologist*. **171**: 469-499.
- Siegler, D. (1997). Plant Secondary Metabolism, Part I. Kluwer Academic: Boston.150-168.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, M., Duarte, G., Machado, L., Matos, A. (2003). Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of Essential Oils of Eucalyptus. *Journal Ethnopharmacology*. **89**(2): 277-283.
- Silva, R., Coelho, G. (2006). Fungos Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas. Instituto de Botânica - IBt. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. 3.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D., Azeredo, J. (2012). *Candida glabarta*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, Epidemiology, Pathogenicity and Antifungal Resistance. Review Article. *Federation of European Microbiological Societies*. **36**(2): 288-305.

- Silveira, G., Nome, F., Gesser, J., Sá, M. (2006). Estratégias Utilizadas no Combate a Resistência Bacteriana. *Química Nova*. **29**(4): 844-855.
- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (2007). Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 6ª Edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC. 615-656.
- Singer, C. (2008). Deer in My Garden, The Yucky Flower Series. Volume 1: Perennials & Subshrubs, Garden Wisdom Press. 179-181.
- Solomon, E., Berg, L., Martin, D. (2014). Biology. Tenth Edition. Books School, Cengage Learning. 704-738.
- Sousa, C., Silva, H., Vieira-Jr, G., Ayres, M., Costa, C., Araújo, D., Cavalcante. L., Barros, E., Araújo, P., Brandão, M., Chaves, M. (2007). Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. *Química Nova*. **30**(2): 351-355.
- Souza, A., Armstrong, L., Merino, F., Cogo, L., Monteiro, C., Duarte, M., Miguel, O., Miguel, M. (2014). *In vitro* Effects of *Eugenia pyriformis* Cambess. Myrtaceae: Antimicrobial Activity and Synergistic Interactions with Vancomycin and Fluconazole. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **8**(35): 862-867.
- Soysal, Y., Öztekin, S. (1999). Equilibrium Moisture content Equations for Some Medicinal and Aromatic Plants. *Journal of Agricultural Engineering Research*. **74**: 317-324.
- Stagos, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Pangoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A., Kouretas, D. (2012). Correlation of Total Polyphenolic Content with Antioxidant and Antibacterial Activity of 24 Extracts from Greek Domestic Lamiaceae Species. *Food Chemistry Toxicology*. **50**(11): 4115-4124.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A. (2002). Tratado de Botânica. 845-846.
- Suarez, J. (2007). Más de 100 Plantas Medicinais. Medicina Popular Canária Monografias. Editora: La Obra Social de La Caja d Canarias. 17-22.
- Suzy, Y., Dennis, H., Hutton, R., Clarke, S. (2011). Transpiration Efficiency of the Grapevine cv. Semillon is Tied to VPD in Warm Climates. *Annals of Applied Biology*. **158**: 106-114.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2006). Plant Physiology. Third Editon. Sinauer Associates, Inc. USA. 285-306.
- Tanko, H., Carrier, D., Duan, L., Clausen, E. (2005). Pre-and Post-harvest Processing of Medicinal Plants. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. **3**: 304-313.
- Teles, D., Costa, M. (2014). Estudo da Ação Antimicrobiana Conjunta de Extratos Aquosos de Tansagem (*Plantago major* L., Plantaginaceae) e Romã (*Punica granatum* L., Punicaceae) e Interferência dos Mesmos na Ação da Amoxicilina *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. **16**(2): 323-328.
- Tepe, B. (2008). Antioxidant Potentials and Rosmarinic Acid Levels of the Methanolic Extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresource Technology*. **99**, 1584-1588.
- Terao, J. (2010). Flavonols: Metabolism Bioavailability, and Health Impacts. *Plant Phenolic and Human Health, Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. Edited by Fraga, C. 185-193.
- Todar, K. (2008a). Pathogenic *S. aureus*. Todar's Online Textbook of Bacteriology. Madison Wisconsin. (Acedido em 17 de maio de 2015). Disponível: <http://www.textbookofbacteriology.net/>.
- Todar, K. (2008b). Pathogenic *Eschirichia. Coli*. Todar's Online Textbook of Bacteriology. Madison Wisconsin. (Acedido em 17 de maio de 2015). Disponível: <http://www.textbookofbacteriology.net/>.

