



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



HELNA CÉLIA PASSINHO SOARES

**MICROPROPAGAÇÃO E PRODUÇÃO DE MONOTERPENOS
E SESQUITERPENOS EM *PLECTRANTHUS ORNATUS CODD***

Feira de Santana, BA
2010

HELNA CÉLIA PASSINHO SOARES

**MICROPROPAGAÇÃO E PRODUÇÃO DE MONOTERPENOS
E SESQUITERPENOS EM *PLECTRANTHUS ORNATUS CODD***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia,
da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial
para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadores: Prof^º. Dr^ª. Juceni Pereira Lima David
Prof. Dr José Raniere Ferreira de Santana

Feira de Santana, BA
2010

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível. Ao meu saudoso e amado esposo Gilson (in memoriam) pelo grande companheiro que foi, pelo exemplo de fé e perseverança, pelo apoio, estímulo e dedicação que sempre me dedicou. Aos meus pais Clóvis e Dulce; pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Em especial, a minha amada Nathália, presente em tudo na minha vida. Razão de tudo em minha vida. Te amo Filha!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, único e digno de receber honras e glória. Deus eterno, imortal, invisível, mais real. A Ele o meu louvor e gratidão.

A Universidade Estadual de Feira de Santana, especialmente ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia (UEFS/Fiocruz), pela oportunidade da realização do curso de Doutorado.

A FAPESB pela concessão da bolsa de estudos.

A Prof^a Juceni David e ao Prof. Dr. Raniere pela confiança, pela amizade e orientação que auxiliaram na concretização deste estudo.

Ao secretário do PPGBiotec, Helton pela disposição, educação e gentileza que sempre nos acolheu.

As Professoras Dra Neci e Marcia pelo apoio e liberação do uso da Câmara de fluxo laminar

Aos membros da comunidade Evangélica Vida Nova, pelo acolhimento e orações. Ao Pr. Renato e Pr. Toni e Diaconiza Mirian, meus sinceros agradecimentos

Aos estudantes de graduação Marcelo Dourado, Vanessa Malvar, Larissa Cozza, Felipe Carneiro, Thyago Cardin, Cintia Nicassia, Lara Brito e um obrigado especial para Paloma Meira pela valiosa ajuda no desenvolvimento dos trabalhos.

A minha enteada Daiara, minha sobrinha Agueda e seu esposo Claudio, o meu especial obrigado.

Aos meus irmãos Helma e Helder e minha cunhada Cida por ser parte do que eu sou e junto com meus pais configurarem meu porto seguro.

Ao Prof. Dr. Jorge Lopéz, pela amizade e grande colaboração.

Aos amigos Dr. Frederico Medeiros e Paulo Mesquita pelas análises por MEFS

Ao Prof. Fábio Oliveira da Universidade Federal do Recôncavo Bahiano, pelas análises estatísticas.

Aos Professores Doutores Jailson B. Andrade e Pedro Afonso, pelo acesso ao LPQ/IQ/UFBA para realização das análises por HS-MEFS-CGAR-EM

As colegas da turma de 2006 do doutorado em Biotecnologia UEFS/FIOCRUZ, principalmente a Lucymeire e Iraíldes.

A todos aqueles que sempre se puseram de prontidão para ajudar no que fosse necessário, os meus mais profundos agradecimentos.

Em ti, pois, confiam os que conhecem o teu nome, porque tu, Senhor, não desamparas os que te buscam. Salmo 9:10

RESUMO

Técnicas biotecnológicas têm se constituído em ferramentas para o estudo de plantas medicinais, bem como para a produção de biomassa. Em função disso, o objetivo deste estudo foi estabelecer protocolo de cultivo, micropropagação *in vitro* e avaliar o perfil dos compostos orgânicos voláteis (COV) em calos e em plantas micropropagadas de *Plectranthus ornatus*. A micropropagação foi conduzida a partir de segmentos nodais em meio Murashige e Skoog (MS), onde se observou o processo de ajuste de protocolo, micropropagação e aclimatização das plantas. Estudos referentes à indução de calos e morfogênese foram conduzidos em meio MS suplementado com auxinas e citocininas. Partes aéreas das plantas micropropagadas e calos cultivados *in vitro* foram analisados em relação ao conteúdo de COV por *headspace* e microextração em fase sólida associada à Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massas. A micropropagação mostrou ser um método adequado para a produção de COV em *P.ornatus*, apresentando um maior teor de COV quando comparado a planta matriz. Melhores resultados em relação à micropropagação nesta espécie foram registrados em meio MS acrescido de BAP, no qual as plantas apresentaram excelente desenvolvimento e uma ótima adaptação às condições *ex vitro*. Calos de *P. ornatus* apresentaram diferenças quanto ao aspecto, cor, consistência, e perfil dos compostos voláteis dependendo das concentrações dos reguladores adicionados ao meio nutritivo. Além disso, foi observado que existe uma relação direta entre a concentração do constituinte majoritário, acetato de α -terpinil e a de α -thujeno, α -pineno, β -pineno, canfeno, sabineno e α -limoneno, presentes no óleo essencial.

Palavras-chaves: *Plectranthus ornatus*. HS-MEFS/CGAR-EM. Cultivo *in vitro*. Compostos orgânicos voláteis.

ABSTRACT

Several biotechnology techniques have been new tools for the study of medicinal plants, as well as for the production of homogeneous and productive biomass. Accordingly, this study was to observe aspects of morphogenesis and callogenesis of *Plectranthus ornatus* and evaluate the volatile organic compounds (VOC) profile in micro propagated plants *in vitro* and in calli. The micropropagation of *P. ornatus* was conducted from nodal segments in nutritive Murashige and Skoog (MS) medium, where was noted the process adjustment, micropropagation and protocol acclimatization of plants. Studies relating to the induction of callus and morphogenesis were conducted through MS supplemented with auxins and cytokinins. Micro propagated parts and air plants grown *in vitro* callus were analyzed in relation to the volatile organic compounds content by micro extraction in solid phase attached to Gas Chromatography/High-resolution Mass Spectrometry. The Micropropagation proved a suitable method for volatile organic compounds production in *P. ornatus* showing a higher VOC content compared to the mother plant. The best results for micropropagation were recorded using MS medium plus BAP, in which the plants had excellent development and a great adaptation for *ex vitro* conditions. Callus of *P. ornatus* showed differences in the appearance, consistency, color, and volatile compounds profile depending on the concentrations of regulators added to nutritive media. Moreover, it was noted that there is a direct relationship between the major constituent concentration α -terpinyl acetate and α -thujene, α -pinene, β -pinene, canfene, sabinene e α -limonene, present in essential oil.

Keywords: *Plectranthus ornatus*. HS-SPME/GCPH-MS. In vitro cultivation. Volatile organic compounds.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	14
INTRODUÇÃO GERAL	14
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	18
2.2 TERPENÓIDES: PROPRIEDADES E POTENCIAL BIOLÓGICO	19
2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Plectranthus</i> (LAMIACEAE)	23
2.4 QUÍMICA DO GÊNERO <i>Plectranthus</i>	25
2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE <i>Plectranthus ornatus</i> CODD	25
2.6 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	27
2.6.1 REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL	28
2.7 ESTRATÉGIAS APLICADAS AO CULTIVO IN VITRO PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS	30
3. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DOS COV	31
3.1 TÉCNICA DE MEFS ASSOCIADA À CGAR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	31
4. OBJETIVO GERAL	34
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5. JUSTIFICATIVA	34
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 2	54
RESUMO	55
ABSTRACT	57
1. INTRODUCTION	58
REFERENCES	65
CAPÍTULO 3	67
RESUMO	69
1. INTRODUÇÃO	71
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
3. EXPERIMENTAL	78
3.1 MATERIAL VEGETAL	78
3.2 CALOGÊNESE	79
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS PRODUZIDOS PELO CULTIVO <i>in vitro</i>	80
3.3.1 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COV)	80
3.4 ANÁLISE MULTIVARIADA DO CONJUNTO DE DADOS	83
REFERÊNCIAS	84
ABSTRACT	93
1. INTRODUCTION	94
2. RESULTS AND DISCUSSION	95
3. EXPERIMENTAL	99
3.1 PLANT MATERIAL	99

3.2	<i>IN VITRO</i> PRODUCTION AND ESTABLISHMENT OF CALLUS TISSUES	99
3.3	CHARACTERIZATION OF METABOLITES PRODUCED IN CALLUS TISSUES	100
3.3.1	EXTRACTION OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS (VOC)	100
	REFERENCES	102
	CAPÍTULO 4	111
	RESUMO	113
1.	INTRODUÇÃO	115
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	116
2.1	MATERIAL VEGETAL	116
2.2	CULTIVO <i>IN VITRO</i>	117
2.3	EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS COV	117
2.4	ANÁLISES MULTIVARIADAS DO CONJUNTO DE DADOS	119
2.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	119
3.	RESULTADOS	120
	REFERÊNCIAS	128
	CAPÍTULO 5	139
1.	CONCLUSÃO GERAL	140
	ANEXOS	145

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais vias de produção dos metabólitos secundários	19
Figura 2: Via do fosfato 1-Deoxi-D-xilulose (via DXPS).....	21
Figura 3: Carbocátion precursor dos monoterpénos.....	22
Figura 4: Principais estruturas moleculares dos COV	22
Figura 5: Aspecto da espécie <i>Plectranthus ornatus</i> Codd.....	26
Figura 6: Microextrator (“holder”) e fibra utilizada na microextração em fase sólida	32
Figura 7 Uso do amostrador de MEFS para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para análise por CGAR-EM.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ACP: Análise de Componentes Principais

ANA: Ácido Naftalenoacético

BAP: benzilaminopurina

CG: Cromatografia Gasosa

CGAR: Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

CGAR-EM: Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de

CG-EM: Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

COV: Compostos Orgânicos Voláteis

CWX: Carbowax

CW-DVB: Carbowax-Divinilbenzeno

DMFS: Dispersão da Matriz em Fase Sólida

DXPS: 5-fosfato-1-deoxi-D-xilulose

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELL: Extração líquido-líquido

EFS: Extração em fase sólida

EM: Espectrometria de Massas

eV: elétron-volt

FS: fibra ótica de sílica fundida

FV: Fase Vapor

FV-MEFS: Fase vapor associada à MEFS

HS: Headspace

KIN: cinetina

MEFS: Microextração em Fase Sólida

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MS: meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG

NaOCl: Hipoclorito de sódio

PA: Poliacrilato

PDMS: Polidimetilsiloxano

PDMS-DVB: Polidimetilsiloxano-Divinilbenzeno

PMSF: Phenylmethyilsulphonyl Fluoride

PVP: Polivinilpirrolidona

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Nos últimos anos surgiu o interesse pela investigação, produção e consumo de plantas aromáticas e medicinais, abrindo um amplo e crescente campo de aplicação nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de perfumaria-cosmética. As plantas constituem uma fonte importante de substâncias biologicamente ativas, muitas das quais podem servir de modelos para a síntese de um grande número de fármacos, devido a sua diversidade estrutural e de propriedades físico-químicas e biológicas (WALL & WANI, 1996).

Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas, resultando no isolamento de substâncias com atividades biológicas que se consagraram como fármacos eficazes, a exemplo de morfina, quinina e cocaína (MONTANARI, 2001).

Metabólitos secundários de plantas são moléculas conhecidas pelo essencial papel na adaptação das plantas ao seu ambiente e contribuem para interatividade da planta com os diferentes ecossistemas (PERVAIZ, 2004; BOUGAUD *et al.*, 2001; AERTS *et al.*, 1991; HARBORNE, 1988). Essas moléculas representam uma importante fonte de compostos ativos farmacêuticos, pigmentos, fragrâncias, aditivos alimentícios, etc. Contudo, a produção de compostos fitoquímicos freqüentemente envolve a extração da planta viva, a qual necessita, muitas vezes, muito tempo para se desenvolver, e pode levar à extinção de espécies nativas.

Os metabólitos secundários aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas com este fim como, por exemplo, podem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos (fitoalexina), insetos, herbívoros, na inibição de outras espécies vegetais e também colaboram para reprodução vegetal por atraírem polinizadores. (HAMMERSCHMIDT, 2004; BEDNAREK, 2009).

Devido às amplas atividades biológicas dos metabólitos secundários de plantas, estes são utilizados de forma secular na medicina tradicional e nos dias atuais, são utilizados na indústria farmacêutica, de cosméticos e na química fina onde aproximadamente 25% das moléculas usadas são de origem natural (FUNKE & MELZIG, 2006; BIAVATTI *et al.*, 2007; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2007; SAÚDE-GUIMARÃES & FARIA, 2007; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2008; PAYNE *et al.*, 1991; RATES, 2001).

A despeito dos amplos avanços na química sintética, a produção de metabólitos secundários de plantas, vem sendo feita por cultivo das plantas medicinais no campo. Contudo, existem dificuldades em diversos níveis que limitam o seu uso. Por exemplo: plantas procedentes de biótipos específicos podem apresentar muitos problemas para crescer fora de seus habitat, algumas espécies não podem ser cultivadas em grande quantidade devido à sua susceptibilidade a patógenos (ex. *Fusarium oxysporum* em alecrim (*Rosmarinus officinalis*) ou manjeriço (*Ocimum basilicum*) (KRUPPA, 2008). Além disso, algumas espécies sintetizam os metabólitos secundários em concentrações muito baixas o que exige processos de extração dispendiosos e elaboração de formulações farmacêuticas complexas. Outras estão sob grave pressão antrópica, expostas a erosão genética e redução drástica de populações endêmicas o que dificulta a sua utilização em larga escala ou apresentam grande variabilidade genética e atividades fisiológicas, respondendo de modo muito diferente às condições ambientais vigentes, com alterações quanti e qualitativas nos metabólitos secundários o que dificulta a obtenção de droga padronizada (PASSINHO-SOARES *et al.*, 2006, CAVALLARI *et al.*, 2008).

Os processos biotecnológicos, utilizando técnicas *in vitro* rigorosamente controladas para o cultivo de células, tecidos e órgãos vegetais ou de plantas íntegras para a produção de compostos de interesse à sociedade, têm sido considerados como sistemas de alto potencial para a superação de muitos problemas encontrados na produção a campo da planta, como sazonalidade, variação ambiental, localização geográfica, ataque de pragas e instabilidade política.

Metodologias de culturas de células, tecidos e órgãos *in vitro* apresentam o potencial de superar os problemas supracitados apresentando-se como um recurso importante na produção de metabólitos secundários e, ainda, permitem a realização de estudos de síntese de

metabólitos secundários e de rendimento de produção destes compostos comparativamente ao sistema *ex vitro*, com a possibilidade de produção controlada de acordo com a demanda, contribuindo para a redução dos custos de produção, ou mesmo viabilizando a produção de novas substâncias bioativas.

Desta forma, a produção de metabólitos *in vitro*, proporciona como vantagens a padronização das condições físicas de cultivo, suprimindo vários fatores que colaboram para alteração na produção de metabólitos secundários, tais como, sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação solar, composição nutricional e poluição atmosférica etc. (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Assim, a manipulação das culturas com o intuito de aprimorar a produção de metabólitos, bem como, a propagação de genótipos selecionados de forma homogênea e com maior qualidade e controle da produção torna-se uma alternativa (BOURGAUD, 2001; COLLIN, 2001; VERPOORTE, *et al.*, 2002; RAO & RAVISHANKAR, 2002; DEBNATH, 2006; KOLEWE *et al.*, 2008).

Portanto, entendendo-se que é importante verificar nos produtos de origem vegetal com finalidade terapêutica, as especificações adequadas de qualidade para garantir eficácia e segurança. Neste aspecto, verifica-se que a biossíntese de metabólitos especiais, e conseqüentemente, dos princípios ativos em plantas medicinais e aromáticas depende de fatores genéticos, fisiológicos e ambientais. Considerando que a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006) tem como objetivo “Garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”, este trabalho visou o uso de diferentes estratégias, usando sistemas de cultura *in vitro*, com o objetivo de aprimorar a produção de compostos voláteis em *Plectranthus ornatus* Codd., com padronização das condições físicas de cultivo, de modo a obter uma matéria prima de qualidade, visto que a qualidade de plantas medicinais esta relacionada ao seu teor de princípios ativos.

Essa tese encontra-se dividida em cinco capítulos. O primeiro compreende a introdução geral e revisão do tema. O segundo capítulo aborda o protocolo de estabelecimento e micropropagação *in vitro* da espécie *Plectranthus ornatus* Codd. O terceiro aborda sobre o

perfil dos compostos orgânicos voláteis (COV) obtidos pelo cultivo *in vitro* de calos. O quarto e quinto capítulos fazem uma abordagem sobre o perfil dos COV sob a influência de reguladores de crescimento vegetal e uma abordagem sobre o efeito de reguladores na distribuição de tricomas foliares, bem como, conclusões gerais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos especiais apresentam diversidade química estrutural, alta variação intraespecífica e são produzidos em quantidade restrita conforme as condições ambientais, nutricionais e físicas do habitat (HARTMANN, 1996; BOURGAUD *et al.*, 2001; WAHID *et al.*, 2007; HARTMANN, 2007).

O isolamento dos metabólitos especiais tem guiado muitos estudos químicos e farmacológicos na busca de substâncias biologicamente ativas com potencial para uso terapêutico (BALANDRIN *et al.*, 1985; VERPOORTE *et al.*, 1999; SUDHA & RAVISHANKAR, 2002) e são usualmente classificados de acordo com a sua rota biossintética (DEWICK, 2002). A Figura 1 mostra as vias de produção que iniciam com acetil coenzima A (acetyl-CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e 1-deoxixilulose 5-fosfato, que produzem vários grupos de metabólitos secundários, tais como, os compostos fenólicos, terpenóides, esteróides e os alcalóides (DEWICK, 2002).

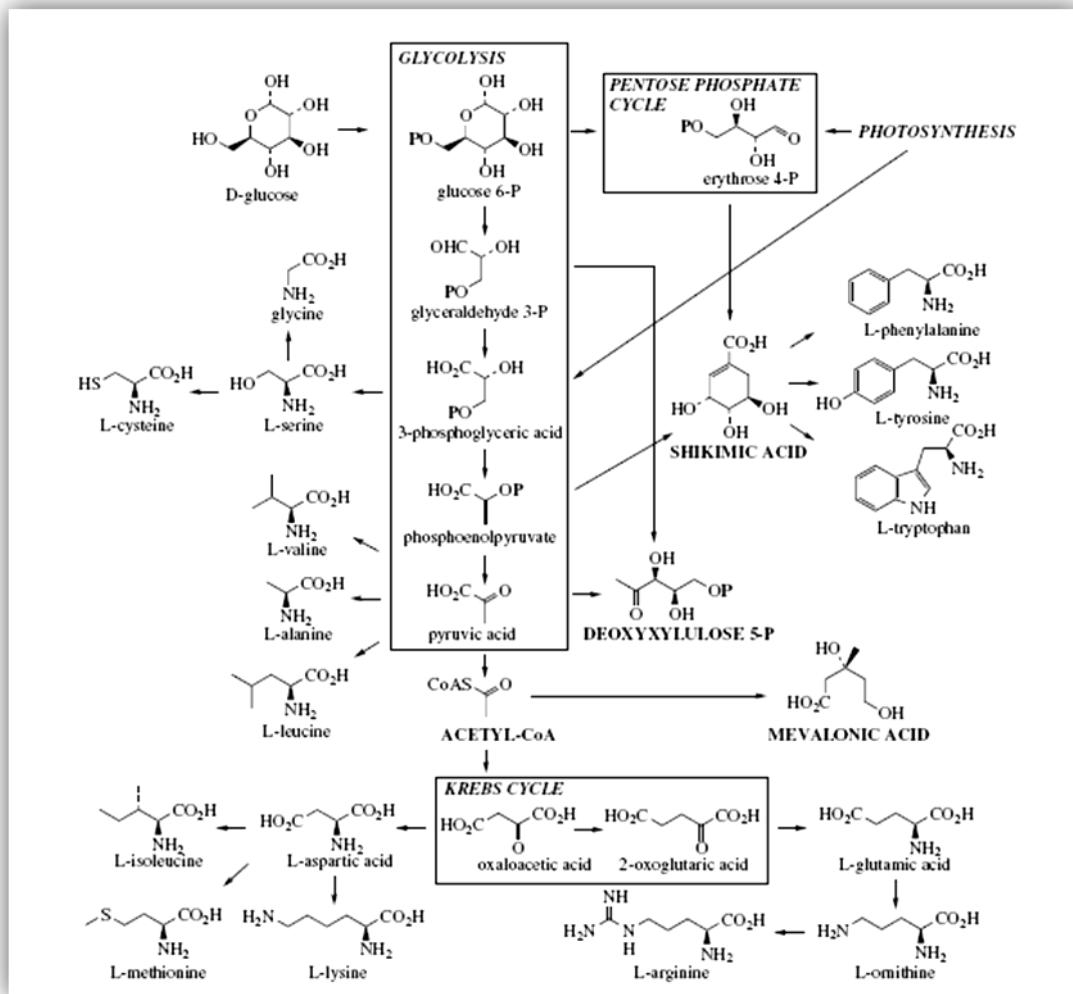


Figura 1: Principais vias de produção dos metabólitos secundários

Fonte: DEWICK, 2002

2.2 TERPENÓIDES: PROPRIEDADES E POTENCIAL BIOLÓGICO

Existem vários registros do uso de substâncias aromáticas em cultos religiosos, na medicina tradicional e como odorante. O conhecimento sobre os compostos orgânicos voláteis (COV) de plantas data desde antes da era Cristã. As referências históricas de obtenção desses COV estão vinculadas, originalmente, aos países orientais, destacando-se o Egito, Grécia e a Pérsia que utilizavam bálsamos em cerimônias religiosas. Os egípcios utilizavam óleos essenciais em massagens para embelezar e proteger a pele do clima árido, na alimentação, medicina, perfumaria e em cerimonial de embalsamento dos corpos, mostrando que conheciam suas propriedades antisépticas. Estes conhecimentos foram difundidos para os antigos gregos e

destes para os romanos, que eram ótimos perfumistas. As civilizações judaicas e cristãs também se utilizavam destas preparações que estão bastante registradas nas Escrituras Sagradas (KALA *et al.*, 2006; THOMPSON, 2003; DUKE, 2008).

Sem dúvida, os óleos essenciais encontram sua maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos (EBRAHIMI, 2008). Esta capacidade, presente na maioria destes compostos, de certa maneira representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos. Entre muitas outras atividades biológicas específicas descritas para os óleos essenciais, são dignas de citação as atividades inibidoras do crescimento de células neoplásicas (SIANI *et al.*, 1999; SAENS *et al.*, 1996), de alguns tipos de vírus, incluindo *Herpes simplex* tipo 1 (SIDDIQUI *et al.*, 1996), influenza e HIV (HAYASHI *et al.*, 1995) e ações sobre o SNC, destacando-se suas atividades sedativa, ansiolítica, antinociceptiva, anticonvulsivante, pró-convulsivante e alucinógena (PASSOS *et al.*, 2009).

Seguindo um modelo comparável ao papel dos terpenóides nas plantas, a pesquisa dos óleos essenciais como agentes repelentes de insetos vem revelando o potencial destes compostos nesta área. Dessa forma, vêm sendo realizados com sucesso alguns testes biológicos de repelência aos insetos vetores de doenças, como por exemplo, os mosquitos do gênero *Aedes* (VIEGAS JR.C., 2003).

Os principais constituintes dos COV são os monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅) e diterpenos (C₂₀). Estes terpenóides compõem a grande variedade de substâncias cuja origem biossintética deriva da combinação de duas unidades isoprênicas. De acordo com DEWICK (2002) a maioria dos terpenóides é formada nos cloroplastos pela via do 5-fosfato-1-Deoxi-D-Xilulose (Via DXPS) (Figura 2), e as enzimas monoterpeno ciclases produzem monoterpenos cíclicos (monocíclicos e bicíclicos) através de um mecanismo de múltiplas etapas que envolvem um intermediário universal, o cátion mentil/ α -terpinil o qual pode ser transformado em diversos compostos classificados como pinanos, fenchanos, boranos, tujanos e caranos de acordo com seu esqueleto molecular (Figuras 2 e 3).