- Todar, K. (2008c). Pathogenic *Listeria monocytogenes* Todar's Online Textbook of Bacteriology. Madison Wisconsin. (Acedido em 23 de maio de 2015). Disponível: <http://www.textbookofbacteriology.net/>.
- Topçu, G., Gören, A. (2007). Biological Activity of Diterpenoids Isolated from Anatolian Lamiaceae Plants. *Records of Natural Products*. **1**(1): 1-16.
- Tortora, G., Funke, B., Case, C. (2010). Microbiologia. 10ª Edição. Artmed Editora SA. 195-204.
- Tosun, M., Ercisli, M., Sengul, H., Ozer, T., Polat, E., Ozturk. (2009). Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Eight *Salvia* Species from Turkey. *Biological Research*. **42**(2): 175-181.
- Unal, E., Mavi A., Kara A., Cakir A., Sengul M., Yildirim A. (2008). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Some Plants Used as Remedies in Turkish Traditional Medicine. *Pharmaceutical Biology*. **46**: 207-224.
- Vaishnav, P., Demain, A. (2011). Unexpected Applications of Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances*. **29**(2): 223-229.
- Vaško, L., Vašková, J., Fejčáková, A., Mojžišová, G., Poráčová, J. (2014). Comparison of Some Antioxidant Properties of Plant Extracts From *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Eleutherococcus senticosus* and *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. **50**: 614-622.
- Veličković, D., Karabegović, I., Stojičević, S., Lazić, M., Marinković, V., Veljkovic, V. (2011). Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts Obtained from *Salvia glutinosa* L. and *Salvia officinalis* L.. *Hemijška Industrija*. **65**(5): 599-605.
- Veličković, D., Randjelovic, N., Ristić, M., Veličković, Šmelcerović, A. (2003). Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of the Ethanol Extracts Obtained from the Flower, Leaf and Stem of *Salvia officinalis* L. *Journal Serbian Chemical Society*. **68**(1): 17-24.
- Verduyn Lunel, F., Meis, J. (1999). Nosocomial Fungal Infection: Candidemia. *Diagnostic Microbiology Infection Diseases*. **34**: 213-220.
- Vermerris, W., Nicholson, R. (2006). Phenolic Compound Biochemistry. Springer Netherlands. 1-32; 63-88; 237-244.
- Vienna, F., Graz, B., Hohenheim, C., Milano, T., Trieste, T., Wien, Z-E. (2005). Study on the Assessment of Plant/ Herbs, Plant/Herb Extracts and Their Naturally or Synthetically Produced Components as “Additives” For Use in Animal Production. CFT/EFSA/FEEDAP. 297.
- Vile, D., Pervent, M., Belluau, M., Vasseur, F., Bresson, J., Muller, B., Granier, C., Simonneau, T. (2012). Arabidopsis Growth Under Prolonged High Temperature and Water Deficit: Independent or Interactive Effects? *Plant Cell & Environment*. **35**(4): 702-718.
- Von Caemmerer, S. e Farquhar, D. (1981). Some Relationships Between the Biochemistry of Photosynthesis and the Gas Exchange of Leaves. *Planta*. **153**(4): 376-387.
- Walker, B., Sytsma J. (2007). Staminal Evolution in the Genus *Salvia* (Lamiaceae): Molecular Phylogenetic Evidence for Multiple Origins of the Staminal Lever. *American Journal of Botany*. **100**(2): 375-391.
- Walker, B., Sytsma, J., Treutlein, J., Wink, M. (2004). *Salvia* (Lamiaceae) Radiation, and Ecological Pecializations of *Salvia* and Mentheae. *American Journal of Botany*. **91**(7): 1115-1125.

- Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., Voie, E., Huang, T-C., Ho, C-T. (1998). Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *Journal Agriculture Food Chemistry*. **46**: 4869-4873.
- Wang, R., Chang, J., Li, K., Lin, T., Chang, L. (2014). Leaf Age and Light Intensity Affect Gas Exchange Parameters and Photosynthesis Within the Developing Canopy of Field Net-House-Grown Papaya Trees. *Scientia Horticulturae*. 165: A365-373.
- WCSP. (2012). World Checklist of Selected Plant Families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. (Acedido em 6 de dezembro de 2012). Disponível: <http://apps.kew.org/wcsp/Retrieved>.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G. (2006). Koneman Diagnóstico Microbiológico Text y Atlas en color. 6ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 2-5; 161- 200; 225-239; 593-637; 1164-1180.
- Witkowski, E., Lamont, B. (1991). Leaf Specific Mass Confounds Leaf Density and Thickness. *Oecologia*. 88: 486-493.
- Woese, C., Kandler, O., Wheelis, M. (1990). Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **87**(2): 4576-4579.
- Wojdylo, A., Oszmiański, J., Czemerys. (2007). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in 32 Select Herbs. *Food Chemistry*. **105**(3): 94-949.
- Yi, W., Wetzstein, H. (2010). Biochemical, Biological and Histological Evaluation of Some Culinary and Medicinal Herbs Grown Under Greenhouse and Field Conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90: 1063-1070.
- Yu, S., Cheung, K., Li, W., Kong, A-G. (2010). Plant Phenolic Compounds: Modulation of Cytoprotective Enzymes and Nrf2/ARE Signaling. *Plant Phenolic and Human Health, Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. Edited by Fraga, C. 402-417.
- Zervoudakis, G., Salahas, G., Kaspiris, G., Konstantopoulou, E. (2012). Influence of Light Intensity on Growth and Physiological Characteristics of Common Sage (*Salvia officinalis* L.). *Brazilian Archives of Biology And Technology*. **55**(1): 89-95.
- Zuanazzi, J. (2000). Flavonoides. *Simões, C., Schenkel, E., Gosmann, G., Mello, J.* 489-516.

Anexo

Anexo 1 - Resultados da análise de solo do local de implementação de *Salvia officinalis* L. var. *purpurescens*.

Profundidade (cm)	0 a 30
Areia grossa (%)	15,1
Areia fina (%)	69,1
Limo (%)	8,7
Argila (%)	7,1
Textura	Franco-arenoso
M.O. (%)	1,45
P ₂ O ₅ (E.R. ppm)	63
K ₂ O (E.R. ppm)	348
pH (H ₂ O)	5,4
pH (KCl)	4,2
Bases de Troca (meq/100)	
Ca ²⁺	2,57
Mg ²⁺	0,55
K ⁺	0,65
Na ⁺	0,25
Soma	4,02
Acidez	
Acidez (meq/100)	0,25
Al ³⁺	0,13
C.T.C. (meq/100)	4,27
G.S. bases (%)	94,15
% a pF	
2,0	35,85
2,7	27,35
4,2	16,28
Densidade real	2,19
Densidade aparente	1,01
Porosidade total (%)	54,05
Cap. Max. p. ^a ág. (%)	53,77