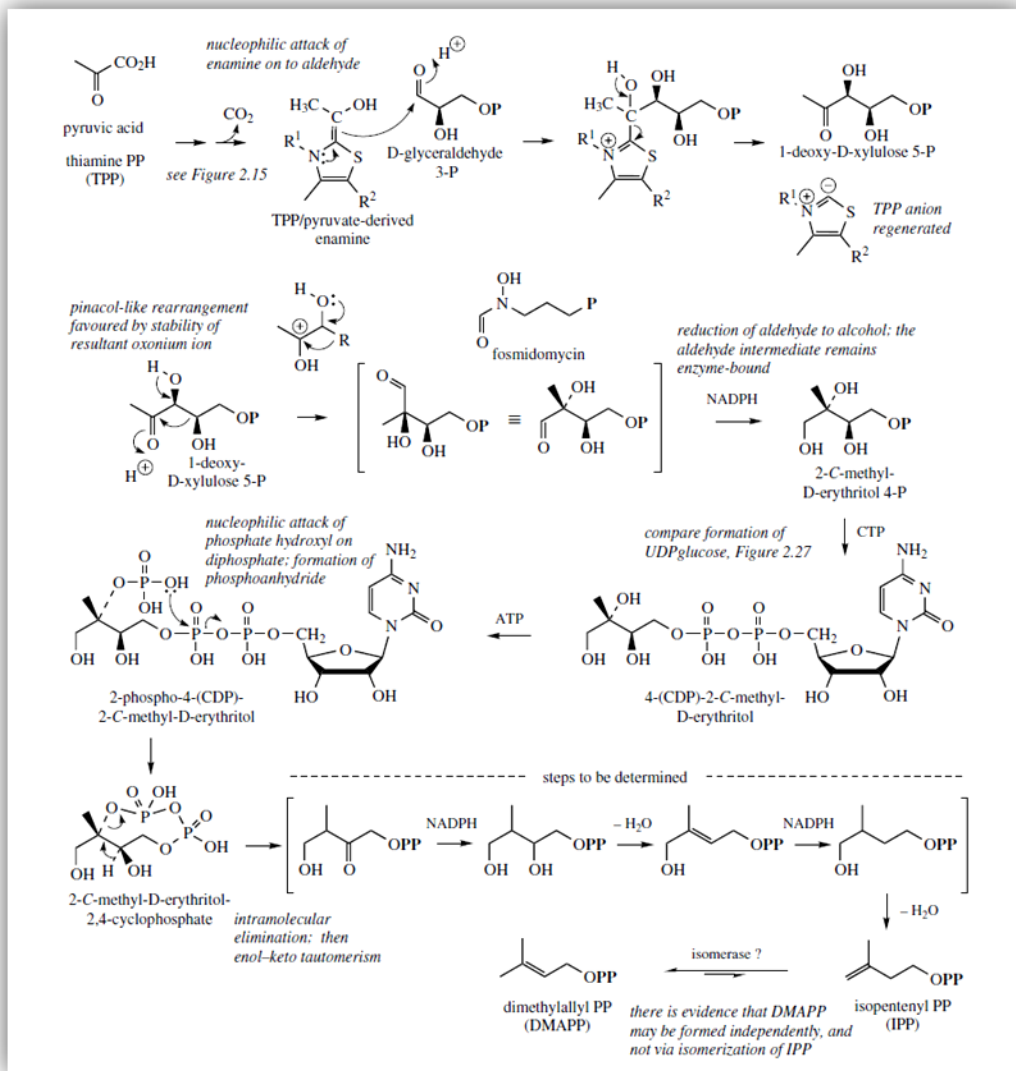


Figura 2: Via do fosfato 1-Deoxi-D-xilulose (via DXPS)

Fonte: DEWICK, 2002

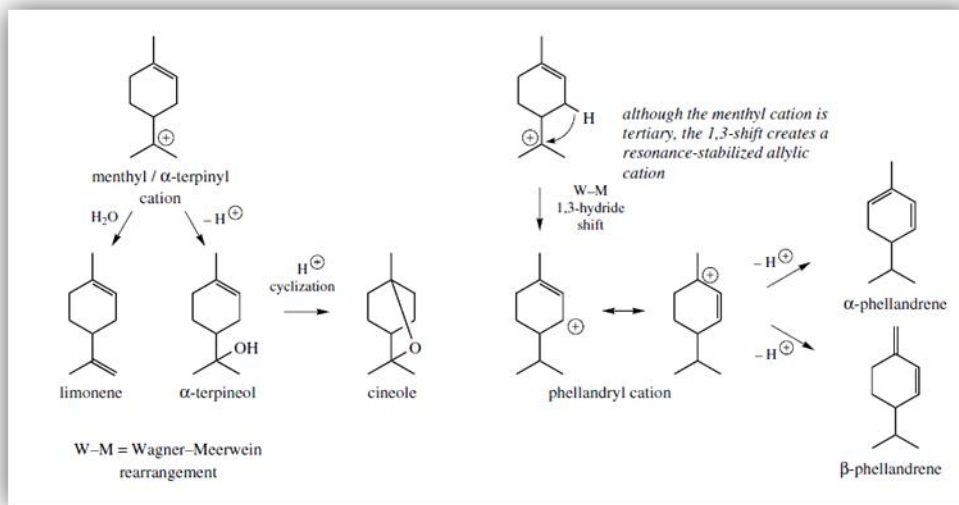


Figura 3: Carbocátion precursor dos monoterpens

Fonte: DEWICK, 2002

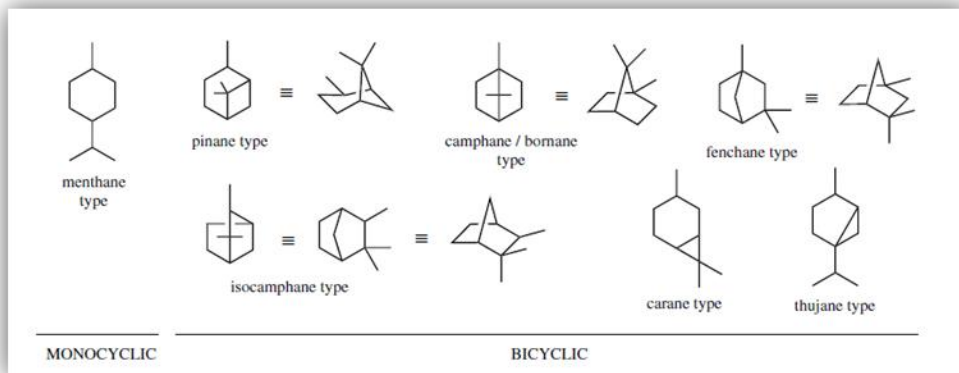


Figura 4: Principais estruturas moleculares dos COV

Fonte: DEWICK, 2002

Os COV são abundantes em Angiospermas dicotiledôneas, tais como nas famílias Lamiaceae, Asteraceae, Myrtaceae dentre outras. De acordo com a família a que pertencem, as diversas espécies de plantas acumulam esses elementos voláteis em órgão anatômicos específicos.

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Plectranthus* (LAMIACEAE)

O gênero *Plectranthus* L. Her. caracterizado por apresentar estrutura herbácea, muito aromática, perene, pertence à família Lamiaceae, sub-família Nepetoidea, possui cerca de 300 espécies com inumeráveis híbridos e uma diversidade de utilizações etnobotânicas. Essas espécies encontram-se distribuídas por regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Austrália e Ilhas do Pacífico (LUKHOBÁ, 2006).

Cerca de 60 espécies de *Plectranthus* são citadas por sua importância econômica por serem fontes de óleos essenciais aromáticos, sendo também cultivados como plantas ornamentais, comestíveis, condimentares e medicinais. Algumas espécies de *Plectranthus* possuem alto potencial químico com aplicação fitoterápica sendo identificados alguns metabólitos secundários com provável atividade hipotensora, antioxidante, antiinflamatória, anti-tímica e atividades anti-fungos (LUKHOBÁ *et al.*, 2006). A Tabela 1 mostra algumas espécies desse gênero com estudo farmacológico para diversos fins terapêuticos.

P. barbatus constitui uma das plantas mais citadas em levantamentos etnobotânicos de plantas medicinais, para a quais muitos estudos visando detectar ações farmacológicas foram desenvolvidos. Todavia faltam informações sobre riscos à saúde, decorrentes do uso prolongado de doses repetidas de preparados à base dessa espécie (LUKHOBÁ *et al.*, 2006).

No Brasil, as espécies medicinais do gênero *Plectranthus* (*P. amboinicus*, *P. barbatus*, *P. grandis*, *P. ornatus*) são citadas em levantamentos etnobotânico sobre plantas medicinais (MATOS, 2002) e são conhecidas popularmente como boldo, boldo-de-jardim, boldo-do-Brasil, boldo-nacional, falso-boldo, malva amarga, malva-santa, sete-dores, dentre outras sinônimas, devido ao sabor amargo similar ao verdadeiro boldo ou boldo-do Chile (*Peumus boldus* Molina). São utilizadas na medicina popular como antidispéptica, anti-reumática, carminativa, colagoga, colerética, estomáquica, hiposecretora gástrica, hipotensora, tônica, analgésica, dentre outras indicações (CÂMARA, 2003; CÂMARA, 1998; SHULTZE, 2005, FISCHMAN, 1991).

Espécies	Farmacologia	Referências
<i>P. amboinicus</i>	Antiinflamatório, Antineoplásico Antiepiléptico	GURGEL <i>et al.</i> 2009; JIA-MING <i>et al.</i> , 2010 BUZNEGO E PÉREZ, 1999
<i>P. punctatus</i>	Antifungico Anti-helmíntico	MURTHY, 2009 TADESSE <i>et al.</i> , 2009
<i>P. elegans</i>	Antibacteriano	DELLAR <i>et al.</i> , 1996; WELLSOW <i>et al.</i> , 2006
<i>P. ernstii</i>	Antibacteriano	STAVRI <i>et al.</i> , 2009
<i>P. japonicus</i>	Antifungico	MATHPAL <i>et al.</i> , 2002
<i>P. cylindraceus.</i>	Antimicrobiano	MARWAH <i>et al.</i> , 2007
<i>P. saccatus</i>	Antibacteriano	WELLSOW <i>et al.</i> , 2006
<i>P. nummularius</i>	Antioxidante	NARUKAWA <i>et al.</i> , 2001
<i>P. hadiensis</i>	Antiplasmodio	VAN ZYL <i>et al.</i> , 2008
<i>P. ecklonii</i>	Antiplasmodio	VAN ZYL <i>et al.</i> , 2008
<i>P. purpuratus</i>	Antiplasmodio	VAN ZYL <i>et al.</i> , 2008
<i>P. sylvestris</i>	Antioxidante	JUCH E RUEDI, 1997
<i>P. forskholii</i>	Antioxidante	LAKSHMANAN <i>et al.</i> , 2007
<i>P. lucidus.</i>	Antiplasmodio	VAN ZYL <i>et al.</i> , 2008
<i>P. hereroensis</i>	Antimicrobiano Antiacetilcolinesteras e	BATISTA <i>et al.</i> , 1995 FALÉ <i>et al.</i> , 2009
<i>P. barbatus</i>	Antiinflamatório, Antifúngico, Antibacteriano	MATU AND VAN STADEN, 2003
<i>Andr.</i>	Antioxidante	FALÉ <i>et al.</i> , 2009; TAMASIRO <i>et al.</i> , 1998
	Antiespasmódico	CAMARA <i>et al.</i> , 2003
	Citotóxico	COSTA & NASCIMENTO, 2003
<i>P. grandis</i>	Analgésico	PASSINHO <i>et al.</i> 1999
<i>Cramer</i>	Antioxidante	ALBUQUERQUE, 2007;

Tabela 1- Atividade farmacológica de espécies de *Plectranthus*

2.4 QUÍMICA DO GÊNERO *Plectranthus*

Os terpenóides são considerados os principais responsáveis pelas atividades citotóxicas, genotóxica, antifúngica, antimicrobiana dos *Plectranthus*. Esses COV têm também valor junto a diversas sociedades que os usam por suas propriedades terapêuticas muitas delas já comprovadas. Diversos estudos sobre a composição química do óleo essencial do gênero *Plectranthus* demonstram que espécies desse gênero são ricos em monoterpenos e sesquiterpenos (LUKHOBÁ *et al.*, 2006; ABDEL-MOGIB *et al.*, 2002; CASTILLO & GONZÁLEZ, 1999).

Estudos fitoquímicos em algumas espécies de *Plectranthus* revelaram a presença de grande número de diterpenos do tipo abietano, filocladano, kaurano, clerodanos e labdanos, triterpenoides lupano, aristolano e sesquiterpeno como cariofileneno, aromadendrano e flavonóides (ABDEL-MOGIB *et al.*, 2002; GASPAR-MARQUES *et al.*, 2004, 2005, 2006).

2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE *Plectranthus ornatus* CODD.

A espécie *Plectranthus ornatus* Codd tem demonstrado ser uma rica fonte de diterpenos, particularmente das classes abietano, labdano e neoclerodano. No Brasil esta erva perene e suculenta, de aroma agradável (Figura 5) comumente usada como planta ornamental nos jardins brasileiros, é conhecida como “boldo-miudo”, “boldo-gambá” e “boldo-de-jardim”. As folhas de *P. ornatus* são utilizadas no tratamento de problemas hepáticos e estomacais, como alternativa ao *Plectranthus barbatus* (falso-boldo), também utilizado para o mesmo fim terapêutico.



Figura 5: Aspecto da espécie *Plectranthus ornatus* Codd

Estudos preliminares sobre metabólitos secundários em *Plectranthus ornatus* Codd. revelam o isolamento de diterpenos dos tipos labdano e clerodano (OLIVEIRA *et al.*, 2005; RIJO *et al.*, 2005).

RIJO *et al.* (2002) reportam o isolamento de três diterpenóides, semelhantes à forskolina, em folhas de *P. ornatus*, sendo que dois dos constituintes apresentam atividade antifúngica e antibacteriana junto a espécies de *Candida* e colônia de bactérias Gram positivas e Gram negativas. ALBURQUERQUE *et al.* (2007), relatam a atividade antioxidante e composição química do óleo essencial de folhas de *Plectranthus grandis* e *Plectranthus ornatus* cultivadas no nordeste do Brasil e detectaram a presença de β -cariofileno, eugenol, germacreno D e timol como compostos majoritários em *Plectranthus ornatus*.

Novos diterpenóide com valor significativo para quimiotaxonomia e biogenética foram isolados de *Plectranthus ornatus* Codd e *Plectranthus grandidentatus* Gürke por RIJO *et al* (2007).

2.6 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

A biossíntese de metabólitos secundários *in natura* apresenta larga variação segundo as condições ambientais. Através do emprego da tecnologia de cultura de tecidos vegetal é possível obter plantas seletas, isentas de patógenos e seus produtos químicos sob condições físicas apropriadas e estandardizadas (GIACOMETTI, 1990). Esta técnica é bastante empregada com a finalidade de manipular a produção de metabólitos secundários. A obtenção rápida de plantas *in vitro* em comparação ao desenvolvimento *in natura* é muito expressiva. No âmbito da preservação do meio ambiente, o cultivo *in vitro* evita a exploração indiscriminada e demasiada dos recursos naturais (PETROVICK *et al.*, 1997; CALIXTO, 2000; LIMA *et al.*, 2001; PLETSCHE, 1998). Os sistemas *in vitro* têm sido utilizados também, para estudos sobre fisiologia e fitoquímica; avaliando o desenvolvimento vegetal, inclusive a produção de metabólitos especiais (VERPOORTE *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2001). Através da propagação *in vitro*, obtêm-se plantas selecionadas e geneticamente manipuladas, sendo estes aspectos de grande importância comercial (ZHANG & LEMAUX, 2004).

A regeneração de plantas *in vitro* baseia-se no fundamento da totipotência, que consiste no potencial que cada célula tem para originar uma planta completa. Esta teoria foi proposta por Mathias Schleiden e Theodor Schwann em 1838. Posteriormente, o fisiólogo vegetal HABERLANDT (1902) manipulou pela primeira vez um sistema de cultura de plantas *in vitro* (CID, 2001).

Em geral, o sistema de cultura *in vitro* é provido de baixa intensidade luminosa obtida por iluminação artificial, ambiente asséptico, umidade elevada e suplementos orgânicos e inorgânicos que participam do desenvolvimento vegetal e contribuem para um crescimento com características heterotróficas (HAZARIKA, 2006). Os meios de cultura são constituídos de sais minerais, vitaminas e carboidratos, dentre os quais se destaca, a sacarose como fonte de carbono mais utilizada.

O desenvolvimento das culturas é influenciado pelo tipo de meio nutritivo e suplementos a ele adicionados, bem como pelas condições físicas de cultivo, genótipo e condições fisiológicas dos explantes (KHAWAR *et al.*, 2004).

Com base em estudos fisiológicos e genéticos, o processo de organogênese *in vitro* é dividida em três fases distintas, com requerimento diferenciado de reguladores de crescimento vegetal exógeno:

1º - Desdiferenciação do tecido vegetal e aquisição de competência organogênica para proliferação e formação de raízes e parte aérea;

2º - As células desdiferenciadas, então, adquirem determinação para formar um órgão vegetal específico;

3º - Diferenciação e morfogênese vegetal,

O uso de reguladores de crescimento vegetal depende do tipo de cultura que se pretende obter, e atua como fator que interfere tanto no desenvolvimento vegetal quanto na produção de metabólitos secundários (SUGIYAMA, 1999).

2.6 1 Reguladores de crescimento vegetal

O uso de reguladores vegetais no meio de cultura é primordial para aprimorar as culturas *in vitro*, aumentando a produção clonal e modificando a morfogênese, diferenciação vegetal, além da produção de metabólitos químicos. Estes conhecimentos sobre a fisiologia vegetal são utilizados na manipulação de concentrações e combinações hormonais apropriadas para a obtenção de meios nutritivos, estabelecimento da cultura de tecidos e produção *in vitro* de metabólitos secundários.

A adição de reguladores de crescimento vegetal pode ser indispensável para o estabelecimento das culturas de algumas espécies vegetais, bem como para o aprimoramento do desenvolvimento vegetal *in vitro* quanto ao número de brotações, enraizamento e alongamento das plantas (GASPAR *et al.*, 1996).

A ação dos reguladores do crescimento vegetal depende da sensibilidade da célula ao hormônio e do número de receptores com afinidade para o hormônio (BARENDSE & PEETERS, 1995).

As interações entre as diferentes classes de hormônios vegetais regulam o crescimento, desenvolvimento, diferenciação e crescimento celular vegetal (HOBBIE *et al.*, 1994; GASPAR *et al.*, 1996; KYOZUKA, 2007).

As auxinas e citocininas são os reguladores de crescimento dos vegetais mais utilizados em sistemas de cultivo *in vitro*. As auxinas estão envolvidas no alongamento celular, iniciação de raízes e brotos, diferenciação dos tecidos vasculares e mecanismos como o fototropismo e gravitropismo (HOBBIE *et al.*, 1994; CLAUSSEN *et al.*, 1996; KIMURA & KAGAWA, 2006; BOUTTÉ *et al.*, 2007; KELLY & RIECHERS, 2007).

As principais auxinas são o ácido indolacético (AIA), o ácido indolbutírico (AIB), ácido abscísico (ABA), Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido naftalenoacético (ANA).

As auxinas AIA e AIB são as mais utilizadas em cultura de tecidos (LUDWIG-MULLER, 2007). As citocininas derivam de unidades de isopreno, sintetizadas pela via do ácido mevalônico ou são derivadas da adenina, como a zeatina (Zea), cinetina (KIN) e benzilaminopurina (BAP) (MOK & MOK, 2001; BARCISZEWSKI *et al.*, 2007). As citocininas sintéticas são da classe das feniluréias, como o tidiazuron (TDZ), e são caracterizadas pela elevada estabilidade que se traduz numa eficiente resposta em cultura de tecidos (MOK & MOK, 2001).

As citocininas são essenciais na divisão celular vegetal, indução e proliferação de brotações, além de participarem de vários processos como fotomorfogênese, fotossíntese, formação e manutenção dos cloroplastos, floração e senescência (HOBBIE *et al.*, 1994; KAMINEK *et al.*, 1997, ZAHIR *et al.*, 2001; HOWELL *et al.*, 2003; CARIMI *et al.*, 2004; BARCISZEWSKI *et al.*, 2007; KYOZUKA, 2007).

O uso de estimuladores, como os hormônios vegetais, na cultura *in vitro* têm-se mostrado recurso promissor no aumento de alguns metabólitos especiais (PALAZÓN *et al.*, 1995; EILERT *et al.*, 1995).

2.7 ESTRATÉGIAS APLICADAS AO CULTIVO *IN VITRO* PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM PLANTAS

Na produção de metabólitos *in vitro* diversas estratégias são utilizadas como o uso de precursores que participam da via metabólica da substância de interesse, de reguladores de crescimento vegetal e de elicitores. Outra estratégia que pode ser utilizada compreende a alteração da composição do meio de cultura, tais como nitrogênio, sais minerais e fonte de carbono (COLLIN, 2001; RAO & RAVISHANKAR, 2002; ZHAO *et al.* 2005; DICOSMOS, 1995; MATKOWSKI, 2008, VEERPORTE & MEMELINK, 2002), DEBNATH, 2006).

Neste aspecto, componentes do óleo essencial de plantas de *Lavandula dentata* (Lamiaceae), cultivadas *in vitro*, variaram conforme a concentração de hormônios vegetais acrescida ao meio (SUDRIÁ *et al.*, 1999).

Entre os metabólitos de alto valor e interesse medicinal produzidos através da cultura de tecidos vegetais, pode-se destacar a vinblastina (*Catharanthus roseus*), o ácido rosmarínico (*Salvia officinalis*), taxol (*Taxus* sp.) e chiconina (*Lithospermum erythorhizon*) (DATTA & SRIVASTAVA, 1997; RAO & RAVISHANKAR, 2002; KARAM, 2003, JAZIRI *et al.*, 2006, COLLIN, 2001).

Apesar de cultura de células ser o meio mais empregado por apresentar a vantagem de viabilizar a produção em larga escala através de biorreatores, (BALANDRIN *et al.*, 1985; CID, 1998), vários trabalhos apontam os órgãos vegetais ou planta inteira como produtores mais estáveis (BOURGAUD *et al.*, 2001; RAO & RAVISHANKAR, 2002).

Estudos mais elaborados, relacionados à engenharia de metabólitos especiais, têm utilizado a cultura de células e experimentado o uso de técnicas genéticas para modificar a expressão de genes relacionados à produção destes metabólitos (BOURGAUD *et al.*, 2001; VERPOORTE & MEMELINK, 2002; TANAKA & OHMIYA, 2008).As principais vantagens da produção de metabólitos vegetais *in vitro* são a independência de fatores ambientais, o aumento do controle da produção, o uso de linhagens celulares que garanta uma qualidade consistente do produto, a viabilização econômica de produtos oriundos de espécies de difícil cultivo e a utilização de elicitores ou indutores no direcionamento da produção (AYAKO *et al.*, 2004).

3 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DOS COV

A maioria dos métodos clássicos de extração é baseada em tecnologias desenvolvidas no século XIX, e embora envolvam aparelhagem simples, são relativamente demorados para serem utilizadas como técnicas de rotina além de serem difíceis de automatizar, bem como fazer a interface com os sistemas cromatográficos. Além disso, requererem grandes quantidades de solventes e encontram-se na contramão dos anseios relativos à preservação do meio ambiente (JAMES, 1997). O uso de técnicas cromatográficas associado a métodos de preparação de amostras sem o uso de solventes orgânicos, além de diminuir a manipulação e o tempo de análise, evita o descarte de substâncias químicas.

Na atualidade, as técnicas de extração que envolve a utilização de solventes (DI MUCCIO, 1996; SALAS, 2003; MIYAHARA, 1994) apresentam-se com inúmeras desvantagens e geralmente estão em desacordo com os preceitos da química limpa, ou seja, menor gasto possível de solventes orgânicos que geralmente são tóxicos, inflamáveis, nocivos ao meio ambiente e ao analista. Ressalta-se ainda que estes solventes sejam caros devido à alta pureza necessária para evitar a presença de contaminantes os quais podem ser concentrados no extrato e conseqüentemente causarem interferências na análise.

Dentro deste contexto, optou-se pela utilização de técnicas de extração que não utilizasse solventes orgânicos e que pudesse ser associada à cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas.

3.1 TÉCNICA DE MEFS ASSOCIADA À CGAR ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A microextração em fase sólida (MEFS) é uma microtécnica, em que os processos de extração e pré-concentração de analitos ocorrem numa escala dimensional. Foi desenvolvida em 1990 (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990), e utilizada inicialmente em amostras líquidas, em virtude das vantagens obtidas em relação às técnicas extração líquido-líquido (ELL), extração em fase

sólida (EFS) e a dispersão da matriz em fase sólida (DMFS), entre outras. Além disso, a interseção com a cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR), acoplada à espectrometria de massas (EM), demonstrou ser um recurso poderoso para identificar, quantificar e monitorar a presença de compostos orgânicos voláteis nos mais diversos tipos de matrizes complexas (EICEMAN, 2002; SANTOS, 2002). Isto porque os compostos eluídos são identificados pelo espectro de massas e pelo tempo de retenção (PINTO, 1994), os quais são regidos por parâmetros intrínsecos tipo polaridade e massa molar entre outros, podendo-se, assim, avaliar o perfil das matrizes objeto do estudo.

O dispositivo básico de MEFS, representado na Figura 6, consiste de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida (FS) de 100 μm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade recoberto com um filme fino de um polímero (e.g., polidimetilsiloxano = PDMS, poliacrilato = PA ou Carbowax = CWX) ou de um sólido adsorvente (e.g., carvão ativo microparticulado = arboxen).

O princípio da técnica é a distribuição do analito entre a amostra e um micro componente extrator, que consiste de um material sorvente que recobre uma fibra ótica de sílica fundida.

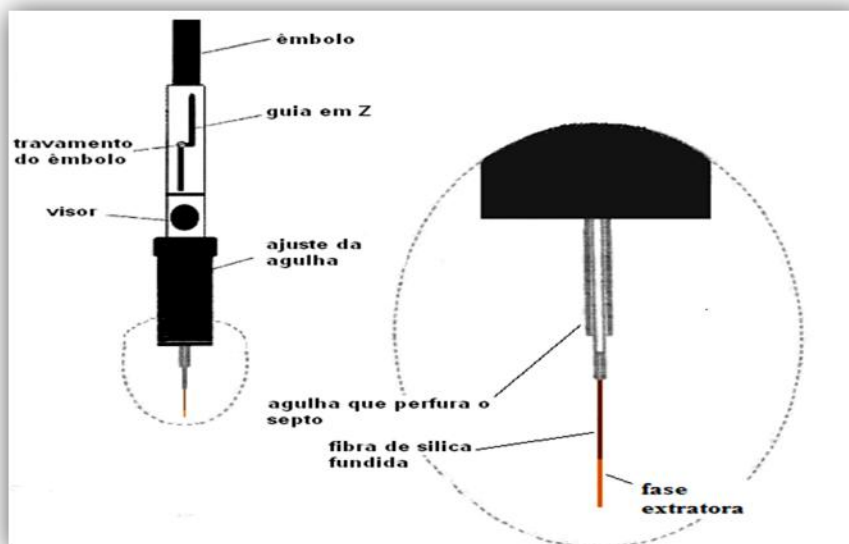


Figura 6: Microextrator (“holder”) e fibra utilizada na microextração em fase sólida

Fonte: RODRIGUES, 2007

Os fundamentos teóricos da microextração em fase sólida (Figura 7) baseiam-se no deslocamento do analito a partir da matriz lacrada em um recipiente fechado, até o recobrimento da fibra. Envolve o rompimento das resistências às transferências de massa e o estabelecimento do equilíbrio de partição ou sorção do analito, entre a fibra e o meio que a envolve (conforme o tipo de recobrimento usado na fibra).

As técnicas de extração FV-MEFS associada à CGAR-EM, tem sido aplicado com sucesso a uma grande variedade de compostos, especialmente para extração de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis em amostras complexas ambientais, biológicas e de origem alimentar (HAMM *et al.*, 2005; GAZIM *et al.*, 2005; GOTSIOU, *et al.*, 2002 YONG & WENYI, 2005). Tem a vantagem de não exigir a etapa de limpeza da amostra em virtude da possibilidade de uso de fibras extratoras de natureza seletiva.

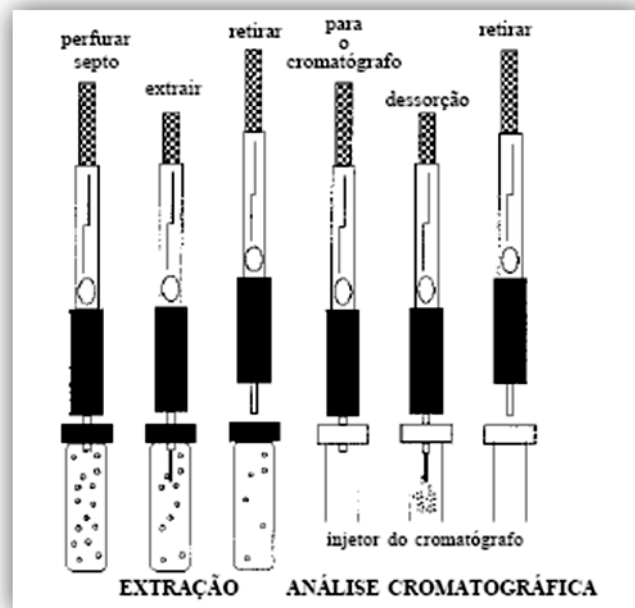


Figura 7 Uso do amostrador de MEFS para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para análise por CGAR-EM.

Fonte: VALENTE & AUGUSTO, 2000

A cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas, devido a sua grande versatilidade, alto poder de resolução, eficiência e detectividade é uma das técnicas mais utilizadas em amostras complexas desta natureza.

A determinação de constituintes químicos em amostras complexas e em baixas concentrações, consideradas traços, exige o uso de técnicas analíticas capazes de separar, identificar e quantificar quantidades cada vez menores de analitos com alto grau de precisão e exatidão.

4 OBJETIVO GERAL

Este projeto visa definir a expressão do metabolismo especial traduzido em compostos orgânicos voláteis, das culturas *in vitro* de *Plectranthus ornatus* Codd.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer protocolo de regeneração e cultivo *in vitro* de tecidos e órgãos;
- Utilizar estratégias de cultivo *in vitro* para aumentar a produção de metabólitos de interesse;
- Observar a variação do perfil químico dos compostos orgânicos voláteis;
- Realizar extração e identificar os compostos orgânicos voláteis de *Plectranthus ornatus* Codd sob diferentes condições de cultivo *in vitro*;
- Realizar estudos anatômicos e morfológicos das plântulas, sob diferentes condições de cultivo *in vitro*.

5 JUSTIFICATIVA

Por meio do sistema de produção *in vitro*, podem-se obter matrizes uniformes, com fidelidade genética, isentas de patógenos, em larga escala, em pequeno espaço físico e curto período de tempo, de forma economicamente viável e atendendo às exigências das entidades certificadoras e às necessidades dos produtores por mudas de qualidade. De forma a

viabilizar, em bases científicas, a prática da medicina alternativa requer garantias da qualidade e constante produtividade dos princípios ativos, e isto pode ser feito pela cultura de tecidos vegetais, sob condições controladas (VERPOORTE *et al.*, 1999.). Além disso, a padronização dos fatores ambientais no cultivo em sala de cultura garante constância na obtenção dos metabólitos a cada subcultivo.

Em vista disto, este trabalho visa o estabelecimento de um protocolo para a produção de *P. ornatus in vitro* sob a influência de reguladores de crescimento vegetal, bem como a avaliação dos COV por meio de HS-MEFS associada a CG/EM.

Destaca-se que, os compostos orgânicos voláteis são metabólitos especiais importantes na fitoquímica de espécies do gênero *Plectranthus* e por isso foram selecionados neste estudo.

REFERENCIAS

ABDEL-MOGIB, M., ALBAR, H.A., BATTERJEE, S.M. *Chemistry of the genus Plectranthus*. *Molecules* 2002.v.7, p.271-301.

AERTS R. ; SNOEIJER W, VAN DER MEIJDEN E. , VERPOORTE R. *Allelopathic inhibition of seed germination by Cinchona alkaloids?* *Phytochemistry*. 1991.v.30,p. 2947-2951.

ALBURQUERQUE, R. L. de; SILVA, M. G. de V. *et al. Chemical composition and antioxidant activity of Plectranthus grandis and P. ornatus essential oils from North-eastern Brazil*. *Flavour and Fragrance Journal*, 2007.v.22, p.24-26.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J.; *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. *Anal. Chem.* 1990.v.62, p.2145.

AYAKO, Ogata; AYAKO Tsuruga *et al. Elicitor-induced rosmarinic acid biosynthesis in Lithospermum erythrorhizon cell suspension cultures: Activities of rosmarinic acid synthase and the final two cytochrome P450-catalyzed Hydroxylations*. *Plant Biotechnology* 2004.v.21, n.5, p.393 396.

BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A. *et al. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials*. *Science*, 1985.v.228(4704), p.1154-1160.

BARBOSA-FILHO J. M, ALENCAR A. A.; NUNES X. P., *et al.* 2008. *Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review*. *Rev Bras Farmacogn* ,v.18, p.135-154.

BARBOSA-FILHO José M.; NASCIMENTO-JÚNIOR Fernando A. *et al.* *Natural products with antileprotic activity*. Rev Bras Farmacogn. 2007. v.17, p.141-148.

BARCISZEWSKI, J.; MASSINO, F.; CLARK, B.F.C. *Kinetin – a multiactive molecule. Biological*. Macromolecules, , 2007.v.40, p.182-192.

BARENDSE, G. W. M. & PEETERS, T. J. M. *Multiple hormonal control in plants*. Acta Botanica Neerlandica, 1995. v.44, n.1, p.3-17.

BATISTA, O.;; SIMÕES, M.F.; DUARTE, A.*et al.* *Antimicrobial abietane from the roots of Plectranthus hereroensis*, Phytochemistry 1995. v.38, p. 167–169.

BEDNAREK, Pawe; OSBOURN, Anne. *Plant-microbe interactions: Chemical diversity in plant defense*. Science 2009.v.324:746-747.

BHAGWATH, S. G.; HJORTSO, M. A. *Statistical Analysis of elicitation strategies for thiarubrine A production in hairy root cultures of Ambrosia artemisiifolia*. Journal of Biotechnology, 2000. v.80, p.159-167.

BIAVATTI, Maique W.; MARENSI, Vanessa *et al.* *Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest*. Rev Bras Farmacogn. 2007;v.17, p.640-653.

BOURGAUD, F. GRAVOT, A. MILESI, S. GONTIER, E.*Production of plant secondary metabolites: a historical perspective*. Plant Science, 2001.v.161, p. 839-851.

BOUTTÉ, Y.; IKEDA, Y.; GREBE, M. *Mechanisms of auxin-dependent cell and tissue polarity*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007.v.10, p.616-623.

BRASIL. *Decreto nº. 5.813. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*. Diário Oficial da União ; 22 jun. 2006.

BROWN, D.C.W.; THORPE, T.A. *Plant regeneration by organogenesis*. In: VASIL, I.K.; CONSTABEL, F.;SCHELL, J.; BOGORAD, L. *Cell culture and somatic cell genetics of plants: plant regeneration and genetic variability*, Orlando: Academic Press. 1986. v.3, p.49-61. ISBN: 0127150013.

BUZNEGO MT, PEREZ-SAAD H *Antiepileptic effect of Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng. (french marjoram)*. *Rev Neurol* 1999.v.29: 388-389

CALIXTO, João B.. *Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic Agents)*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. , 2000. v.33, n.2, p.179-189.

CÂMARA, C.C., *Estudos farmacológicos e metabólicos do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de Plectranthus barbatus Benth. (malva-santa)*. , 1998. (Dissertação de Mestrado em Farmacologia) Fortaleza: UFC, CCS, DFF.

CÂMARA, C.C., NASCIMENTO, N.R., MACÊDO-FILHO, C.L.,*et al: Antipasmotic effect of the essential oil of Plectranthus barbatus and some major constituents on the guinea-pig ileum*. - *Planta Med*. 2003.69: 1080-1085.

CARIMI, F.; TERZI, M. *et al.* *High levels of the cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence.* Plant Science, 2004..v.166, p.963-969.

CAVALLARI, Marcelo M. *Variabilidade genética e química entre e dentro de populações de Casearia sylvestris Sw. (Salicaceae) no Estado de São Paulo.* 2008.128f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, SP.

COSTA, M. DO C.; NASCIMENTO, S. C.. *Atividade citotóxica de Plectranthus barbatus Andr.(Lamiaceae).* Revista Acta Farmacêutica . Bonaerense. 2003.v.22 (2): 155-158.

CID, I.P.B. *A propagação in vitro de plantas: o que é isso?* Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, v.19, p.16-21, 2001.

CLAUSSEN, M.; LUTHEN, H. e BOTTGER, M. *Inside or outside? Localization of the receptor relevant to auxin-induced growth.* Physiologia Plantarum, 1996.v.98, p.861-867.

COLLIN, H.A. *Secondary product formation in plant tissue cultures.* Plant Growth Regulation, 2001. v.34:119-134.

DEBNATH, M.; MALIK C.P, BISEN, Prakash S. *Micropropagation: A tool for the production of high quality plant-based medicines.* Current Pharmaceutical Biotechnology 2006.v.7 (1), p.33-49,

DELLAR, Joanne E; COLE, Michael D; WATERMAN, Peter G. *Antimicrobial abietane diterpenoids from Plectranthus elegans.* Phytochemistry. 1996.v.41, p.735-738.

DEWICK, Paul. M.: *The Mevalonate And Deoxyxylulose Phosphate Pathways: Terpenoids And Steroids In: Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons, Ltd 2^a edition , Chichester ,West Sussex, England, 2002. 507p.

DICOSMO, F. AND MISAWA,M. *Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures*. Trends Biotechnol. .1985.v. 3, 318–322

DI MUCCIO, A.; PELOSI, P. *et al.* A. Selective solid-matrix dispersion extraction of organophosphate pesticide residue from milk. *Journal of Chromatography A*, v.754, p.497, 1996.

DUKE, James A., *Duke's handbook of medicinal plants of the Bible*. 2008. by Taylor & Francis Group, LLC.528p.

EBRAHIMI, S. N.; HADIAN, J. *et al.* Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chemistry* .v.110, p.927–931, 2008.

EICEMAN, G.A.; GARDEA-TORRESDEY, J. *et al.* Gas chromatography. *Analytical Chemistry*, v.74, p.2771, 2002.

EICEMAN, G.A.; GARDEA-TORRESDEY, J.; Dorman, F. Gas Chromatography. *Analytical Chemistry*, v.74, p.2771, 2002.

FALÉ,P.; BORGES,C.; MADEIRA,P.J.A.; ASCENSÃO L.; ARAÚJO, M.E.M.; FLORÊNCIO, M.H. *et al.*, Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and

antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* (“Falso Boldo”), *Food Chemistry* 114 , pp. 798–805,2009.

FISCHMAN, L.A., SKORUPA, L.A., SOUCCAR, C., LAPA, A.J., The water extract of *Coleus barbatus* Benth decreases gastric secretion in rats. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86 (Supl 02), 141-3, 1991.

FUNKE Ingrid, MELZIG Matthias F. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. *Rev Bras Farmacogn* v.16, p. 1-5, 2006.

GASPAR, T.; KEVERS, C. *et. al.* Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell and Developmental Biology*, v.32:272-289, 1996.

GASPAR-MARQUES, Cristina; SIMÕES, Maria de Fatima; RODRÍGUEZ, Benjamin. Further labdane and kaurane diterpenoids and other constituents from *Plectranthus fruticosus*. *J. Nat. Prod.* v.67, p.614-621, 2004.

GASPAR-MARQUES, Cristina; RIJO, Patricia *et al.* Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. *Phytomedicine*, v.13, p.267-271, 2006.

GASPAR-MARQUES, Cristina; SIMÕES, Maria de Fátima; RODRÍGUEZ, Benjamin. A trihomoabietane diterpenoid from *Plectranthus grandidentatus* and an unusual addition of acetone to the ortho-quinone system of cryptotanshinone. *J. Nat. Prod.* v.68, p.1408-1411, 2005.

GAZIM, Z.C, REZENDE, C. M. *et. al.* Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* v.44, n.3, jul./set., 2008.

GIACOMETTI, D.C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 19-28.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v.30(2),p. 374-381, 2007.

GOTSIU, P.; NAXAKIS, G.; SKOULA, M. Diversity in the composition of monoterpenoids of *Origanum microphyllum* (Labiatae). *Biochemical Systematics and Ecology* v.30, p.865–879, 2002.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. 1. ed. Brasília: Embrapa-SP/Embrapa-CNPH, 1999. v.2, 1999. p.533-568. ISBN 85-7383-048-4.

GURGEL A.P.A.D., SILVA J.G. DA, GRANGEIRO A.R.S., OLIVEIRA D.C., Lima, Cynthia M.P., Silva, Aldo C.P. da, Oliveira, Rinalda A.G. and Souza, Ivone A. *In vivo* study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae).. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 125(2), Pages 361-3637 September 2009,

HAMM, S., BLETON, J. *et. al.* A chemical investigation by headspace SPME and GC–MS of volatile and semi-volatile terpenes in various olibanum samples. *Phytochemistry* v.66 p.1499–1514, 2005.

HAMMERSCHMIDT, R. Secondary metabolites and resistance: More evidence for a classical defense. *Physiological and Molecular Plant Pathology* v.65,p.169-170, 2004.

HARBORNE J.B. *Introduction to Ecological Biochemistry*. London: Academic Press. 1988.

HARTMANN, Thomas. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.80, p.177-1888, 1996.

HARTMANN, Thomas. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, v.68, p.2831–2846, 2007.

HAYASHI, K.; KAMIYA, M.; HAYASHI, T. Virucidal effects of the steam distillate *Houttynia Cordata* and its components on HSV-1, Influenza V virus and HIV. *Planta Medica* v.61, p.237-241, 1994.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, v.108, n.2, p.105-120, 2006.

HOBBIE, L., TIMPTE, C., ESTELLE, M. Molecular genetics of auxin and cytokinin. *Plant Molecular. Biology*, v.26, p.1499-1519, 1994.

HOWELL, S. H., LALL, S. e CHE, P. Cytokinins and shoot development. *Trends in Plant Science*, v.8, p.453-459, 2003.

JAMES, K.J.; STACK, M.A. Rapid determination of volatile organic compounds in environmentally hazardous wastewaters using Solid Phase Microextraction. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v.358, p.833, 1997.

JIA-MING CHANG, CHUN-MING CHENG, LE-MEI HUNG, YUH-SHAN CHUNG, AND REY-YUH WU, "Potential Use of *Plectranthus amboinicus* in the Treatment of Rheumatoid Arthritis," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 7, no. 1, pp. 115-120, 2010. doi:10.1093/ecam/nem168

JUCH M, RUEDI P 1997. Isolation, structure, and biological activities of long-chain catechols of *Plectranthus sylvestris* (Labiatae). *Helv Chim Acta* 80: 436-448

JUDD W.S, CAMPBELL CS. *et al. Plant systematics - a phylogenetic approach*. Sunderland: Sinauer.1999.

KALA, Chandra.Prakash.; DHYANI, Pitamber P.; SAJWAN, Bikram.S. Developing the medicinal plants sector in northern India: challenges and opportunities. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v.2(32), p.1-15, 2006.

KAMÍNEK, M; MOTYKA, V. E VANKOVÁ, R. Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiol. Plantarum*, v.101, p.689-700, 1997.

KELLY, K.B. & RIECHERS, D.E. Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxinic herbicide research. *Pesticide Biochem. and Physiol.*, v.89, p.1-11, 2007.

KHAWAR, K.M.; SANCAK, C. *et. al.* Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis. *Turkey Journal of Botany*, v.28, p.421-426, 2004.

KIMURA, M e KAGAWA, T. Phototropin and light-signaling in phototropism. *Current Opinion in Plant Biology*, v.9, n.5, p.503-508, 2006.

KOLEWE Martin E; GAURAV Vishal ; ROBERTS, Susan C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Mol Pharm* v.5, p.243–256, 2008.

KRUPPA, Pedro. C.; RUSSOMANNO, Olga. M.R. Ocorrência de fungos em sementes de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da família Lamiaceae. *Tropical Plant Pathology* v.33(1), p.72-75, Jan-Feb, 2008.

KYOZUKA, J. Control of shoot and root meristems function by cytokinin. *Current Opinion in Plant Biology*, v.10, p.442-446, 2007.

LAKSHMANAN, ALAGU, G.M.; C., JALEEL, ABDUL; R. GOMATHINAYAGAM, MUTHIAH, Panneerselvam. Changes in antioxidant potential and sink organ dry matter with pigment accumulation induced by hexaconazole in *Plectranthus forskholii* Briq. *Comptes Rendus Biologies.*, 330: 814-820, 2007.

LIMA Sharon. S.; ESQUIBEL Maria. Aparecida. *et al.* Cultura monoclonal de erva de bicho (*Polygonum acre* H. B. K. var. *aquatile*) para produção de um fitoterápico em escala comercial. *Rev. Bras. de Plant. Medic.l Botucatu.* v.4, n.1, p.51-55, 2001.

LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid synthesis in ecotypes and mutants of *Arabidopsis thaliana* under different growth conditions. *Journal of Plant Physiol.*, v.164, n.1, p.47-59, 2007.

LUKHOBBA, Catherine W.; SIMMONDS, Monique S.J.; PATON, Alan J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *J. of Ethnopharmacol* v.103, p.1–24, 2006.

MARWAH, R.G.; FATOPE, M.O.; DEADMAN, M.L.; OCHEI, J.E.; AL-SAID, S.H. Antimicrobial activity and the major components of the essential oil of *Plectranthus cylindraceus*. *Journal of Applied Microbiology* 103 1220–1226, 2007.

MATHPAL D, MATHPAL R, SHAH GC, GUPTA RC. Essential oil constituents and antifungal activity of *Plectranthus japonicus* K. *Asian J Chem* 14: 1044-1046, 2002.

MATKOWSKI, A., Plant in vitro culture for the production of antioxidants — *A review*. *Biotechnology Advances* v.26, p.548–560, 2008.

MATOS, Francisco José A. Plantas Medicinais - guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil, Impr. Universitária / Edições UFC, Fortaleza, p. 344, 2002.

MATU EN, VAN STADEN J. Antibacterial and antiinflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *J Ethnopharmacol* v.87,p. 35-41, 2003.

MIYAHARA, M.; OKADA, Y. *et al.* Multiresidue procedures for the determination of pesticides in food using capillary gas chromatographic, flame photometric and mass spectrometric techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.42, p.2795, 1994.

MOK, D.W.S. e MOK, M.C. Cytokinin metabolism and action. *Annual Review Plant Physiol. and Plant Molecular Biology*, v.52, p.89-118, 2001.

MONTANARI, Carlos.Alberto; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Quim. Nova*, v. 24, n.1, p.105-111, 2001.

MURTHY,PUSHPA S.; RAMALAKSHMI, K.; SRINIVAS, P. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food Chemistry* 114 (2009) 1014–1018.

NARUKAWA Y, SHIMIZU N, SHIMOTOHNO K, TAKEDA T 2001. Two new diterpenoids from *Plectranthus nummularius*. *Briq. Chem Pharm Bull* 49: 1182-1184.

OKSMAN-CALDENTY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, v.9, n.9, p.433-40, 2004.

OLIVEIRA, P.M., FERREIRA, A.A. *et al.* Diterpenoids from the aerial parts of *Plectranthus ornatus*. *J. Nat. Prod.* v.68, p.588-591, 2005.

PASSINHO, Helna C.R.; MAIA, Carla S.; PEREIRA, Nuno A.; KAPLAN, Maria A.. *Estudo da Atividade Analgésica do “chá” de boldo (Plectranthus grandis Cramer) Lamiaceae*. In: V

Encontro Mineiro de Plantas Medicinais, Juiz de Fora, Minas Gerais, Livro de resumos. Editora da UFJF, p.1999, 1999.

PASSINHO-SOARES, Helna., FELIX Durvalina *et al.* Authentication of medicinal plant botanical identity by amplified fragmented length polymorphism dominant DNA marker: inferences from the *Plectranthus* genus. *Planta Med.* v.72(10), p.929-31, 2006.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; *et al.* Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) *Rev Bras Farmacogn* v.19(1A), p.140-149, Jan./Mar. 2009.

PAWLISZYN, J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, New York: Willey-VHC, 1997.

PALAZON J, ALTABELLA T, CUSIDÓ RM, RIBÓ M, PIÑOL MT. 1995. Growth and tropane alkaloid production in *Agrobacterium* transformed roots and derived callus of *Datura*. *Biologia Plantarum* 37, 161-168.

PETROVICK, P.R., ORTEGA, G. G. e BASSANI, V.L. From a medicinal plant to a hydroalcoholic dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. *Natural Products Research in Brazil*. v.49, n.5/6, p.364-368, 1997.

PINTO Angelo.C.; SIMONI, M.L.P.S.C.; *et al.* Misturas naturais de esteróides, uma alternativa para aplicação de padrões em análises por cromatografia gasosa de alta resolução. *Química Nova*, 17, 333, 1994.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. *Revista Biotec.Ciência & Desenv.* v.1, n4, p.12-15, 1998.

RAO, Shikaripura Ranganatha. e RAVISHANKAR, Gokare.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v.20, p.101-153, 2002.

RATES, Stela Maris Kuze. Plants as source of drug. *Toxicon*, v.39, p.603-613, 2001.

RIJO, Patrícia., SIMÕES; Maria de Fátima; RODRÍGUEZ, Benjamin. Structural and spectral assignment of three forskolin-like diterpenoids from *Plectranthus ornatus*. *Magn. Reson. Chem.* v.43, p.595-598, 2005.

RIJO, Patrícia; GASPAR-MARQUES, Cristina *et al.* Further diterpenoids from *Plectranthus ornatus* and *P. grandidentatus*. *Biochemical Systematics and Ecology* v.35, p.215-221, 2007.

RIJO, Patrícia; GASPAR-MARQUES, Cristina *et al.* Neoclerodane and labdane diterpenoids from *Plectranthus ornatus*. *J. Nat. Prod.* v.65, p.1387-1390, 2002.

RODRIGUES, F. DE M., Análise de compostos orgânicos voláteis contidos na fase vapor por meio da microextração em fase sólida, associada à cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. Tese (doutorado) Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. 2007.

SAENS, M.T.; GARCIA, M.D.; de la PUERTA, R., Cytostatic activity of some essential oils against HEP-2 cells. *Il Farmaco*, Rome, v. 51, n. 7, p. 539-540, Jul.1996.

SALAS, J.H.; GONZÁLEZ, M.M. *et al.* Organophosphorus pesticide residues in Mexican commercial pasteurized milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.4468, 2003.

SANTOS F.J.; GALCERAN M.T. The application of gas chromatography to environmental analysis. *Trends in Analytical chemistry*, v.21, n.9-10, p.672, 2002.

SAÚDE-GUIMARÃES DA, FARIA AR. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Farmacogn.*, v.17, p.455-465, 2007.

SIANI, Antônio.Carlos .; RAMOS, M.F.S.; *et. al.* Evaluation Of Antiinflammatory-Related Activity Of Essential Oils From The Leaves And Resin Of Species Of *Protium*. *J. Ethnopharm.* v.66, p.57-69, 1999.

STAVRI, MICHAEL ; PATON, ALAN ; SKELTON, BRIAN W; GIBBONS, SIMON. Antibacterial diterpenes from *Plectranthus ernstii*. *Journal of natural products*. 2009 Jun;72(6): 1191-4.

SUDHA, G. e RAVISHANKAR, G.A. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.71, p.181-212, 2002.

SUDRIÁ, C.; PINOL, M. T.; PALAZÓN, J. *et al.* Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentate* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.58, p.177-184, 1999.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. *Current Opinion in Plant Biology*, v.2, n.1, p.61-64, 1999.

TADESSE,DEREJE; EGUALE,TADESSE; GIDAY, MIRUTSE; MUSSA, ABIY. Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Maesa lanceolata* and *Plectranthus punctatus* against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology* 122 240–244, 2009.

TAMASIRO, V., DAVINO, S.C., FREITAS, P.C.D., BARROS, S.B.M., In vitro antioxidant activity of *Coleus barbatus* (Andr.) Benth (false boldo) and *Peumus boldo* (Molina) (Boldo do Chile): a comparative study. In: *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v. 34,p. 15-17, 1998.

THOMPSON, S. Spiritual practice and essential oil therapy: exploring the history and individual preferences among specific plant sources. *International Journal of Aromatherapy*, v.13(23), p.108-113, 2003.

VALENTE, A.L.P., AUGUSTO, F., Microextração por Fase Sólida. *Química Nova*, v.23, n.4, p.523-530, 2000.

VAN ZYL, F. KHAN, T. EDWARDS AND S. DREWES, Antiplasmodial activity of abietane diterpenes isolated from five southern African *Plectranthus* species, *South African Journal of Science* 104, pp. 62–64, 2008.

VERPOORTE, Robert; MEMELINK, Johan. Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, p.181-187, 2002.

VIEGAS J.R.,C., Terpenos Com Atividade Inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova*, v. 26, n. 3, 390-400, 2003.

WAHID, Abdul; GELANI, Sadia *et al.* Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, v.61(3), p.199-223, 2007.

WALL, Monroe.E; WANI, Mansukh.C. Camptothecin And Taxol; From Discovery To Clinic. *J. Ethnopharmacol.*, v.51 p.239-254, 1996.

WELLSOW, R.J. GRAYER, N.C. VEITCH, T. KOKUBUN, R. LELLI, G.C. KITE AND M.S.J. SIMMONDS, Insect-antifeedant and antibacterial activity of diterpenoids from species of *Plectranthus*, *Phytochemistry* **67** (2006), pp. 181'8–1825.

WHITAKER, R.J; HASHIMOTO,T. Production of secondary metabolites, In: Handbook of plant cell culture (Evans, D.A., Sharp, WR & Ammirato, P.V.,eds) vol.4 MacMillan Publishing Company, New York, pp.264-286, 1986.

YONG, Y.; WENYI, T., Head-Space Solid Phase Micro-extraction Followed by GC/MS Analysis of the Volatile Components in Seeds of *Cinnamomum camphora*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* v.1, n.3, p.173-175, 2005.

ZHAIR, Z.A.; ASGHAR, H.N. e ARSHAD, M. Cytokinin and its precursors for improving growth and yield of rice. *Soil Biology & Biochemistry*, v.33, p.405-408, 2001.

ZHANG, S. & LEMAUX, P.G. Molecular analysis of *in vitro* shoot organogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.23, n.4, p.325-335, 2004.

ZHAO, J.; DAVIS, L.C, VERPOORTE, R., Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* v.23, p. 283–333, 2005.

ZHAO, J.; ZHU, W.H.; HU, Q. e HE, X.W. Enhanced indole alkaloid production in suspension compact callus clusters of *Catharanthus roseus*: impacts of plant growth regulators and sucrose. *Plant Growth Regulation*, v.33, p.33-41, 2001.

Capítulo 2

Establishment in vitro of garden Boldo (*Plectranthus ornatus*, Lamiaceae)¹

¹ Artigo submetido à Revista Biologia Plantarum

RESUMO

O estudo da micropropagação de espécies utilizadas na medicina popular tem sido intensificado nos últimos anos, devido ao crescente investimento em pesquisas para a descoberta de novos fármacos. O presente trabalho teve por objetivo promover o estabelecimento *in vitro* de *Plectranthus ornatus* Codd. Após desinfestação em câmara asséptica os explantes com cerca de 1.5 cm de comprimento foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e diferentes combinações entre 6-Benzilaminopurina (4,5 μ M; 9 μ M; 18 μ M) e ácido naftalenoacético (0; 5,37 μ M; 10,08 μ M; 21,48 μ M). As culturas foram mantidas em sala de crescimento, a temperatura de 25 \pm 3°C, sob fotoperíodo de 16 horas. Após 60 dias da inoculação, foram avaliadas as seguintes variáveis: presença de calos no ápice e na base do explante, número de raiz, número de brotos e número de folhas. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos sobre a formação de calos na base do explante. Com relação a calogênese no ápice do explante, houve interação significativa entre os tratamentos utilizados. Foram observadas interações entre os tratamentos para as variáveis enraizamento, número de brotos por explante e número de folhas por broto.

Establishment *in vitro* of garden Boldo (*Plectranthus ornatus*, Lamiaceae)

Helna C. Passinho-Soares^{1,2}, Jorge M. David^{1,3}, José R. F. de Santana^{1,4}, Paloma R. Meira², Juceni P. David^{1, 2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, PPGBIOTEC-UEFS, Caixa Postal 252-294, CEP 44031-460, Feira de Santana, Bahia, Brazil

²Faculdade de Farmácia, ³Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, 40170-280, Salvador, Bahia, Brazil

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44031-460, Feira de Santana (BA), Brazil

Correspondence

Prof. Dr. Juceni P. David

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal da Bahia

40170-280, Salvador, BA

Brazil

Phone: +55-71-3235-9350

Fax: +55-71-3235-5166

juceni@ufba.br

ABSTRACT

The *in vitro* establishment of *Plectranthus ornatus* Codd was performed using explants of about 1.5 cm in length that were inoculated individually in test tubes containing 10 mL of MSO medium supplemented with 3% sucrose, 0.7% agar and different combinations of 6-benzylaminopurine (0, 4.5, 9 and 18 μ M) and naphthaleneacetic acid (0, 5.37, 10.08 and 21.48 μ M). The cultures were grown at a temperature of 25 ± 3 °C with a photoperiod of 16 hours. Sixty days after inoculation, the presence of callus at the apex and the base of the explants, the number of roots, the number of shoots and the number of leaves were evaluated. No significant differences in the formation of callus at the base of explants were observed between the treatments. However, with respect to callus genesis at the apex of the callus explants, there was significant correlation between treatments. Correlations between treatments were observed for the following variables: rooting, number of shoots per explant and number of leaves per shoot. Rooted plantlets transferred to pots containing a mixture of autoclaved soil, sand and vermiculite (2:1:1) had a 96 % survival rate when transferred outdoors.

Key words

Plectranthus ornatus, Lamiaceae; organogenesis, plant growth regulators

Abbreviations

MSO: Murashige & Skoog Basal Medium

BAP: 6-benzylaminopurine

NAA: Naphthaleneacetic acid

1 INTRODUCTION

The genus *Plectranthus* L., belonging to the family Lamiaceae, subfamily Nepetoideae, has about 300 species and numerous hybrids. These species are distributed in tropical and subtropical regions of Asia, Africa, Australia and the Pacific Islands. Some species of *Plectranthus* have economic importance because they are sources of aromatic essential oils. They are also cultivated as ornamental plants and grown for food, condiment and medicinal uses. In Brazil, the medicinal species of the genus *Plectranthus* are employed as ethnobotanical medicinal plants and they are popularly known as "boldo", "boldo-de-jardim-do-Brasil" and "falso-boldo", among others. These species are utilized in folk medicine as anti-dyspeptics, carminatives, tonics, hypotensives, analgesics and anti-rheumatics (Lukhoba *et al.* 2006, Câmara *et al.* 2003).

Plectranthus ornatus Codd. (syn. *Coleus comosus* Hochst. Ex Gürke) is a species rich in forskolin-like diterpenes and, according to ethnopharmacological information, is used both as a substitute for *P. barbatus* Andr., for treatment of stomach and liver diseases as well as for its analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and diuretic properties (Oliveira *et al.* 2005, Rijo *et al.* 2005).

The safety and efficacy of many medicinal plants must be scientifically proved, which establishes them as beneficial, therapeutic and essential to human health (Calixto 2000). However, the use of different species is limited by factors such as biosynthesis of metabolites in very low concentrations, genetic variability, quantitative and qualitative changes of the metabolites, and anthropogenic pressure. Thus, the use of biotechnology techniques in plants, such as micropropagation and cell and tissue culture can solve or minimize some of these problems. These techniques are also used to propagate medicinal plants with secondary metabolites that are relevant for therapeutic purposes (Debnath *et al.* 2006). Plant growth regulators exert their action by the recognition of specific receptors, which are present in responsive cells, resulting in hormonal signals and biochemical and physiological events. Auxins and cytokinins are plant growth regulators utilized in most plant tissue culture.

This paper reports the *in vitro* establishment of *Plectranthus ornatus* Codd., noting the influence of the balance between the plant growth regulators BAP and NAA. We show that in *P. ornatus* Codd., callus genesis and the formation of shoots and roots is influenced by the equilibrium between the plant growth regulators BAP and NAA (Table 1).

Explants were obtained from nodal and internodal segments excised from young shoots of *P. ornatus* Codd. plant parents, which were 6 months old and kept in garden. The herborized material was deposited in the Herbarium of the Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, under the number R196538. The explants were disinfested by washing the leaves in running water for 60 minutes. Then, in a laminar flow chamber, the leaves were immersed in ethanol 70% (v/v) for 1 minute followed by sodium hypochlorite (2.0% of active chlorine) plus 3 drops of neutral detergent for 15 minutes. Then the segments were washed three times in sterile distilled water.

The 1.5 cm long explants were individually inoculated in test tubes containing 10 mL of MS medium (Murashige and Skoog 1962), supplemented with 3% sucrose, 0.6% agar and different combinations of BAP (0, 4.5, 9.0, and 18.0 μM) and NAA (0, 5.37, 10.08 and 21.48 μM). The pH of the culture medium was adjusted to 5.7 ± 0.1 , using KOH or 0.1 N HCl, before autoclaving. The cultures were kept in a growth room at 25 ± 3 °C with a photoperiod of 16 hours, 60% relative humidity and $30 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation. Sixty days after inoculation, the explants were evaluated for the presence of callus at the apex and base, the number of shoots and the number of leaves. The experimental design employed was completely randomized in a 3x4 (BAP x NAA) factorial arrangement with 4 replicates *per* treatment, each replicate consisting of 10 tubes. The rooted shoots were planted in disposable cups containing a 2:1:1 mixture of autoclaved soil, sand and vermiculite. The plants were incubated in growth chambers at 25 ± 2 °C and 100 % humidity. The humidity was gradually eliminated after 10 d, by which time the plants had produced one pair of new leaves. After 3 weeks, the plants were transferred to a garden soil mixture and maintained in a greenhouse.

The data were statistically analyzed by an analysis of variance test, evaluating the average by a Tukey test. Percentages were transformed into the arcsine $\sqrt{\%}$ and the counting numbers on $\sqrt{x+1}$. Data were analyzed using the SISVAR program, v 4.3, developed by UFLA (Ferreira, 2008).

No significant differences between the treatments on callus formation at the explant base were observed. We obtained up to 100% callus formation in explants in the presence of 9.0 μM or 18.0 μM BAP and no NAA, indicating that the addition of auxin is not necessary for the induction of callus at the base of *P. ornatus* explants. The formation of callus can be attributed to the action of endogenous auxin accumulated on the cutting edge of the baseline, which stimulates cell proliferation, especially in media enriched with cytokinin (Marks and Simpson 1994). Similarly, the formation of callus at the base of explants has been reported in media supplemented with cytokinins (Saini and Jaiswal 2000). It was suggested that the formation of basal callus from nodal explants on media containing cytokinin is common in species with strong apical dominance (Preece *et al.* 1991). These results differ from those of Dhar and Joshi (2005), in which the presence of auxin in combination with cytokinin was found to be essential for the formation of callus. However, often callus formation is induced in explants cultured in medium containing auxin or with a high ration of cytokinin/auxin (Litz and Jarret 1991).

However was significant interaction between the treatments with respect to callus genesis at the apex of explants. For the apical callus genesis, there was no difference observed between different concentrations of NAA. However, in media without or with 5.4 μM NAA, the best results were obtained using 9.0 μM BAP. Results differed notably with 18.0 μM BAP, indicating that the auxin/cytokinin equilibrium *pro*-auxin is advantageous to the formation of callus at the apex of *P. ornatus* explants.

Interactions for the variables, number of shoots *per* explant and number of leaves *per* shoot were observed between treatments. Averages of 0.9 to 2.0 shoots of *P. ornatus* were obtained in these treatments. The highest averages for shoots and leaves were obtained in media supplemented with 9.0 μM BAP in the absence or presence of 5.4 μM NAA.

Similar results were previously reported for *Coleus blumei* Benth., (sin. *Plectranthus blumei*) with shoots emerging from 100% of explants (Rani *et al.*, 2006). Previous studies showed that BAP and NAA were utilized for shoot induction in nodal and apical segments in other species, such as *Jasminum officinale* L.,(Bhattacharya and Bhattacharya 1997), *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider (Singh *et al.* 2008), *Celastrus paniculatus* Willd (Rao and Purohit 2006) and *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (George and Ravishankar 1997). Combinations of similar plant hormones were also responsible for callus formation when leaf discs of *C. blumei* were used as explants (Ibrahim *et al.* 1992). Nevertheless, BAP alone was sufficient for multiple shoot formation from nodal segments in *P. ornatus* as well as in other *Coleus* species (sin: *Plectranthus*), for example *C. forskohlii* and *C. parviflorus* (Sen and Sharma 1991). Rooted plantlets were established in soil with a 96 % survival rate and with normal development (Fig. 1D, E). In conclusion, we have established a successful *in vitro* system for *P. ornatus* nodal segment explants. This general and reproducible protocol has vital importance for selected medicinal plants and their chemical products and provides for pathogen-free growth under appropriate and standardized physical conditions.

Acknowledgements

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grants and fellowships

NAA (μM)	BAP (μM)					
	4.5		9.0		18.0	
	Original average	Processed average	Original average	Processed average	Original average	Processed average
	<u>EB</u>					
0.0	90.8	77.2aA*	100.0	90.0aA	100.0	90.0aA
5.4	100.0	90.0aA	96.4	84.2aA	87.5	78.7aA
10.1	100.0	90.0aA	100.0	90.0aA	100.0	90.0aA
21.5	100.0	90.0aA	93.7	82.5aA	100.0	90.0aA
	<u>EA</u>					
0.0	30.8	32.2abA	41.5	40.6aA	12.5	11.2bA
5.4	33.3	31.9abA	50.0	45.0aA	8.3	8.7bA
10.1	50.0	44.9aA	25.0	26.2aA	34.8	36.0aA
21.5	32.0	34.5aA	31.2	37.5aA	13.7	18.7aA
	<u>NS</u>					
0.0	1.4	1.5aAB	2.2	1.7aAB	1.8	1.6aA
5.4	1.3	1.5aB	3.1	2.0aA	1.3	1.5aA
10.1	3.1	1.9aA	1.0	1.4bB	0.9	1.3bB
21.5	0.8	1.3aB	1.2	1.4aB	0.9	1.3aB
	<u>NL</u>					
0.0	5.2	2.4bA	12.3	3.6aB	7.1	2.8bA
5.4	3.8	2.1bA	22.0	4.7aA	5.4	2.5bAB
10.1	6.8	2.7aA	3.9	2.2abC	2.7	1.8bBC
21.5	3.3	2.0aA	3.4	2.1aC	0.5	1.1aC

*Means followed by the same small letters in each line and by the same capital letters in each column are not significantly different ($p < 0.05$) using Tukey test.

Table 1 Average values for the presence of callus at the explant base (EB) and the explant apex (EA) and the number of shoots (NS) and leaves (NL) in *P. ornatus* at different concentrations of BAP and NAA

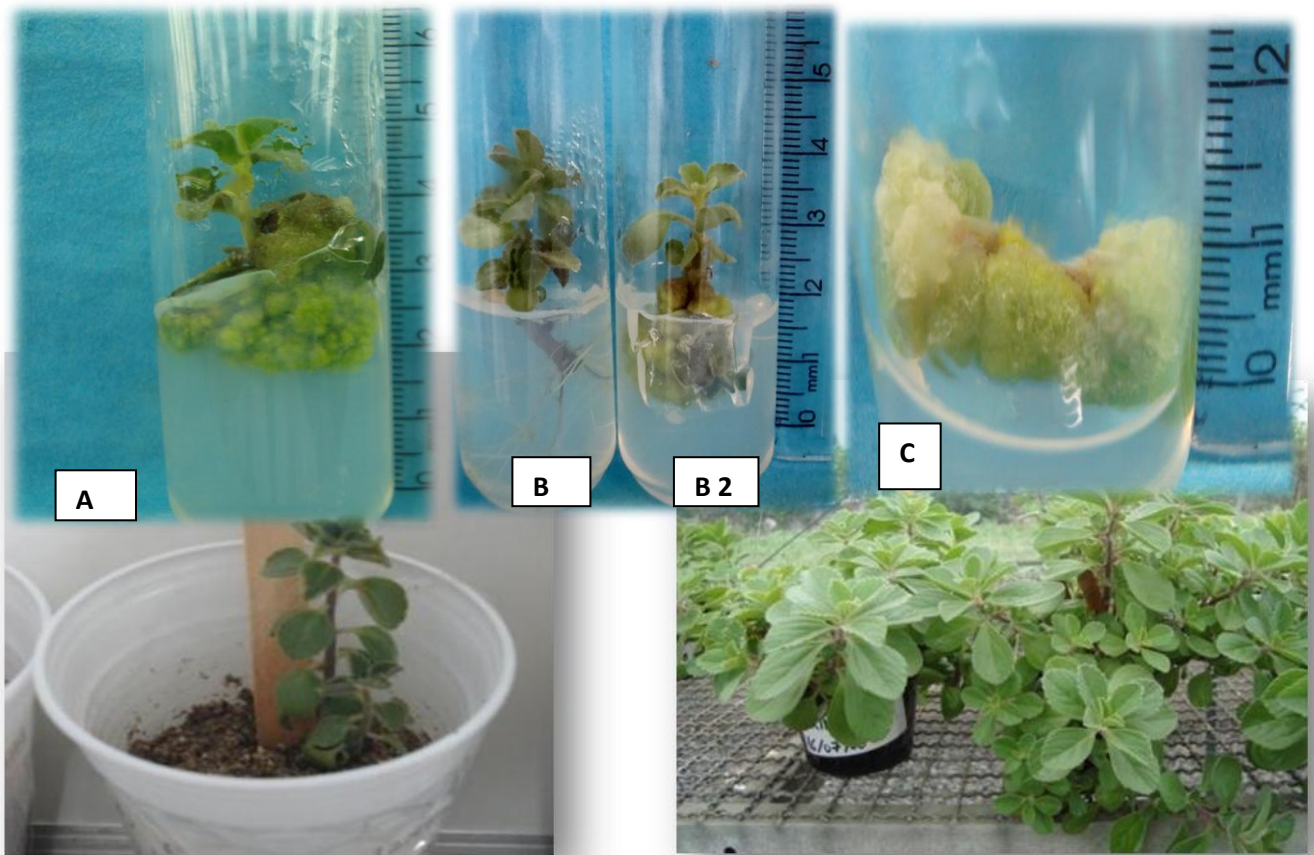


Figure 1 Morphological aspects of *P. ornatus*. (A) General appearance of shoots induced from nodal segments cultivated in medium supplemented with 9.0 μM BAP and no NAA, after 30 days of cultivation. (B) General appearance of shoots induced from nodal segments cultivated in the medium without supplemental regulators (B1) and supplemented with 9.0 μM BAP and 5.4 μM NAA (B2). (C) Compact callus formed from nodal segments on MS medium supplemented with 4.5 μM BAP and 5.4 μM NAA. (D) Transplanted plant in pot. (E) Acclimated plants

REFERENCES

- Bhattacharya, S., Bhattacharya S.: Rapid multiplication of *Jasminum officinale* L. by *in vitro* culture of nodal explants. - Plant. Cell. Tissue Organ. Cult. 51: 57-60, 1997.
- Calixto, J.B.: Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). - Braz. J. Med. Biol. Res. 33: 179-189, 2000.
- Câmara, C.C., Nascimento, N.R., Macêdo-Filho, C.L., Almeida, F.B., Fonteles, M.C.: Antispasmodic effect of the essential oil of *Plectranthus barbatus* and some major constituents on the guinea-pig ileum. - Planta Med. 69: 1080-1085, 2003.
- Debnath, M., Malik, C.P., Bisen, P.S.: Micropropagation: A tool for the production of high quality plant-based medicines. Curr. Pharmaceut. Biotechnol. 7: 33-49, 2006.
- Dhar, U., Joshi, M.: Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. - Plant Cell. Rep. 24: 195-200, 2005.
- Ferreira, D.F.: Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. Technical tips online. Available at <http://www.dex.ufla.br/~danielff/sotwares.htm>. Accessed November 4th, 2008.
- George, P.S., Ravishankar, G.A.: *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. - Plant Cell. Rep. 16: 490-494, 1997.
- Ibrahim, K.M., Collins, J.C., Collin, H.A.: Characterization of progeny of *Coleus blumei* following an *in vitro* selection for salt tolerance. - Plant Cell. Tissue Organ. Cult. 28: 139-145, 1992.
- Litz, R.E., Jarret, R.L.: Regeneracion de plantas en el cultivo de tejidos, embriogenesis somatica y organogenesis. - In: Roca W.M., Mroginsky L.A.(ed.): Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones, Pp. 143-172, Cali: CIAT, 1991.
- Lukhoba, C.W., Simmonds, M.S.J., Paton, A.J.: *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. - J. Ethnopharmacol. 103: 1-24, 2006.

- Marks, T.R., Simpson, S.E.: Factors affecting shoot development in apically dominant *Acer* cultivars in vitro. - J. Hort. Sci. 69: 543-551, 1994.
- Murashige, T., Skoog F.A.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. - Physiol. Plant. 15: 473-497, 1962.
- Oliveira, P.M., Ferreira, A.A., Silveira, D., Alves, R.B., Rodrigues, G.V., Emerenciano, V.P., Raslan, D.S.: Diterpenoids from the aerial parts of *Plectranthus ornatus*. - J. Nat. Prod. 68: 588-591, 2005.
- Preece, J.E., Hutterman, C.A., Ashby, W.C., Roth, P.L.: Micro and cutting propagation of silver maple. I. Results with adult and juvenile propagules. - J. Am. Soc. Hortic. Sci. 116: 142-148, 1991.
- Rani, G., Talwar, D., Nagpal, A., Virk, G.S.: Micropropagation of *Coleus blumei* from nodal segments and shoot tips. - Biol. Plant. 50: 496-500, 2006.
- Rao, M.S., Purohit, S.D.: *In vitro* shoot bud differentiation and plantlet regeneration in *Celastrus paniculatus* Willd. - Biol. Plant. 50: 501-506, 2006.
- Rijo, P., Simões, M.F., Rodríguez, B.: Structural and spectral assignment of three forskolin-like diterpenes isolated from *Plectranthus ornatus*. - Magn. Reson. Chem. 43: 595-598, 2005.
- Saini, R., Jaiswal, P.K.: In vitro multiplication of *Peganum harmala*—an important medicinal plant. - Indian J. Exp. Biol. 38: 499-503, 2000.
- Sen, J., Sharma, A.K.: *In vitro* propagation of *Coleus forskohlii* Briq. for forskolin synthesis. - Plant Cell. Rep. 9: 696-698, 1991.
- Singh, A., Reddy, M.P., Patolia, J.S.: An improved protocol for micropropagation of elite genotypes of *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider. - Biol. Plant. 52: 538-542, 2008.

Capítulo 3

Compostos orgânicos voláteis (COV) obtidos pelo cultivo in vitro de calos de *Plectranthus ornatus**

* Artigo para submissão na *Phytochemistry*

Compostos orgânicos voláteis (COV) obtidos pelo cultivo in vitro de calos de *Plectranthus ornatus* Codd. (Lamiaceae)

Helna C. Passinho-Soares^{a,b}, Paulo R. R. Mesquita^c, Daiara C. Soares^a, Frederico de M. Rodrigues^d, José Raniere F. de Santana^b, Fabio S. de Oliveira^e, Jailson B. de Andrade^c, Jorge M. David^c, Juceni P. David^{a*}.

^aLaboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170-290, Salvador (BA), Brazil., Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170290, Salvador (BA), Brazil

^bPrograma de Pós- graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44031-460, Feira de Santana (BA), Brazil

^cInstituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170290, Salvador (BA), Brazil

^dEmpresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A, 40170-110, Salvador (BA), Brazil

^eCentro de Ciências da Saúde , Universidade Federal de Recôncavo Baiano, 44574-490 , Santo Antonio de Jesus, (BA), Brazil

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +55-71-32359350. Fax: + 55-71-

RESUMO

O presente trabalho descreve o efeito de diferentes concentrações das auxinas 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2.4-D) e 1-naphthaleneacetic acid (ANA), na indução de calos cultivados em meio Murashide & Skoog a partir de segmentos nodais de *Plectranthus ornatus* Codd, avaliando concomitantemente a presença de compostos orgânicos voláteis (COV). Calos com idade de 20 e 40 dias foram submetidos à microextração por fase sólida (HS-MEFS). Assim foram encontrados 23 compostos voláteis, constituídos basicamente por mono e sesquiterpenóides. Foi observado que existe uma relação direta entre a concentração do constituinte majoritário, acetato de α -terpinil e a dos monoterpenos, α -thujeno, α -pinene, β -pineno, canfeno, sabineno, α -limoneno, presentes no óleo. O acetato de α -terpinil, isobornil e α -limoneno foram os constituintes cuja concentração foi mais acentuada (>5%). Nos períodos analisados (20 e 40 dias) foram encontradas variações qualitativas e quantitativas dos COV. Ficou demonstrado que o melhor meio para a produção dos COV foi o MS0 (controle) seguido dos tratamentos com 2.68 μ M e 5.37 μ M de ANA (Grupo2). Enquanto que, os piores resultados foram obtidos com 2.4-D nas concentrações 9.0 μ M, visto que só aparecem os COV acetato de α -terpinil e 2.2% de isocumene nesse tratamento e, 2.26 μ M de 2.4-D que produziu apenas acetato de α -terpinil, β -thujeno e 16.2% de cariofileno. A análise de PCA e HCA possibilitou identificar quatro agrupamentos entre as amostras dentro dos diferentes tratamentos estudados, a partir dos compostos identificados em cada conjunto de amostras. A análise dos COV foi realizada através de CGAR-EM. A identificação dos constituintes químicos foi efetuada através da determinação dos índices de Retenção e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com dados da literatura e a biblioteca eletrônica disponível no equipamento. O perfil dos compostos orgânicos voláteis presentes no *Plectranthus ornatus* foram interpretados

utilizando-se Principal Component Analysis (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA).

Palavras-chave: *Plectranthus ornatus*, Lamiaceae, óleos essenciais, cultivo *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

A família Lamiaceae é composta de 258 gêneros de distribuição cosmopolita. *Plectranthus* L Her. é considerado o maior gênero da família compreendendo cerca de 300 espécies e vários híbridos. Espécies de *Plectranthus* têm importância econômica por serem fontes de óleos essenciais aromáticos, sendo também cultivados como plantas ornamentais, comestíveis, condimentares e medicinais. Varias espécies desse gênero são usadas na medicina popular como vermífugos, anti-sépticos e purgativos, para o tratamento de infecções de ouvido, espasmos intestinais, para cura de vômitos e enjôos (Lukhoba *et al.* 2006), apesar da existência limitada de informações farmacológicas e fitoquímicas acerca dessas plantas (Dellar *et al.* 1996). Dentre as várias espécies são utilizadas na medicina popular pode-se citar *Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng. (Gurgel *et al.* 2009; Murthy *et al.* 2009) e *Plectranthus barbatus* Andrews (Chen *et al.* 2009; Figueiredo *et al.* 2010). No Brasil, *Plectranthus ornatus* Codd é uma erva aromática denominada boldo, boldo-de-jardim, ou boldo-do-Brasil e empregada na medicina popular no tratamento de insuficiência hepática e dispepsia.

Sistemas de produção de metabólitos secundários *in vitro* propiciam amplo controle das condições de produção, direcionando a mesma para síntese do composto de interesse (Ma and Gang, 2006, Charchoglyan, 2007). Adicionalmente, o cultivo de calos e células tem facilitado a elucidação dos fatores que interferem no metabolismo secundário, tendo em vista a produção de compostos de importância medicinal *in vitro* (Oksman-Caldentey and Inzé, 2004; Zhao *et al.* 2004).

Os terpenóides são particularmente abundantes em diversas espécies da família Lamiaceae, sendo considerados os principais responsáveis pelas atividades biológicas dos *Plectranthus* (Wellsow *et al.* 2006.). Estudos sobre a composição química do óleo essencial do gênero *Plectranthus* demonstram que espécies desse gênero são ricas em mono e sesquiterpenos (Lukhoba *et al.* 2006, Abdel-Mogib *et al.* 2002).

Este trabalho descreve o perfil dos compostos orgânicos voláteis obtidos pelo cultivo *in vitro* de calos originados de segmentos nodais de *P. ornatus*. Assim, foram identificados 23 compostos voláteis, constituídos basicamente por mono e sesquiterpenóides cujas concentrações variaram qualitativamente e quantitativamente a depender do período e do meio de cultivo. Os resultados foram avaliados também usando as técnicas de análises multivariada Análise de Componente Principal (ACP) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A calogênese de *P. ornatus* evidenciou que o crescimento o aspecto e consistências dos calos diferiram de acordo com o tipo e concentração da auxina empregada. Observou-se que os explantes nodais produziram calos mais desenvolvidos quando cultivados em meio contendo 2,68 e 5,37 μM de 1-naphthaleneacetic acid (ANA) e 2,26 μM de 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Os explantes cultivados em ANA apresentaram boa formação de calos verdes e com aspecto rígido enquanto que aqueles cultivados em meio acrescido de (2.4-D)

apresentaram calos com aspecto verde e rígido no centro e branco e friável nas extremidades, os calos originados de explantes cultivados em meio sem suplementação de reguladores (MS0), apresentaram calos com aspecto verde e friável. Foram observados que o ganho de biomassa nos calos ocorreu entre o vigésimo e o quadragésimo dia após a inoculação, exceto para os calos cultivados em meio suplementado com 9.0 μ M de 2.4-D e em meio MS0, que após o trigésimo dia de inoculação entraram na fase de declínio, e, portanto, com habilidade regenerativa diminuída, apresentando calos com coloração marrom, não sendo assim possível a análise dos COV por HS-MEFS-GC/MS.

Os componentes dos óleos essenciais de *P. ornatus* obtidos dos calos cultivados *in vitro* com as diferentes concentrações das auxinas ANA e 2.4D e, com idade de 20 e 40 dias de inoculação identificados através de HS-SPME-CGAR/MS estão descritos na Tabela 1. Assim, foram encontrados 23 compostos voláteis, constituídos basicamente por mono e sesquiterpenóides. O acetato de α -terpinil isobornil e α -limoneno foram os constituintes cuja concentração foi mais acentuada (>5%). Nos períodos analisados de 20 e 40 dias foram encontradas variações qualitativas e quantitativas. Em relação à variação qualitativa foi verificada a presença de terpinoleno, 3-faneseno e kessane nos calos cultivados em 40 dias (Tabela 1), enquanto que 1-octen-3-ol, 3-octanol, decanal e n-octil acetato só foram detectados nos calos cultivados em 20 dias. Do ponto de vista quantitativo pode ser observado que nos calos de 40 dias houve diminuição de 0.2%, 1.2% e 1.4% no conteúdo de β -pineno, de 2.2%, 8.2 e 7.8% para o α -limoneno, de 1.2%, 1.0 e 0.2% para isocomene e 0.4% de β -cariofileno, bem como um aumento na produção de 16.4% e 14.6% de isobornil acetato, para os calos cultivados em meio suplementado com ANA (Tabela 1). Observa-se na Tabela 1 que o isobornil (área >10%) está presente apenas nos óleos obtidos de calos cultivados no meio contendo a auxina ANA com 20 e 40 dias, e no meio controle (MS0) com 20 dias de cultivo

in vitro. Observou-se que houve uma produção excessiva de β -cariofileno nos calos de 20 dias cultivados em meio suplementado com 2.26 μM de 2.4-D em comparação com os calos com ANA (2.68 e 5.37 μM) no mesmo período.

Comparando os compostos voláteis dos calos cultivados em meio MS0 (controle) com os calos cultivados em meio MS suplementado com as diferentes concentrações das auxinas ANA e 2.4D com 20 dias de idade, observou-se que a adição de 10.08 μM de ANA e 4.52 μM resultou no aumento considerável dos níveis de β -pineno e α -limoneno. Resultados semelhantes foram encontrados (Affonso *et al.*, 2007) quando foi avaliada a influência de auxinas e citocininas na produção de óleos essenciais em *Lantana camara* L.

No meio cultivado sem regulador (MS0) foram observadas as maiores concentrações de α -pineno (9.0%), canfeno (8.0%), sabineno (2.8%), decanal (1.1%) e α -humuleno (3.3%), bem como a menor concentração de acetato de α -terpinil (31.3%). O α -thujeno apresentou variação qualitativa e quantitativa, sendo observada a presença desse composto em calos com 20 dias, cultivados em meio suplementado com 10 μM de ANA e 2.26 μM 2.4-D e traços desse composto (0.2%), em calos cultivados em meio suplementado com 5.37% de ANA com 40 dias. No nosso estudo, a variação qualitativa e quantitativa no conteúdo dos COV sofreu influência do tempo de cultivo em dias, bem como, do tipo e da concentração do regulador utilizado no preparo dos meios de cultivo. Resultados semelhantes da variação qualitativa e quantitativa de COV obtidos *in vitro* foi observado para *Lycopersicon esculentum* Mill (Maes *et al.* 2001, 2003), *Tymus vulgaris* (Affonso *et al.* 2009), e *Olea europaea* (Willian *et al.* 1998)

Uma análise dos COV presentes nos calos de *P. ornatus* aponta que a diminuição das proporções do acetato de α -terpinil no óleo é igual ao aumento dos monoterpenos nas amostras, como representado na Figura 1.

Nesse estudo, esse fato pode estar diretamente ligado a sobreprodução da substância acetato de α -terpinil na composição dos óleos voláteis presentes nos calos e a baixa concentração de alguns monoterpenos na composição do óleo, visto que o cátion do α -terpinil é o precursor direto de diversos desses compostos. Este resultado corroboram com aqueles observados por Turner *et al.* 2000, Lane *et al.* 2010.

Os COV obtidos *in vitro* são caracterizados pelo alto percentual de monoterpenos (52.2%). Resultados semelhantes para produção de COV sob influência de reguladores com alta produção de monoterpenos foi obtido para *Melissa officinalis* L. (Silva *et al.* 2005) e *Salvia officinalis* L. (Avato *et al.* 2005). A Tabela 2 alista os 33 COV identificados na planta matriz.

Comparando os resultados das Tabelas 1 e 2 observa-se que 12 compostos são similares as plantas cultivadas *in vitro* e *ex vitro*, sendo que 8 desses compostos são monoterpenos. É notável que calos indiferenciados sejam capazes de produzir elevadas quantidades de COV de aproximadamente 36% do que produzido pelo explante (Tabela 2).

De acordo com os resultados, pode ser inferido que o melhor meio para a produção dos COV foi o MS0 (controle) seguido dos tratamentos com 2.68 μ M e 5.37 μ M de ANA (Grupo2).

Enquanto que, os meios onde houve menores produções de COV foram com 2.4-D nas concentrações 9.0 μM . Neste meio só foram detectados acetato de α -terpinil e 2.2% de isocumene e, com 2.26 μM de 2.4-D que produziu apenas acetato de α -terpinil, α -thujeno e 16.2% de β -cariofileno.

A Figura 2 mostra o gráfico dos *scores* obtidos por análise de componentes principais (PCA). Cada um dos pontos neste gráfico representa uma determinada amostra de óleo avaliado. A partir da inspeção gráfica foi possível detectar similaridades entre as três réplicas dos calos em meio MS0 com 20 dias, codificada como MS20D e denominada como Grupo 1, o qual se agrupou de forma bastante distinta das demais amostras. Outro grupo identificado, Grupo 2, inclui as amostras 2.68 μM de ANA, 5.37 μM de ANA com 20 dias, assim como as amostras 2.68 μM ANA e 5.37 μM ANA com 40 dias, codificadas como T120D, T220D, T140D e T240D, respectivamente. O Grupo 3 foi composto pelas amostras 4.52 μM de 2.4D, 10.1 μM de ANA com 20 dias e 10.1 μM de ANA com 40 dias, codificadas como T520D, T320D e T340D, respectivamente. O último grupo identificado como Grupo 4 foi composto por todas as amostras 2,4D nas concentrações de 2.26 μM de, 9.0 μM com 20 dias, assim como em 2.26 μM e 4.52 μM com 40 dias, respectivamente codificadas como T420D, T620D, T440D e T540D. O Grupo 4 apresentou maior similaridade entre os perfis cromatográficos das amostras que o compunha.

A Figura 3 representa o gráfico dos *loadings* obtido por análise de componentes principais. Os compostos α -pineno, α -limoneno, canfeno e isobornil apresentaram valores de áreas similares entre as amostras. Outros componentes químicos que apresentaram valores de *loadings* significativos nesta figura foram o kessano e α -terpenil, sendo que estes não

apresentaram similaridade de comportamento. Os demais componentes químicos presentes apresentaram similaridade nos valores baixos dos *loadings*, o que indicam que estes não contribuíram para explicar a variabilidade do conjunto de dados, apresentando valores aproximadamente constantes próximos da média.

Avaliando conjuntamente os gráficos nas Figuras 2 e 3 verifica-se as amostras do Grupo 1, apresentaram valores mais elevados de α -pineno, α -limoneno, canfeno e isobornil. Enquanto que, as amostras do Grupo 2 apresentaram valores mais elevados de acetato de α -terpinil e, em menor escala, de kessano, presente apenas nos calos com 40 dias no meio suplementado com 5.37 μ M de ANA. As amostras que apresentaram mais altos níveis de acetato de α -terpinil foram as T140D e T220D (2.68 e 5.37 μ M de ANA com 40 e 20 dias, respectivamente).

Nossos resultados mostram o importante papel dos reguladores do crescimento na indução de calogênese e na produção de COV em calos *in vitro*. Onde explantes nodais produziram calos mais desenvolvidos quando cultivados em meio contendo 2.68 e 5.37 μ M de ANA e 2.26 μ M de 2.4-D. A ACP identificou similaridades dos compostos voláteis dentre os diferentes tratamentos estudados.

Tendo em vista o fato de que as condições de cultivo empregadas neste trabalho, tais como, a quantidade de luz, temperatura, composição do meio, pH e idade dos calos foram completamente controladas, os resultados obtidos mostram que o perfil dos COV diferiram exclusivamente de acordo com o tipo e concentração da auxina empregada. Sendo esses

agrupamentos observados pelo ACP (Figura 2 e 3). Assim, o perfil dos COV está diretamente relacionado ao tipo e a concentração dos reguladores no meio de cultivo. Esses dados estão de acordo com os encontrados na literatura (Silva *et al.* 2005) que apontam a influência dos reguladores de crescimento na composição do óleo essencial em *Melissa officinalis*L.

Os calos de *P. ornatus* cultivados em meio MS0 (Tabela 1) apresentaram as maiores concentrações de α -pineno, α -limoneno, canfeno e isobornil e humuleno. Esses resultados sugerem que a adição dos reguladores no meio de cultivo interfere na síntese desses compostos.

A partir da análise dos resultados obtidos por HCA, conforme ilustrado no dendograma na Figura 4 verifica-se que os mesmos agrupamentos de amostras obtidos por PCA também são evidenciados empregando no dendograma. Considerando que foram identificados agrupamentos iguais entre as amostras avaliadas empregando duas técnicas quimiométricas distintas, este é um indicador que reforça grande parte das conclusões anteriormente descritas.

3. EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAL VEGETAL

Os explantes foram retirados de plantas matrizes cultivadas em canteiros da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). O material herborizado encontra-se

depositado no Herbário do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número R196538.

3.2. CALOGÊNESE

A calogênese de *Plectranthus ornatus* foi induzida a partir de segmentos nodais cultivados em meio base Murashige and Skoog (1962) solidificado com 6 g.L de Agar, 87.64 mM sacarose e suplementado com ANA (2.68; 5.37 e 10.08 μM) + 4.5 μM de 6-benzylaminopurine (BAP) e 2.4-D (2.26; 4.52 e 9.04 μM) + 4.5 μM de BAP, tendo como controle, explantes inoculados no meio MS isento de regulador (MS0). Para desinfecção dos explantes, estes foram lavados em água corrente por 40 min, seguidos de duas lavagens com água destilada. Em câmara asséptica os explantes foram imersos em álcool 70°GL por 1 minuto com agitação e em seguida, permaneceram por 15 min em hipoclorito de sódio (produto comercial 2.0% cloro ativo) + Tween 20 (20 gotas/L). A seguir foram enxaguados por três vezes com água destilada autoclavada (3 minutos em cada). Após a desinfecção, os explantes com aproximadamente 1.5 cm foram inoculados individualmente em tubos de ensaio (25x150mm) contendo 12 mL de meio de cultura A incubação foi realizada em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade de 70%. Os tubos de ensaio contendo o meio e o explante foram fechados com tampa plástica sem película de PVC, mantidos no escuro por oito dias e posteriormente submetidos à fotoperíodo de 16 horas luz branca fria sob densidade de fluxo de fótons de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Foram avaliadas as características dos calos consistência, textura e coloração e perfil dos compostos orgânicos voláteis (COV). Os tubos que apresentaram algum tipo de

contaminação foram retirados do experimento e as avaliações foram realizadas aos 20 e 40 dias de cultivo sem levar em conta os frascos contaminados.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS METABOLITOS PRODUZIDOS PELO CULTIVO DE CALOS

3.3.1. Extração dos compostos orgânicos voláteis (COV)

Foram empregadas as técnicas de headspace e microextração em fase sólida (Lord and Pawliszyn, 2000), associada à Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massas (Eiceman *et al.*, 2002). Todas as extrações foram realizadas em triplicata e aplicadas à massa idêntica de 1.0 g de calos cultivados *in vitro* com idade de 20 e 40 dias. Inicialmente os calos foram macerados com um bastão em um frasco de vidro com capacidade para 12 mL. Em seguida lacrados com tampa de alumínio e septo de silicone faceado com teflon, e a amostra mantida em repouso 20 min à temperatura ambiente no intuito de prover o seu equilíbrio com a fase vapor do recipiente. Em seguida a agulha do holder, portador da fibra Polidimetilsiloxano (PDMS), previamente selecionada era introduzida no headspace do recipiente, e levada a uma placa aquecedora com temperatura controlada com o auxílio de termômetro e com bloco de alumínio sobreposto. Posteriormente, após o tempo de extração e aquecimento, a fibra era recolhida no próprio microextrator de MEFS (Supelco Inc., Bellefont, PA-EUA, 1995) e introduzida diretamente no injetor do cromatógrafo. Os parâmetros de extração tais como volume da amostra (1g), tempo de equilíbrio (20min), tempo de extração (15 min), temperatura de extração (60°C), tempo de dessorção (5min), temperatura de dessorção (260°C) e fibra de extração (PDMS-DVB) foram estabelecidos a partir de ensaios univariados e multivariados.

As análises foram conduzidas em sistema CGAR-EM (Shimadzu CG-2010 / QP-2010 de alta eficiência acoplada a detector de Massa Quadrupolo). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida para cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR), com fase estacionária ligada do tipo 5 % difenil – 95 % dimetil-polisiloxano, Elite-5 MS (Perkin Elmer) com 30 m (comprimento) x 0.25 mm (diâmetro) x 1.0 µm (espessura do filme), especificada para análises por espectrometria de massas.

As condições cromatográficas foram estabelecidas a partir de trabalhos descritos na literatura e da experiência do grupo de pesquisa na análise de COV, após a realização de uma série de ensaios univariados visando à obtenção das condições que permitissem a adequada separação dos compostos de interesse. Desta forma utilizou-se a velocidade do gás de arraste em 40cm.s^{-1} , vazão do gás de arraste na coluna de 1.22 mL.min^{-1} , modo de injeção, split com taxa de 1:30, temperatura do injetor de $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ e Gradiente de temperatura do forno com $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0.0 min), $1.5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0.0min); $15\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ (4min); $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ (7 min), linha de transferência: $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; fonte de íons: $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; energia de impacto: 70 eV, perfazendo o tempo total de corrida de 40.5 minutos.

Os componentes do óleo essencial foram identificados com base no índice de retenção (IR), determinados através da utilização de uma série homóloga de *n*-alcanos (C8-C32) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com dados da literatura. (ADAMS, 2007), e

com os dados de espectros contidos na biblioteca eletrônica NIST 147, disponível no equipamento.

A avaliação do perfil dos compostos orgânicos voláteis presentes nos calos de *P. ornatus*, muitos deles em concentrações baixas nestes tipos de amostras constituem dados multivariados e, por isso, foram interpretados utilizando-se Análise do Componente Principal - ACP (*Principal Component Analysis* – PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA), que são métodos quimiométricos multivariados para identificar similaridades e grupos de tendência dos compostos dentro dos diferentes tratamentos estudados.

3.4. ANÁLISE MULTIVARIADA DO CONJUNTO DE DADOS

Um conjunto de dados obtido a partir da análise de extratos de calos de *Plectranthus ornatus* referente a áreas dos picos cromatográficos de 74 compostos orgânicos voláteis avaliados em 12 diferentes amostras e com a realização de três réplicas foi empregado para construção de uma matriz de dados 36 x 74.

PCA e HCA foram usadas na avaliação dos dados produzidos a partir dos perfis de COVs obtidos por HS-MEFS-CGAR-EM submetidos a diferentes tratamentos. Os pacotes quimiométricos Unscrambler 8.0 (CAMO) e Statistica 7.0 (Statsoft) foram empregados nos cálculos envolvendo PCA e HCA, respectivamente

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas concessões das bolsase

REFERÊNCIAS

Abdel-Mogib, M., Albar, H.A., Batterjee, S.M., 2002. Chemistry of the genus *Plectranthus*. *Molecules* 7, 271-301.

Adams, R. P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas chromatography/Mass Spectroscopy, Allured Publishing Corporation: USA

Affonso, V.R., Bizzo, H.R., Lima, S.S., Esquibel, M.A., Sato, A., 2007. Solid Phase Microextraction (SPME) analysis of volatile compounds produced by *in vitro* shoots of *Lantana camara* L. under the influence of auxins and cytokinins. *J. Braz. Chem. Soc.* 18(8), 1504-1508.

Affonso, V.R., Bizzo, H.R., Lage, C.L.S., Sato, A., 2009. Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of *in vitro* plantlets of *Thymus vulgaris* L. *J. Agric. Food Chem.* 57, 6392–6395.

Avato, P., Fortunato, I.M., Ruta, C., D'Elia, R., 2005. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Sci.* 169, 29–36.

Charchoglyan, A., Abrahamyan, A., Fujii, I., Boubakir, Z., Gulder, T.A.M., Kutchan, T.M.*et a.*, 2007. Differential accumulation of hyperforin and secohyperforin in *Hypericum perforatum* tissue cultures. *Phytochemistry.* 68, 2670–2677.

Chen, J., Hammell, D.C., Spry, M., D'Orazio, J.A., Stinchcomb, A.L., 2009. *In vitro* skin diffusion study of pure forskolin versus a forskolin-containing *Plectranthus barbatus* root extract. *J. Nat. Prod.* 72, 769–771.

Dellar, J.E., Cole, M.,D.,Waterman, P.G., 1996. Antimicrobial abietane diterpenoids from *Plectranthus elegans*. *Phytochemistry* 41, 735-738.

Eiceman, G.A., Gardea-Torresdey, J., Dorman, F., 2002. Gas Chromatography. *Anal. Chem.* 74, 2771.

Figueiredo, N.L., Aguiar, S.R.M.M., Falé, P.L., Ascensão, L., Serralheiro, M.L.M., Lino, A.R.L., 2010. The inhibitory effect of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii* leaves on the viability, glucosyltransferase activity and biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. Food Chem. 119, 664-668.

Gurgel, A.P.A.D., Silva, J.G., Grangeiro, A.R.S., Oliveira, D.C., Lima, C.M.P., Silva, A.C.P., Oliveira, R.A.G., Souza, I.A., 2009. *In vivo* study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). J. Ethnopharmacol. 125, 361-363.

Lane, A., Boecklemann, A., Woronuk, G.N., Sarker, L., Mahmoud, S.S., 2010. A genomics resource for investigating regulation of essential oil production in *Lavandula angustifolia*. Planta 231(4), 835-845.

Lukhoba, C.W., Simmonds, M.S.J., Paton, A.J., 2006. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. J. Ethnopharmacol. 103, 1-24.

Ma, X., Gang, D.R., 2006. Metabolic profiling of *in vitro* micropropagated and conventionally greenhouse grown ginger (*Zingiber officinale*). Phytochemistry 67, 2239-2255.

Maes, K., Debergh, P.C., 2003. Volatiles emitted from *in vitro* grown tomato shoots during abiotic and biotic stress. Plant Cell. Tiss Org Cult. 1, 73-78.

Maes, K., Vercammen, J., Pham-Tuan, H., Sandra P., Debergh, P.C., 2001. Critical aspects for the reliable headspace analysis of plants cultivated *in vitro*. Phytochem. Anal. 12, 153-158.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Phisiol. Plant. 15, 473-497.

Murthy, P.S., Ramalakshmi, K., Srinivas, P., 2009. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. Food Chem. 114, 1014-1018.

Oksman-Caldentey, K., Inzé, D., 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.* 9, 433-440.

Silva, S., Sato, A., Lage, C.L.S., Gil, R.A.S.S., Azevêdo, D.A., Esquibel, M.A., 2005. Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. *in vitro* produced under the influence of growth regulators. *J. Braz. Chem. Soc.* 16, 1387-1390.

Tisserat, B., Vaughn, S. F., 2008. Growth, morphogenesis, and essential oil production in *Mentha spicata* L. plantlets *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant.* 44, 40-50.

Turner G. W., Gershenzon, J., Croteau, R. B., 2000. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiol.* 124, 655-664.

Wellsow, J., Grayer, R.J., Veitch, N.C., Kokubun, T., Lelli, R., Kite, G.C., Simmonds, M.S.J., 2006. Insect-antifeedant and antibacterial activity of diterpenoids from species of *Plectranthus*. *Phytochemistry* 67, 1818-1825.

Williams, M., Morales, M.T., Aparicio, R., Harwood, J.L., 1998. Analysis of volatiles from callus cultures of olive *Olea europaea*. *Phytochemistry* 47, 1253-1259.

Zhao, P., Iwamoto, Y., Kouno, I., Egami, Y., Yamamoto, H., 2004. Stimulating the production of homoisoflavonoids in cell suspension cultures of *Caesalpinia pulcherrima* using cork tissue. *Phytochemistry* 65, 2455-2461.

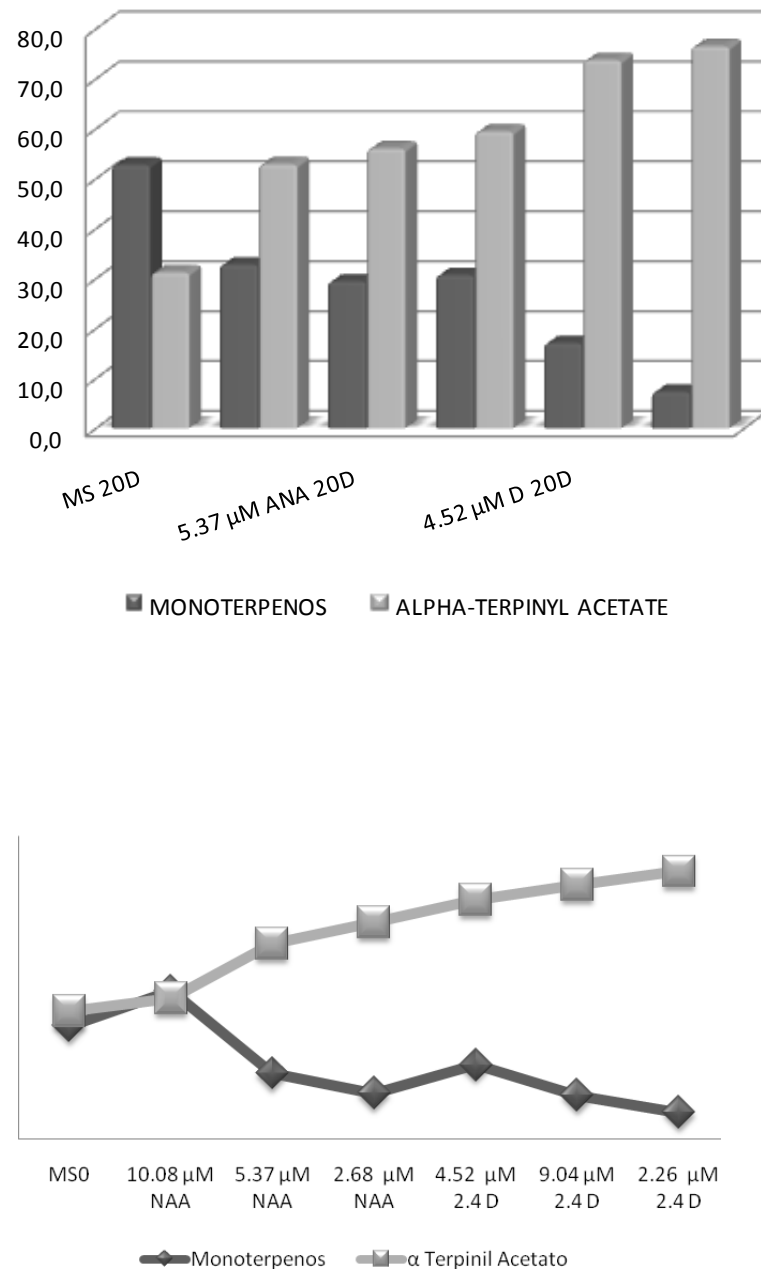


Figura 1 Correlação entre a presença de acetato de α -terpinil e a quantidade de monoterpenos presentes no COV de *P. ornatus*

TR	IR	IK	SUBSTÂNCIA	% Área							% Área					
				20 dias							40 dias					
				ANA (µM)			2,4-D (µM)				Control	ANA (µM)			2,4-D (µM)	
2.68	5.37	10.1	2.26	4.52	9.0	MS 0	2.68	5.37	10.1	2.26	4.5					
7.761	917	931	α-tujeno	0,0	0,0	1,0	7,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
8.074	926	939	α-pineno	2,3	3,4	2,9	0,0	2,4	2,1	9,0	1,7	2,2	2,1	2,8	0,0	
8.869	941	953	Campheno	2,1	3,2	2,8	0,0	2,4	0,0	8,0	1,4	2,1	0,8	2,6	0,0	
10.03	972	976	Sabineno	1,8	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8	0,9	1,2	1,9	0,0	0,0	
10.26	977	980	β-pineno	2,4	4,2	4,0	0,0	3,1	0,0	2,0	2,2	2,8	2,8	3,4	0,0	
10.535	976	978	1-octen-3-ol	0,0	0,0	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
11.523	995	993	3-octanol	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
13.69	1033	1031	α-limoneno	6,4	13,9	10,6	0,0	8,0	0,0	15,3	4,2	5,7	2,8	6,6	0,0	
17.63	1087	1088	Terpinoleno	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	1,4	0,0	0,0	
22.27	1133	1165	(-)-borneol	1,6	3,9	3,1	0,0	2,4	0,0	2,7	1,1	1,7	0,0	3,7	0,0	
22.503	1135	1136	p-menth-1-ol, cis	0,5	1,2	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	2,5	0,0	
23.051	1141	1144	p-menth-8-ol	0,7	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,6	0,5	0,0	0,0	0,0	
23.218	1142	1204	Decanal	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
23.452	-	-	Acetato de n-octyl	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
24.751	1287	1285	acetato de Isobornil	17,8	2,9	6,2	0,0	1,3	0,0	15,6	17,4	19,3	20,8	0,0	0,0	
25.626	1356	1350	Acetato de α-terpinil	52,9	56,0	59,5	76,5	73,8	88,5	31,3	65,8	52,0	57,2	72,3	97,3	
26.385	1408	1403	β-isocumeno	2,0	3,0	1,7	0,0	2,4	2,2	3,7	0,8	1,5	2,0	3,9	2,7	
26.478		1409	acetato de decanol	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0	
26.618	1420	1418	β-cariofileno	0,8	1,1	0,0	16,2	0,0	0,0	1,4	0,4	0,3	0,0	0,0	0,0	
26.964	1441	1443	β-farneseno <z>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	
27.208	1454	1454	α-humuleno	2,1	2,0	1,6	0,0	2,1	0,0	3,3	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	
28.607	1532	1528	Kessano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,2	3,3	0,0	0,0	
8.825	1543	1545	hidrato Sesquisabineno	1,4	1,9	2,0	0,0	1,7	0,0	1,6	1,3	1,5	2,4	2,2	0,0	

Tabela 1 COV (% área) presentes nos calos de *P. ornatus* Codd

TR	IR	IK	SUBSTÂNCIA	% Área
5,123	854	854	2-hexenal	0.50
7,761	917	931	α -tujeno	13.64
8,074	926	939	α -pineno	9.97
10,033	972	976	Sabineno	5.46
10,260	977	980	β -pineno	3.09
10,535	976	978	1-octen-3-ol	9.23
11,031	992	991	β -mirceno	0.40
11,523	995	993	3-octanol	0.81
12,037	1005	1004	acetato de Hexenol, (z)-	0.16
13,697	1033	1031	α -limoneno	0.43
13,983	1038	1040	(z)- β -ocimeno	0.21
14,674	1048	1050	(e)- β -ocimeno	2.54
23,218	1142	1204	Decanal	0.10
25,524	1356	1351	α -cubebeno	0.69
25,940	1381	1376	α -copaeno	1.59
26,066	1389	1384	β -bourboneno	0.88
26,115	1392	1390	β -cubebeno	1.35
26,209	1397	1409	α -gurjuneno	1.75
26,618	1420	1418	β -caryofileno	30.34
26,767	1429	1432	β - gurjuneno	0.41
26,867	1434	1433	β -farneseno <z>	0.15
27,014	1444	1460	muurolo-4(14),5-dieno<cis>	0.14
27,191	1454	1458	β -farneseno<e>	0.18
27,208	1454	1454	α -humuleno	1.82
27,433	1468	1461	Alloaromadendreno	0.19
27,505	1471	1477	γ -muuroleno	0.08
27,641	1479	1480	Germacreno- D	8.20
27,815	1489	1485	β -selineno	0.25
27,920	1494	1490	B-guaieno	0.29
27,99	1498	1500	B-guaieno <trans>	3.77
29,636	1586	1574	germacreno- D-ol	0.58
29,770	1592	1581	Oxido de cariofileno	0.72
30,716	1641	1641	α -muurolol <epi	0.08

Tabela 2 COV (% área) presentes na planta matriz (*ex vitro*) de *P. ornatus*

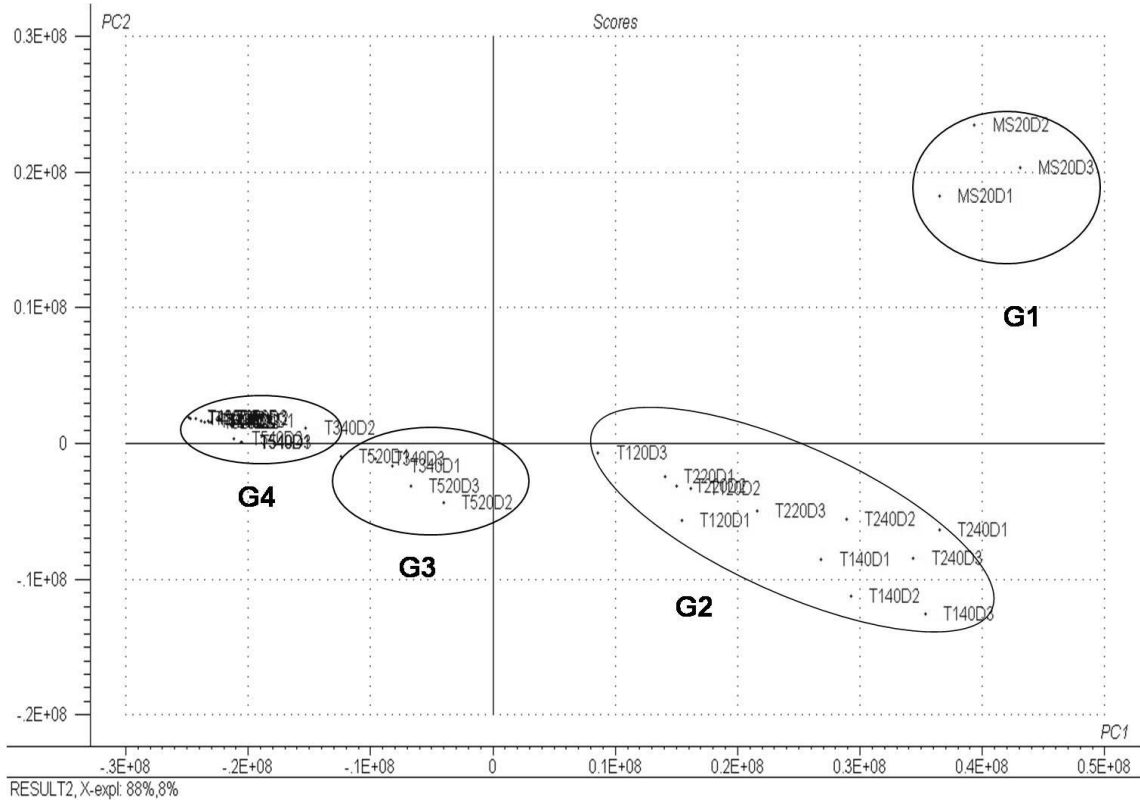


Figura 2 Scores obtidos por análise de componentes principais (PCA) para PC1 x PC2. Cada ponto neste gráfico representa uma amostra de óleo avaliado.

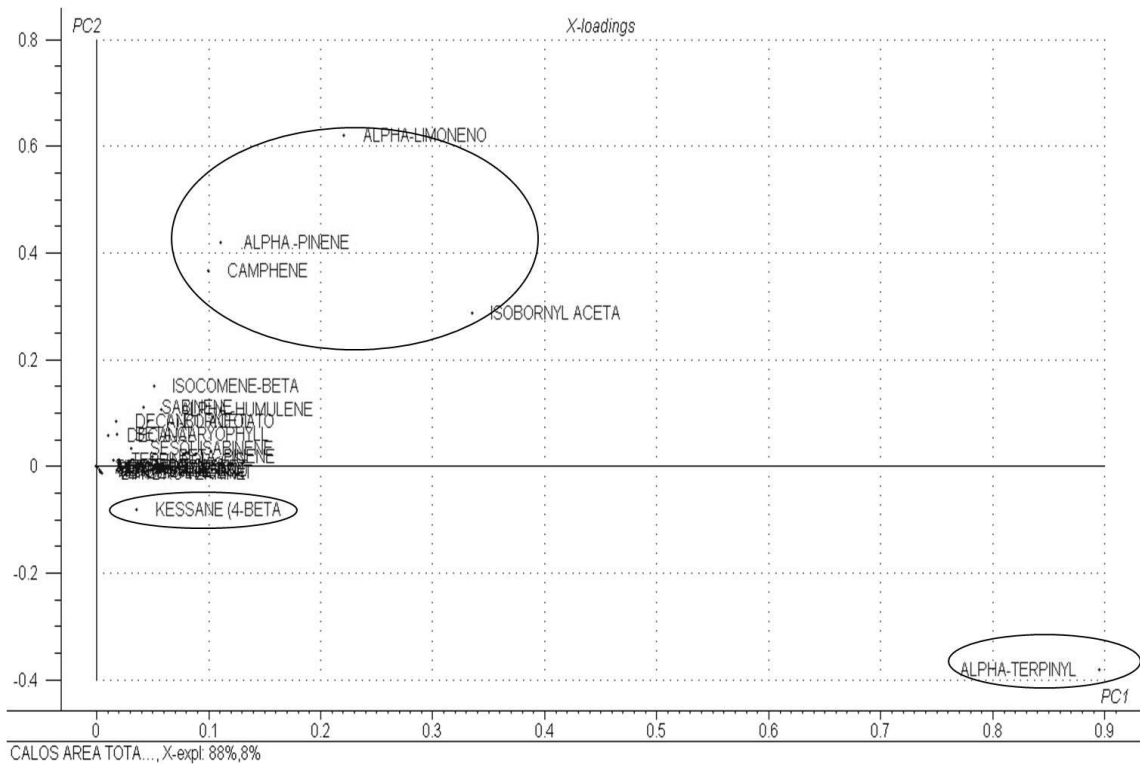


Figura 3 Gráfico dos loadings obtido por PCA para PC1 x PC2

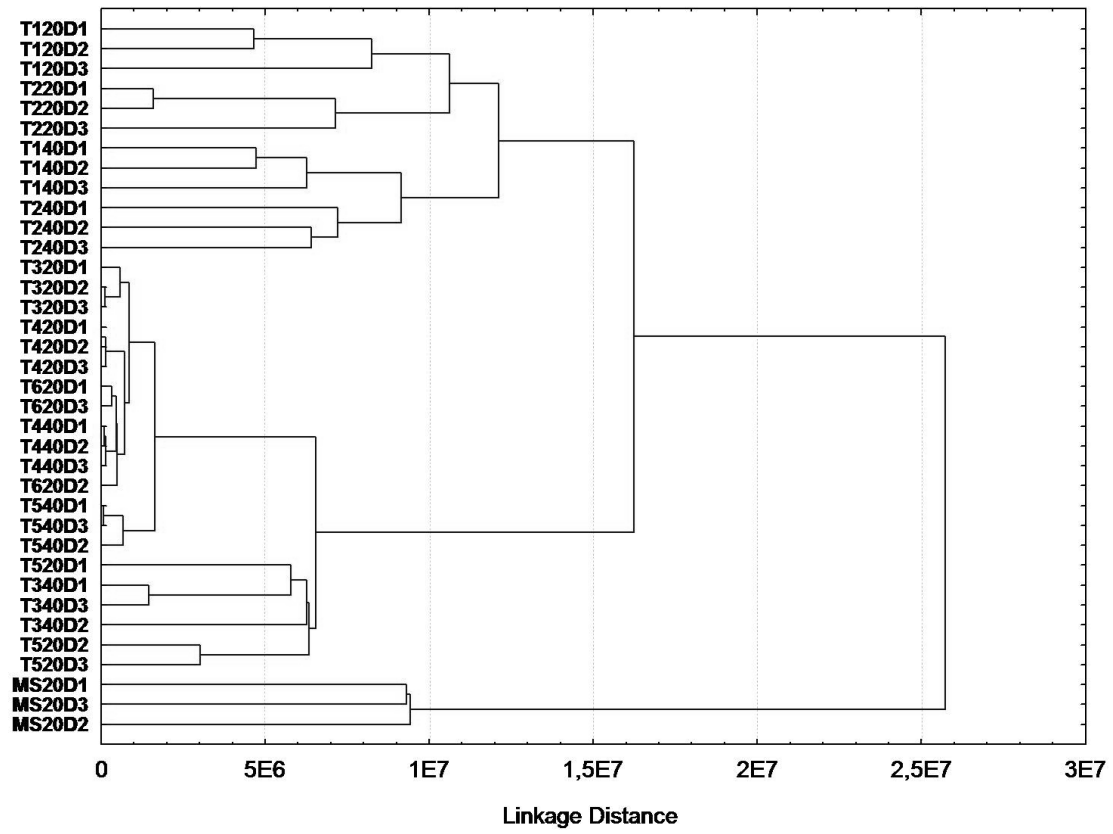


Figura 4 Dendrograma obtido por HCA

**Volatile organic compounds (VOCs) obtained by *in vitro* callus cultivation of
Plectranthus ornatus Codd. (Lamiaceae)**

Helna C. Passinho-Soares^{a,b}, Paulo R. R. Mesquita^c, Daiara Coêlho Soares^a, Frederico de M. Rodrigues^d, José Raniere F. de Santana^b, Fabio S. de Oliveira^e, Jailson B. de Andrade^c, Jorge M. David^c, Juceni P. David^{a*}

^aLaboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170-290, Salvador (BA), Brazil., Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170290, Salvador (BA), Brazil

^bPrograma de Pós- graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44031-460, Feira de Santana (BA), Brazil

^cInstituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170290, Salvador (BA), Brazil

^dEmpresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A, 40170-110, Salvador (BA), Brazil

^eCentro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Recôncavo Baiano, 44574-490, Santo Antonio de Jesus, (BA), Brazil

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +55-71-32359350. Fax: + 55-71-

Abstract

This paper describes the effects of different concentrations of the auxins 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA) on the induction of callus from nodal segments of *Plectranthus ornatus* Codd and in the presence of volatile organic compounds (VOCs). Calli with 20 and 40 day-old were subjected to solid phase micro extraction (HS-SPME) and analyzed by GCMS. In total, 23 volatile compounds, composed mainly of monoterpenes and sesquiterpenes, were found. A direct relationship was observed between the concentration of the major constituent, α -terpinyl acetate, and the monoterpenes α -thujene, α -pinene, β -pinene, camphene, sabinene and α -limonene that were present in the oil. The major constituents were α -terpinyl acetate, isobornyl acetate and α -limonene, and the concentration of each constituent was greater than 5%. In the analyzed periods, qualitative and quantitative variations in VOCs were observed. The best cultivation media for the production of VOCs was found to be MS0 (control). Moderate success was achieved by treatment with 2.68 μ M and 5:37 μ M NAA (Group 2). The worst results were obtained with 9.0 μ M of 2,4-D, in which only the presence of α -terpinyl acetate and isocumene were detected. Similarly, 2.26 μ M of 2,4-D just produced α -terpinyl acetate, β -thujene and caryophyllene as major components (16.2 %). The VOC profiles present in *P. ornatus* were interpreted using Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA). The PCA and HCA analysis allowed recognizing four groups among the different treatments from the compounds identified in this set of treatments.

Keywords: *Plectranthus ornatus*; Lamiaceae; *in vitro* cultivation; PCA; HCA.

1. Introduction

The Lamiaceae family encompasses 258 genera with a cosmopolitan distribution. *Plectranthus* is considered to be the largest genus of the family, and is comprised of *c.a.* 300 species and various hybrids. *Plectranthus* species are of economic importance because they are sources of aromatic essential oils and are also cultivated as ornamental plants, which are edible or are used as medicinal herbs. Several species of this genus are used in a number of ways in folk medicine, including as anthelmintics, antiseptics and purgatives, or to treat ear infections, intestinal spasms or nausea and vomiting (Lukhoba *et al.* 2006). However, there have only been a limited number of pharmacological and phytochemical studies on these plants (Dellar *et al.* 1996). *P. amboinicus* Lour. Spreng. is a species that is used in Brazilian folk medicine (Gurgel *et al.* 2009; Murthy *et al.* 2009) and is widely used to treat skin diseases. For instance, *P. amboinicus* is used in the treatment of furuncles and superficial mycosis, while *P. barbatus* Andrews (Chen *et al.* 2009, Figueiredo *et al.* 2010) is used in digestive remedies.

P. ornatus Codd is an aromatic herb and is known in Brazil as "boldo", "boldo-de-jardim", or "boldo-do-Brasil". This species is used in folk medicine to treat liver failure and dyspepsia. The terpenoids are particularly abundant in several species of the Lamiaceae family and are considered to be the main factors responsible for the biological activities of these *Plectranthus* (Wellsow *et al.* 2006). Studies on the chemical composition of the essential oils of the *Plectranthus* genus show that species in this genus are rich in monoterpenes and sesquiterpenes (Lukhoba *et al.* 2006, Abdel-Mogib *et al.* 2002).

There is a special interest in obtaining secondary metabolites *in vitro* once this media provides the comprehensive control of production conditions, allowing the compounds of interest to be synthesized (Ma and Gang, 2006, Charchoglyan, 2007). In addition, the cultivation of callus and cells permit the elucidation of factors involved in secondary metabolism, which are necessary in order to produce *in vitro* compounds of medicinal importance (Zhao *et al.* 2004).

This paper describes the volatile organic compounds obtained by callus derived *in vitro* from nodal segments of *P. ornatus*. A total of 23 compounds were identified, consisting mainly of monoterpenes and sesquiterpenes whose concentrations varied qualitatively and quantitatively depending on the period and the culture medium. The results were also

evaluated using multivariate analysis techniques such as Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA).

2. RESULTS AND DISCUSSION

The callogenesis of *P. ornatus* demonstrated that the callus growth, aspect and consistency differ according to the type and concentration of auxin employed. The nodal explants were found to produce more developed callus when cultured in a medium containing 2.68 and 5.37 μM of 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 2.26 μM of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).

The explants cultured on NAA showed a good formation of callus with green and hard aspects, while those cultured in a medium supplemented with (2,4-D) showed callus that was green and hard in the center and white and friable on the ends. On the other hand, the callus from explants cultured in media without supplementation of regulators (MS0) had green and friable features.

The biomass gain in callus was found to occur between 20 and 40 days after inoculation, except for the callus cultured in a medium supplemented with 9.0 μM of 2,4-D or in an MS0 medium. It is noteworthy that after 30 days of inoculation with MS0, the medium began a stage of decline. After this time, the medium demonstrated a reduced regenerative ability, showing callus with a brown color in which VOC HS-MEFS-GC/MS analyses were not possible.

The components of the essential oils of *P. ornatus* obtained from callus cultured *in vitro* with different concentrations of the auxin NAA and 2,4-D, and with 20 and 40 days of inoculation were identified by HS-SPME-HRGC/MS and are described in Table 1. A total of 23 compounds were found, consisting mainly of monoterpenes and sesquiterpenes. Constituents with concentrations higher than 5% included α -terpinyl acetate, isobornyl acetate and α -limonene.

The results also indicated qualitative and quantitative variations of constituents in the two periods analyzed. The presence of terpinolene, 3-farnesene and kessane was detected

qualitatively in the callus grown for 40 days (Table 1), whereas 1-octen-3-ol, 3-octanol, decanal and n-octyl acetate were only detected in the callus grown for 20 days.

From a quantitative point of view, the callus grown for 40 days showed a decrease in β -pinene, α -limonene, isocumene and β -caryophyllene, as well as an increased production of isobornyl acetate in the callus cultured in a medium supplemented with NAA (Table 1). The isobornyl (area > 10%) was found to be present only in essential oils obtained from callus cultured in medium containing the auxin NAA for 20 and 40 days, and in the control medium (MS0) cultured for 20 days. The overproduction of β -caryophyllene was also demonstrated in the callus cultured for 20 days in a medium supplemented with 2.26 μ M 2,4-D in comparison with the callus cultured with NAA (2.68 μ M and 5.37 μ M) in the same period (Table 1). Comparing the volatile compounds of 20 day old callus cultured on MS0 (control) with those cultured on an MS medium supplemented with different concentrations of the auxin NAA and 2,4D showed that the addition of 10.08 μ M and 4.52 μ M of NAA resulted in a significant increase in the levels of β -pinene and α -limonene. Similar results were found (Affonso *et al.* 2007) regarding the influence of auxin and cytokinin on the production of essential oils in *Lantana camara* L.

In the cultivated medium without the regulator (MS0), the highest concentrations of α -pinene (9.0 %), camphene (8.0 %), sabinene (2.8 %), decanal (1.1 %) and α -humulene (3.3 %) were observed, while a lower concentration of α -terpinyl acetate (31.3 %) was observed. Qualitative and quantitative variations were observed in α -thujene and indicated the presence of this compound in 20 day old edge callus cultured in a medium supplemented with 10 μ M of NAA and 2.26 μ M of 2,4-D. Traces of this compound (0.2 %) were also observed in calli cultured in a medium supplemented with 5.37 μ M of ANA for 40 days. Thus, this study demonstrated qualitative and quantitative variation in the VOCs. The VOCs are influenced by cultivation time, the specific regulators and the concentrations of the regulators that are used in the preparation of culture media. Similar results in terms of the qualitative and quantitative variation of VOCs in *in vitro* studies were observed in *Lycopersicon esculentum* Mill (Maes *et al.* 2001, 2003), *Thymus vulgaris* (Affonso *et al.* 2009) and *Olea europaea* (William *et al.* 1998).

The analysis of VOCs present in the callus of *P. ornatus* indicated that the decrease in the proportions of α -terpinyl acetate in the essential oil was equal to the increase of monoterpenes in the samples, as shown in Figure 1. In this case, the overproduction of α -terpinyl acetate

composition in the volatile oil from callus and the low concentrations of other monoterpenes in the oil seem to be directly associated, since the α -terpinyl cation is the precursor of many of these compounds. This result confirms those previously reported in the literature (Turner *et al.* 2000, Lane *et al.* 2010).

VOCs obtained *in vitro* were characterized by a high percentage of monoterpenes (52.2 %). Comparable results for the production of VOCs under regulator influence with a high production of monoterpenes was obtained for *Melissa officinalis* L. (Silva *et al.* 2005) and *Salvia officinalis* L. (Avato *et al.* 2005). Table 2 describes the 33 VOCs identified in the mother plant (the matrix plant). Comparing the results from Tables 1 and 2 shows that there are 12 similar compounds both in the *in vitro* and *ex vitro* plants, 8 of which are monoterpenes. Undifferentiated calli are capable of producing large amounts of VOCs, reaching *c.a.* 36 % of that produced by the explant (Table 2).

Figure 2 shows the scores chart obtained from a PCA. Each point in this figure represents one of the essential oil samples evaluated. This figure indicated that it was possible to detect similarities between the replicas of the three calli in the MS0 medium within 20 days. MS20D samples were grouped together in the analysis (termed Group 1) and were distinct from other samples. Another group identified, Group 2, included the treatments with 2.68 μ M NAA, 5.37 μ M NAA at 20 days, and 2.68 μ M treatments 5:37 μ M NAA and NAA at 40 days, which were referred to as T120D, T220D, T140D and T240D, respectively. Group 3 was composed of treatments with 4:52 μ M of 2,4D, 10.1 μ M NAA at 20 days and 10.1 μ M NAA with 40 days, codified as T520, T320D and T340D, respectively. The last group, identified as Group 4, was composed of treatments with 2,4-D at concentrations of 2.26 μ M of, 9.0 μ M at 20 days, and with 2.26 μ M and 4.52 μ M at 40 days, respectively referred to as T420D, T620D, and T440D T540D. Group 4 showed the greatest similarity between the chromatographic profiles in the sample treatments.

The results indicate that the best medium for the production of VOCs was MS0 (control) followed by treatment with 2.68 μ M and 5.37 μ M NAA (Group 2). The media resulting in the lowest production of VOCs occurred with 2,4-D at a concentration of 9.0 μ M and 2.26 μ M. Only α -terpinyl acetate and isocumene, as well as α -terpinyl acetate, α -thujene and β -caryophyllene, respectively, were detected in these media.

Figure 3 represents the loadings obtained by PCA. The VOCs α -pinene, α -limonene, camphene and isobornyl acetate showed similar area values between treatments. Kessane and α -terpinyl acetate also showed significant loading values in this figure, which did not show similar behavior. The other COVs present had similarly low loading values, indicating that these compounds did not contribute to the variability of the data set, with approximately constant values around the average.

Evaluation of the two charts represented in Figures 2 and 3 demonstrated that treatments in Group 1 showed higher values of α -pinene, α -limonene, camphene and isobornyl acetate. While treatments in Group 2 showed higher values of α -terpinyl acetate and, to a lesser extent, of kessane, this occurred only in 40 day old edge callus cultured in a medium supplemented with 5:37 μ M NAA. The treatments with higher levels of α -terpinyl were treatments T140D and T220D (2.68 μ M and 5:37 μ M NAA).

These results show the importance of growth regulators on the induction of callogenesis and on the production of VOCs at calli. Where nodal explants produced more developed calli when cultured in a medium containing 2.68 μ M and 5:37 μ M of NAA and 2.26 μ M of 2,4-D. The PCA identified similarities of the volatile compounds among the different treatments.

Since the culture conditions used in this work, such as the amount of light, temperature, medium composition, pH and age of callus, were completely controlled, the results showed that the profile of the VOCs differed only according to the type and concentration of auxin used.

All of these groups were also observed by the ACP (Figures 2 and 3). This indicates that the profile of the VOCs is directly related to the type and concentration of the culture medium regulators. These data are consistent with those in the literature (Silva *et al.* 2005) indicating the influence of growth regulators on the essential oil composition of *Melissa officinalis* L.

The *P. ornatus* calli cultured on MS0 (Table 1) showed the highest concentrations of α -pinene, α -limonene, camphene, isobornyl acetate and, humulene. These results suggest that the addition of regulators into the culture medium interferes with the synthesis of these compounds.

The HCA analysis confirmed that the same treatment groups obtained by PCA are also evident using a dendrogram (Figure 4). The same groups were identified among the samples

evaluated using two different chemometric techniques. Thus, these results corroborate many of the conclusions above described.

3. EXPERIMENTAL

3.1. PLANT MATERIAL

The explants were removed from the mother (matrices) plants and were grown at the Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). A voucher has been deposited at the Herbarium do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro under the number R196538.

3.2. *IN VITRO* PRODUCTION AND ESTABLISHMENT OF CALLUS TISSUES

The production of callus of *P. ornatus* was induced from nodal segments which were cultivated in a solidified medium as described by Murashige and Skoog (1962) employing 6 g.L⁻¹ of Agar, 87.64 mM sucrose supplemented with ANA (2.68; 5.37 and 10.08 μM) and 4.5 μM 6-benzylaminepurine (BAP); 2,4-D (2.26; 4.52 and 9.04 μM) and 4.5 μM BAP; and, as a control, explants inoculated in MS media without a regulator (MS0). The explants were disinfected by washing in running water for 40 min and were sequentially rinsed twice with distilled water. The explants were immersed in an aqueous ethanol solution (70 %) in an aseptic chamber for 1 min with constant agitation and were then left in the stand for 15 min in a NaOCl solution (2%) with Tween 20 (20 drops/L). The explants were then rinsed with autoclaved distilled water for approximately 3 min. After disinfection, the 1.5 cm explants were inoculated individually in test tubes (2.5 x 15 cm) containing 12 mL of culture medium. The test tubes containing the medium and the explants were sealed with plastic caps without plastic wrap, kept in the dark for eight days and then submitted to a photoperiod of 16 hours of cool white light under a photon flux density of 25 μmol.m⁻².s⁻¹.

Calli characteristics such as consistency, texture, color, and the profile of volatile organic compounds (VOC) were evaluated. The tubes containing contamination were removed from the experiment and evaluations were performed after 20 and 40 days of growth

3.3. CHARACTERIZATION OF METABOLITES PRODUCED IN CALLUS TISSUES

3.3.1. Extraction of volatile organic compounds (VOC)

The VOCs were extracted employing headspace and solid phase micro extraction (Lord and Pawliszyn, 2000) and were analyzed by GCMS. All extractions were carried out in triplicate with 1.0 g of *in vitro* cultivated callus after 20 and 40 days of growth. Briefly, the callus were mashed in a glass vial (12 mL), covered up with an aluminum foil lid and silicone septa and, the sample was kept in repose for 20 min at room temperature. A holder needle with polydimethylsiloxane (PDMS) was then inserted into the sample vial which was heated on a heating plate. All parameters, including the quantity of sample (1 g), equilibrium time (20 min), time of extraction (20 min), temperature of extraction (60°C), desorption temperature (260°C) and fiber type for extractions (PDMS-DVB) were established through univariate and multivariate tests.

The analyses were performed in HRGC-MS equipment (Shimadzu CG-2010 / QP-2010) with the following conditions: an Elite-5 MS Perkin Elmer column (30 m × 0.25 mm; 1 μm film thickness) with a fused silica capillary column; temperature programmed to increase from 50 °C to 80 °C (1.5 °C min⁻¹); temperature increases from 15°C min⁻¹ to 160 °C over a four minute period and 20 °C min⁻¹ to 250 °C over a seven minute period (total time 40.5 min); a transfer line of 250 °C; helium, used as a carrier gas, was adjusted to a linear velocity of 40 cm s⁻¹ (measured at 100 °C) with column flow of 1.22 mL.min⁻¹ the split flow was adjusted to give a ratio of 30:1. The mass detector conditions were: transfer line and ion source temperatures of 250 °C; ionization mode with electron impact at 70 eV.

The VOCs were identified by Kovats retention indices, which were calculated for all volatile constituents using a homologous series of *n*-alkanes C₈–C₃₂ using the same conditions. Quantification was performed using percentage peak area calculations and the identification of individual compartments was done using the NIST 147 Database and was compared with previously published data (ADAMS, 2007).

The evaluation of volatile organic compounds present in the calli of *P. ornatus*, many in low concentrations in these types of samples are multivariate data and therefore were interpreted

using Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA), which are chemometric methods multivariate to identify similarities and tendency of groups of compounds within the different treatments. Thus, a set of data obtained from the analysis of callus extracts of *P. ornatus* on the chromatographic peak area of 74 volatile organic compounds measured in triplicate for 12 different samples was used to construct a 36 x 74 data matrix. Thus, their significance in each treatment was evaluated using a Principal Component Analysis (PCA) Hierarchical Cluster Analysis (HCA) employing the statistical programs Statistic 7.0 (Statistic Inc., USA) and Unscrambler 8.0 (CAMO).

Acknowledgements

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for providing grants and fellowships

REFERENCES

- Abdel-Mogib, M., Albar, H.A., Batterjee, S.M., 2002. Chemistry of the genus *Plectranthus*. *Molecules* 7, 271-301.
- Adams, R. P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas chromatography/Mass Spectroscopy, Allured Publishing Corporation: USA
- Affonso, V.R., Bizzo, H.R., Lima, S.S., Esquibel, M.A., Sato, A., 2007. Solid Phase Microextraction (SPME) analysis of volatile compounds produced by *in vitro* shoots of *Lantana camara* L. under the influence of auxins and cytokinins. *J. Braz. Chem. Soc.* 18(8), 1504-1508.
- Affonso, V.R., Bizzo, H.R., Lage, C.L.S., Sato, A., 2009. Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of *in vitro* plantlets of *Thymus vulgaris* L. *J. Agric. Food Chem.* 57, 6392–6395.
- Avato, P., Fortunato, I.M., Ruta, C., D’Elia, R., 2005. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Sci.* 169, 29–36.
- Charchoglyan, A., Abrahamyan, A., Fujii, I., Boubakir, Z., Gulder, T.A.M., Kutchan, T.M., Vardapetyan, H., Bringmann, G., Ebizuka, Y., Beerhues, L., 2007. Differential accumulation of hyperforin and secohyperforin in *Hypericum perforatum* tissue cultures. *Phytochemistry.* 68, 2670–2677.
- Chen, J., Hammell, D.C., Spry, M., D’Orazio, J.A., Stinchcomb, A.L., 2009. *In vitro* skin diffusion study of pure forskolin versus a forskolin-containing *Plectranthus barbatus* root extract. *J. Nat. Prod.* 72, 769–771.
- Dellar, J.E., Cole, M.,D.,Waterman, P.G., 1996. Antimicrobial abietane diterpenoids from *Plectranthus elegans*. *Phytochemistry* 41, 735-738.
- Figueiredo, N.L., Aguiar, S.R.M.M., Falé, P.L., Ascensão, L., Serralheiro, M.L.M., Lino, A.R.L., 2010. The inhibitory effect of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii* leaves on the viability, glucosyltransferase activity and biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Food Chem.* 119, 664-668.

Gurgel, A.P.A.D., Silva, J.G., Grangeiro, A.R.S., Oliveira, D.C., Lima, C.M.P., Silva, A.C.P., Oliveira, R.A.G., Souza, I.A., 2009. *In vivo* study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). J. Ethnopharmacol. 125, 361-363.

Lane, A., Boecklemann, A., Woronuk, G.N., Sarker, L., Mahmoud, S.S., 2010. A genomics resource for investigating regulation of essential oil production in *Lavandula angustifolia*. Planta 231(4), 835-845.

Lukhoba, C.W., Simmonds, M.S.J., Paton, A.J., 2006. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. J. Ethnopharmacol. 103, 1-24.

Ma, X., Gang, D.R., 2006. Metabolic profiling of *in vitro* micropropagated and conventionally greenhouse grown ginger (*Zingiber officinale*). Phytochemistry 67, 2239-2255.

Maes, K., Debergh, P.C., 2003. Volatiles emitted from *in vitro* grown tomato shoots during abiotic and biotic stress. Plant Cell. Tiss Org Cult. 1, 73-78.

Maes, K., Vercammen, J., Pham-Tuan, H., Sandra P., Debergh, P.C., 2001. Critical aspects for the reliable headspace analysis of plants cultivated *in vitro*. Phytochem. Anal. 12, 153-158.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Phisiol. Plant. 15, 473-497.

Murthy, P.S., Ramalakshmi, K., Srinivas, P., 2009. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. Food Chem. 114, 1014-1018.

Silva, S., Sato, A., Lage, C.L.S., Gil, R.A.S.S., Azevêdo, D.A., Esquibel, M.A., 2005. Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. *in vitro* produced under the influence of growth regulators. J. Braz. Chem. Soc. 16, 1387-1390.

Tisserat, B., Vaughn, S. F., 2008. Growth, morphogenesis, and essential oil production in *Mentha spicata* L. plantlets *in vitro*. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant. 44, 40-50.

Turner G. W., Gershenzon, J., Croteau, R. B., 2000. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiol.* 124, 655-664.

Wellsow, J., Grayer, R.J., Veitch, N.C., Kokubun, T., Lelli, R., Kite, G.C., Simmonds, M.S.J., 2006. Insect-antifeedant and antibacterial activity of diterpenoids from species of *Plectranthus*. *Phytochemistry* 67, 1818-1825.

Williams, M., Morales, M.T., Aparicio, R., Harwood, J.L., 1998. Analysis of volatiles from callus cultures of olive *Olea europaea*. *Phytochemistry* 47, 1253-1259.

Zhao, P., Iwamoto, Y., Kouno, I., Egami, Y., Yamamoto, H., 2004. Stimulating the production of homoisoflavonoids in cell suspension cultures of *Caesalpinia pulcherrima* using cork tissue. *Phytochemistry* 65, 2455-2461.

RT	RI	KI	COMPOUND	% Area							% Area					
				20 days							40 days					
				NAA (µM)			2,4-D (µM)			Control	NAA (µM)			2,4-D (µM)		
				2.68	5.37	10.1	2.26	4.52	9.0	MS 0	2.68	5.37	10.1	2.26	4.5	
7.761	917	931	α -thujene	0.0	0.0	1.0	7.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
8.074	926	939	α -pinene	2.3	3.4	2.9	0.0	2.4	2.1	9.0	1.7	2.2	2.1	2.8	0.0	
8.869	941	953	Camphene	2.1	3.2	2.8	0.0	2.4	0.0	8.0	1.4	2.1	0.8	2.6	0.0	
10.03	972	976	Sabinene	1.8	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.9	1.2	1.9	0.0	0.0	
10.26	977	980	β -pinene	2.4	4.2	4.0	0.0	3.1	0.0	2.0	2.2	2.8	2.8	3.4	0.0	
10.535	976	978	1-octen-3-ol	0.0	0.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
11.523	995	993	3-octanol	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
13.69	1033	1031	α -limoneno	6.4	13.9	10.6	0.0	8.0	0.0	15.3	4.2	5.7	2.8	6.6	0.0	
17.63	1087	1088	Terpinolene	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	1.4	0.0	0.0	
22.27	1133	1165	(-)-borneol	1.6	3.9	3.1	0.0	2.4	0.0	2.7	1.1	1.7	0.0	3.7	0.0	
22.503	1135	1136	p-menth-1-ol, cis	0.5	1.2	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	2.5	0.0	
23.051	1141	1144	p-menth-8-ol	0.7	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.6	0.5	0.0	0.0	0.0	
23.218	1142	1204	Decanal	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1,1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
23.452	-	-	n-octyl acetato	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
24.751	1287	1285	Isobornyl acetato	17.8	2.9	6.2	0.0	1.3	0.0	15.6	17.4	19.3	20.8	0.0	0.0	
25.626	1356	1350	α -terpinyl acetate	52.9	56.0	59.5	76.5	73.8	88.5	31.3	65.8	52.0	57.2	72.3	97,3	
26.385	1408	1403	β -isocumene	2.0	3.0	1.7	0.0	2.4	2.2	3.7	0.8	1.5	2.0	3.9	2.7	
26.478		1409	Decanol acetato	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0	
26.618	1420	1418	β -caryophyllene	0.8	1.1	0.0	16.2	0.0	0.0	1.4	0.4	0.3	0.0	0.0	0.0	
26.964	1441	1443	β -farnesene <z>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	
27.208	1454	1454	α -humulene	2.1	2.0	1.6	0.0	2.1	0.0	3.3	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	
28.607	1532	1528	Kessane	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.2	3.3	0.0	0.0	
8.825	1543	1545	Sesquisabinene hydrate	1.4	1.9	2.0	0.0	1.7	0.0	1.6	1.3	1.5	2.4	2.2	0.0	

Table 1. VOC (% area) present in the calli of *P. ornatus*

RT	RI	KI	COMPOUND	Área %
5.123	854	854	2-hexenal	0.50
7.761	917	931	α -thujene	13.64
8.074	926	939	α -pinene	9.97
10.033	972	976	Sabinene	5.46
10.260	977	980	β -pinene	3.09
10.535	976	978	1-octen-3-ol	9.23
11.031	992	991	β -myrcene	0.40
11.523	995	993	3-octanol	0.81
12.037	1005	1004	Hexenol, acetate, (z)-	0.16
13.697	1033	1031	α -limoneno	0.43
13.983	1038	1040	(z)- β -ocimene	0.21
14.674	1048	1050	(e)- β -ocimene	2.54
23.218	1142	1204	Decanal	0.10
25.524	1356	1351	α -cubeben	0.69
25.940	1381	1376	α -copaen	1.59
26.066	1389	1384	β -bourbonen	0.88
26.115	1392	1390	β -cubebene	1.35
26.209	1397	1409	α -gurjunene	1.75
26.618	1420	1418	β -caryophyllene	30.34
26.767	1429	1432	β - gurjunene	0.41
26.867	1434	1433	β -farnesene <z>	0.15
27.014	1444	1460	muurolo-4(14),5-diene<cis>	0.14
27.191	1454	1458	β -farnesene<e>	0.18
27.208	1454	1454	α -humulene	1.82
27.433	1468	1461	Alloaromadendrene	0.19
27.505	1471	1477	γ -muurolene	0.08
27.641	1479	1480	Germacrene D	8.20
27.815	1489	1485	β -selinene	0.25
27.920	1494	1490	B-guaiene	0.29
27.99	1498	1500	B-guaiene <trans>	3.77
29.636	1586	1574	germacrene- D-ol	0.58
29.770	1592	1581	caryophyllenoxide	0.72
30.716	1641	1641	α -muurolol <epi	0.08

Table 2. COV (% area) observed in mother plants (*ex vitro*) of *P. ornatus*

Figure 1. Correlation between quantities of α -terpinyl acetate and monoterpene present in VOCs of *P. ornatus*

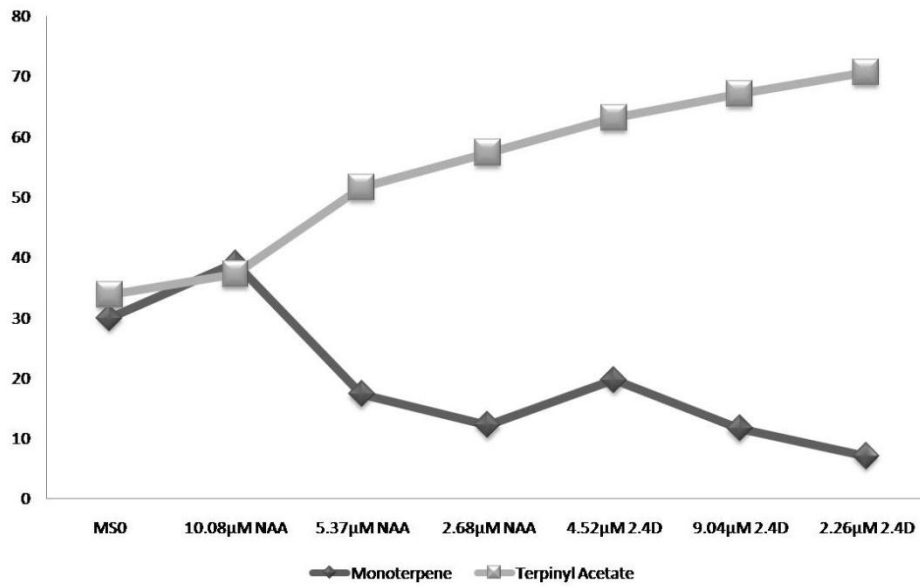
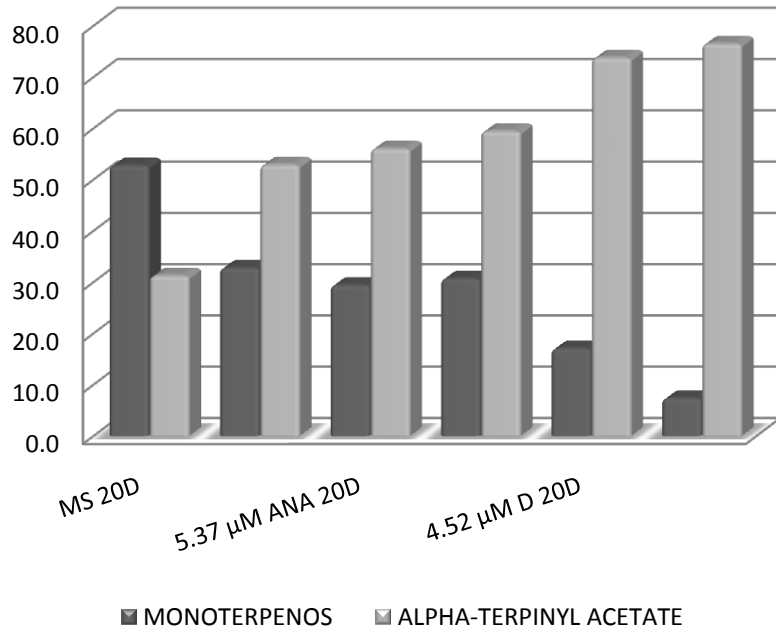


Figure 2. PCA scores for PC1 x PC2; each point represents a sample of valuated oil

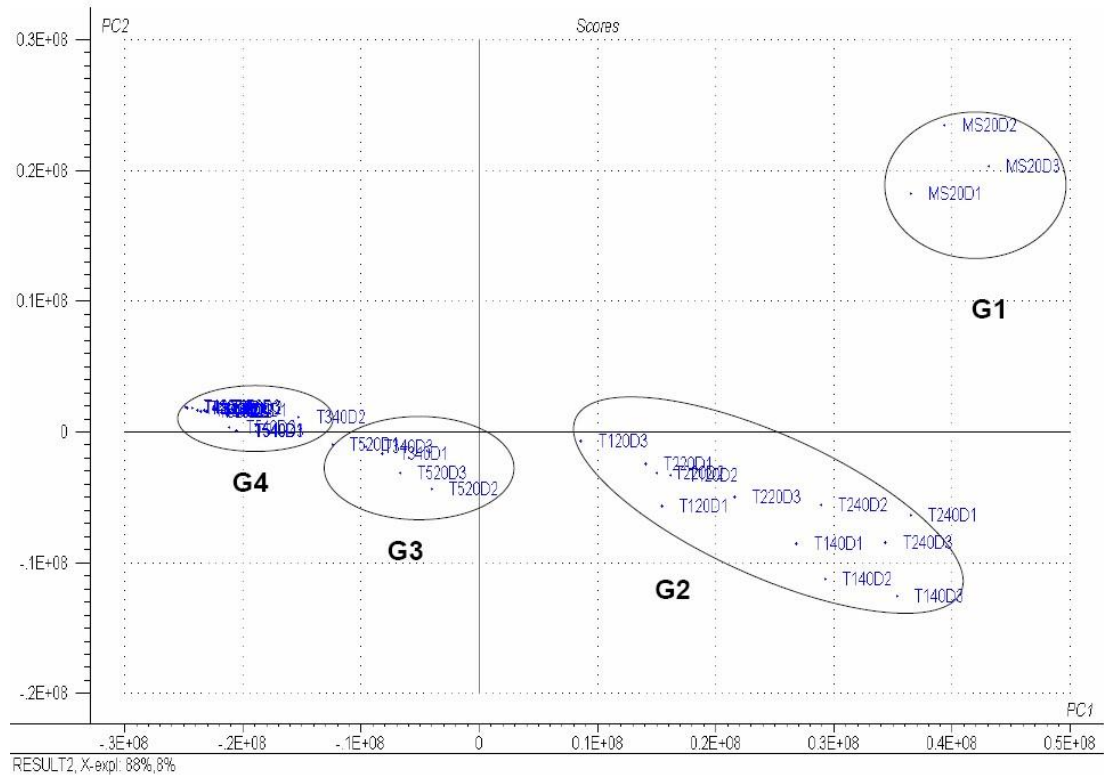


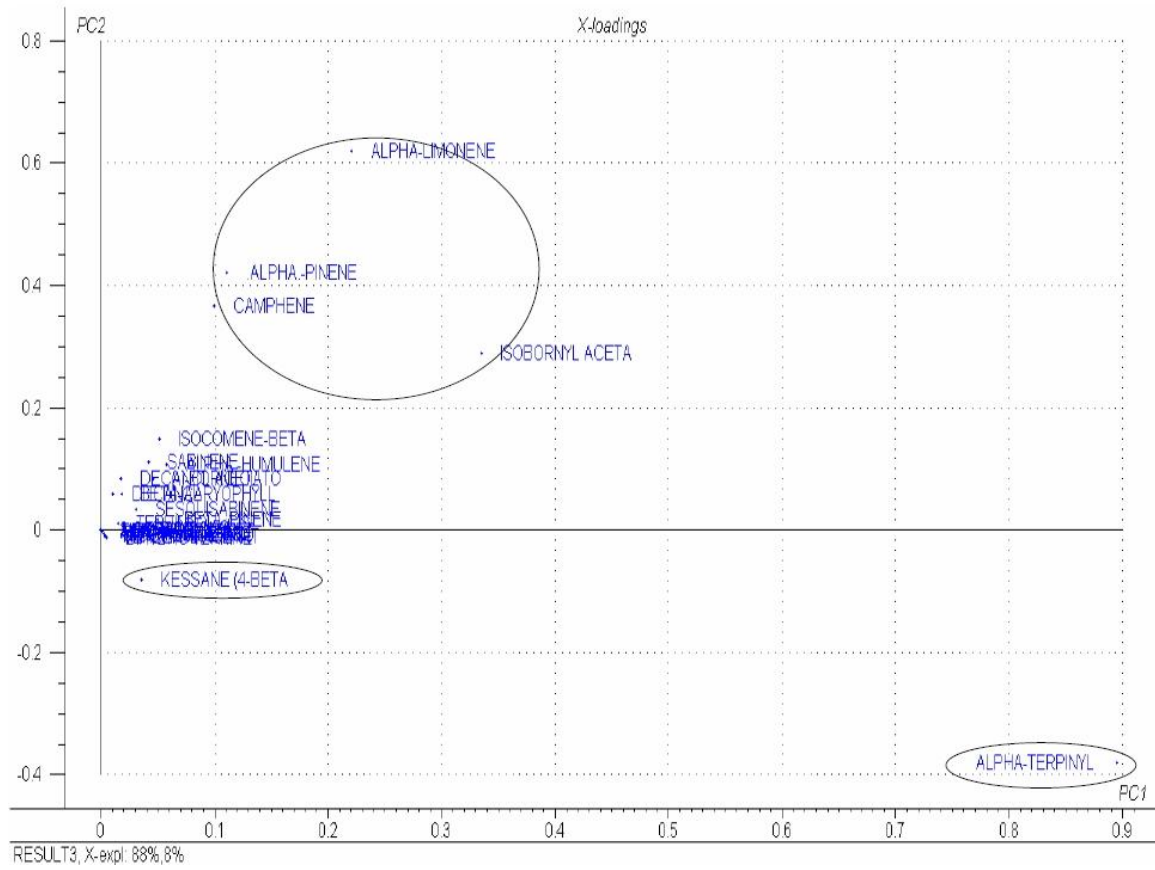
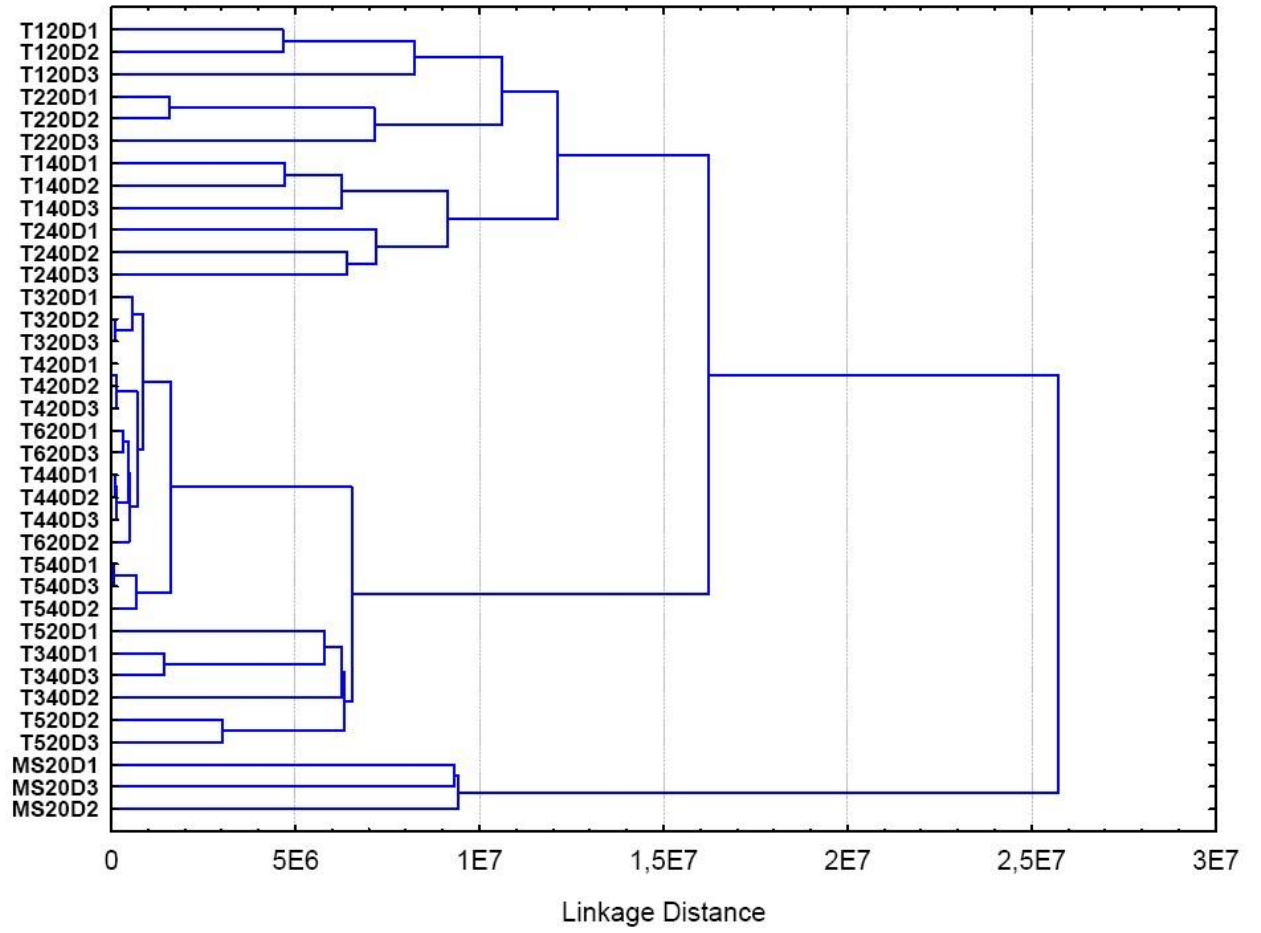
Figure 3. Graph of PCA loadings for PC1 x PC2

Figure 4. HCA dendrogram



Capítulo 4

Influência dos reguladores de crescimento na produção de óleos essenciais e na distribuição de tricomas em plantas micropropagadas de *Plectranthus ornatus* Codd. (Lamiaceae)²

² Artigo para ser submetido ao Journal of Experimental Botany

Influência dos reguladores de crescimento na produção de óleos essenciais e na distribuição de tricomas em plantas micropropagadas de *Plectranthus ornatus* Codd. (Lamiaceae)

Helna C. Passinho-Soares^{a,b}, Paulo R. R. Mesquita^c, Frederico de M. Rodrigues^d, José Raniere F. de Santana^b, Fábio S. de Oliveira^e, Jailson B. de Andrade^c, Jorge M. David^c, Juceni P. David^{a*}.

^aLaboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170-290, Salvador (BA), Brazil., Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170290, Salvador (BA), Brazil

^bPrograma de Pós- graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44031-460, Feira de Santana (BA), Brazil

^cInstituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170290, Salvador (BA), Brazil

^dEmpresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A, 40170-110, Salvador (BA), Brazil

^eCentro de Ciências da Saúde , Universidade Federal de Recôncavo Baiano, 44574-490 , Santo Antonio de Jesus, (BA), Brazil

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +55-71-32359350. Fax: + 55-71-

RESUMO

A espécie *Plectranthus ornatus* Codd é utilizada pela população nos tratamentos relacionados à dispepsia, problemas estomacais e hepáticos.

O perfil dos óleos voláteis foi avaliado em plantas cultivadas em meio Murashide & Skoog, suplementado com diferentes concentrações de BAP (4.5, 9.0, e 18.0 μM) + ANA (5,37 μM) e KIN (4.7, 9.3, e 18.5 μM)+ANA(5,37 μM), como controle, foi utilizado o meio MS0. As análises com microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas com amostras foliares do terceiro nó das plantas com 90 dias submetidas ao tratamento com 4.5 e 9.0 μM de BAP e 4.7 e 9.3 μM de KIN. Para determinação do perfil dos COV, plantas com idade de 30, 60 e 90 dias, foram submetidas à microextração por fase sólida (HS-MEFS). Assim, foram encontrados para as plantas *in vitro* 62 compostos voláteis, constituídos basicamente por mono e sesquiterpenóides. Os componentes majoritários do óleo essencial por tratamento e por idade foram α -thujeno (12.7-32.7 %), α -pineno (5.5-23 %), sabineno (7.51-17.8 %), β -pineno (3.5-11.6 %), 1-octen-3-ol (0.6-11.1 %), 3-carene (0.84-5.6 %), (*E*) β -ocimene (1.5-8.4 %), acetato de α -terpinil (1.3-13.2 %), β -cariofileno (3.9-13.6 %) e germacreno D (0.3-18.5 %). A análise de PCA e HCA possibilitou identificar quatro agrupamentos entre as amostras dentro dos diferentes tratamentos estudados, a partir dos compostos identificados neste conjunto de amostras. A análise dos COV foi realizada através de CGAR-EM. A identificação dos constituintes químicos foi efetuada através da determinação dos índices de Retenção e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com dados da literatura e a biblioteca eletrônica disponível no equipamento. O perfil dos compostos orgânicos voláteis presentes no *Plectranthus ornatus* foram interpretados utilizando-se Principal Component Analysis (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA). A análise morfoanatômica dos tricomas por MEV possibilitou a identificação de tricomas não glandulares, quatro tipos de tricomas glandulares capitados e tricomas glandulares peltados, distribuídas em ambas as superfícies do limbo foliar. Observou-se que os reguladores influenciam no perfil qualitativo e quantitativo dos COV e no número e na distribuição dos tricomas no limbo foliar.

Palavras-chave: *Plectranthus ornatus*, Lamiaceae, óleos essenciais, cultivo *in vitro*, tricomes, plant growth regulators.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Plectranthus ornatus* Codd, (Lamiaceae) tem demonstrado ser uma rica fonte de diterpenos, particularmente das classes abietano, labdano e neoclerodano. É uma erva perene e suculenta, de aroma agradável conhecido no Brasil como "boldo-miudo", e "boldo-de-jardim" e comumente usada como planta ornamental nos jardins brasileiros. Além disso, as folhas de *P. ornatus* são utilizadas no tratamento de problemas hepáticos e estomacais, como alternativa ao *Plectranthus barbatus* (falso-boldo), também utilizado para o mesmo fim terapêutico.

Algumas pesquisas sobre a química de algumas espécies do gênero *Plectranthus* tem sido realizadas e terpenóides e fenólicos foram identificadas como produtos típicos dessas espécies. Sendo que os terpenóides são considerados os principais responsáveis pelas atividades citotóxicas, genotóxica, antifúngica, anti-microbiana dos *Plectranthus*.

Estudos fitoquímicos em algumas espécies de *Plectranthus* revelaram a presença de diterpenos dos grupos abietano, filocladano, karanos, clerodano e labdano e, triterpenoides dos grupos lupano, aristolano, bem como, sesquiterpenos e flavonóides (ABDEL-MOGIB *et al.* 2002; GASPAR-MARQUES *et al.* 2004, 2005, 2006 LUKHOBA *et al.* 2006).

Foi reportada a presença de diterpenóides, semelhantes à forskolina, em folhas de *P. ornatus*, sendo que dois desses constituintes apresentavam atividade antifúngica e antibacteriana frente à *Candida* e bactérias Gram positiva e Gram negativa (RIJO *et al.* 2002). Além disso, foi demonstrada a atividade antioxidante do óleo essencial de folhas de *P. grandis* e *P. ornatus* cultivadas no nordeste do Brasil e, detectada a presença majoritária de β -cariofileno, eugenol, germacreno D e timol em *P. ornatus* (ALBURQUERQUE *et al.* 2006).

O estudo da micropropagação, cultura de células e tecidos vegetais de espécies medicinais é utilizado para resolver ou minimizar problemas quantitativos e qualitativos nos metabólitos secundários relacionados com fatores ambientais, variabilidade genética. Parece haver estreita correlação entre diferenciação morfológica das células e diferenciação bioquímica, que permite o estabelecimento de rotas metabólicas levando à biossíntese de compostos secundários (TURNER *et al.*, 2000, TISSERAT E VAUGHN, 2008). Isto é particularmente

constatado na produção de terpenos, em glândulas especializadas no interior ou nas superfícies dos órgãos. Culturas ausentes destas estruturas parecem não ser competentes na acumulação destes produtos (KIRASKOYAN 2006, Tsuru *et al.*, 2001). Algumas espécies de Lamiaceae têm sido investigadas devido ao conteúdo de óleos essenciais *in vitro*, os quais são largamente na indústria farmacêutica, de perfumes e cosméticos (Güllüce *et al.* 2003; Avato *et al.* 2005; HAKKIM *et al.* 2007).

Este trabalho mostra o efeito dos reguladores de crescimento no perfil dos compostos orgânicos voláteis obtidos pelo cultivo *in vitro* de *Plectranthus ornatus* Codd e avaliadas por HS-SPME-CG-MS, bem como o efeito desses reguladores na diferenciação das folhas avaliando possíveis alterações morfológicas por meio de microscopia eletrônica de varredura-MEV. É importante ressaltar que apesar do grande número de estudos, principalmente ultraestruturais e histoquímicos em tricomas glandulares de muitas espécies (VALENTI *et al.*, 1997, ASCENSÃO *et al.* 1999 Anačkov *et al.* 2009), os estudos *in vitro* são raros (AVATO *et al.* 2005) e em se tratando da espécie *Plectranthus ornatus in vitro*, este estudo é inédito.

2. MATERIALS e MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Os explantes foram retirados de plantas matrizes cultivadas em canteiros da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). O material herborizado encontra-se depositado no Herbário do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número R196538

2.2 CULTIVO *IN VITRO*

Foram selecionados segmentos nodais contendo gemas axilares, dos quais foram retiradas as folhas. Para desinfecção dos explantes, estes foram lavados em água corrente por 40 min, seguidos de duas lavagens com água destilada. Em câmara asséptica os explantes foram imersos em álcool 70%GL por 1 minuto com agitação e em seguida, permaneceram por 15 min em hipoclorito de sódio (produto comercial 2.0% cloro ativo) + Tween 20 (20 gotas/L). A seguir foram enxaguados por três vezes com água destilada autoclavada (3 minutos em cada). Após a desinfecção, os explantes com aproximadamente 1.5 cm foram inoculados individualmente em tubos de ensaio (25x150mm) contendo 12 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) solidificado com 6 g.L de Agar, 87.64 mM sacarose, suplementado com diferentes concentrações de BAP (4.5, 9.0, e 18.0 μM) + ANA (5,37 μM) e KIN (4.7, 9.3, e 18.5 μM)+ANA(5,37 μM), como controle, foi utilizado o meio MS sem adição de reguladores (MS0). O pH do meio foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem, e a esterilização feita em autoclave a 120 °C durante 15 minutos. A incubação foi realizada em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade média em torno de 70%. Os tubos de ensaio contendo o meio e o explante foram fechados com tampa plástica sem película de PVC, mantidos no escuro por oito dias e posteriormente submetidos à fotoperíodo de 16 horas luz branca fria sob $25 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradiância. As plantas foram avaliadas quanto ao perfil dos compostos orgânicos voláteis (COV) aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação.

2.3 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS COV

Para extração e análise dos COV, foram empregadas as técnicas de headspace e microextração em fase sólida – MEFS (PAWLISZYN, 1997; LORD & PAWLISZYN, 2000), associada à CGAR-EM (EICEMAN *et al.*, 2002; SANTOS & GALCERAN, 2002). Todas as extrações foram realizadas em triplicata com aplicação de massa idêntica de 1,0 g da parte aérea da planta *in vitro* com idade de 30, 60 e 90 dias. Inicialmente a parte aérea foi macerada com bastão em um recipiente de vidro com capacidade para 12 mL. Em seguida o frasco foi lacrado com uma tampa de alumínio e septo de silicone faceado com teflon, utilizando-se de

lacrador apropriado e a amostra mantida em repouso 20 minutos à temperatura ambiente no intuito de prover o seu equilíbrio com a fase vapor do recipiente. Em seguida a agulha do “holder”, portador da fibra Polidimetilsiloxano (PDMS), previamente selecionada foi introduzida no “headspace” do recipiente, onde a fibra foi exposta e levada à placa aquecedora com temperatura controlada e com um bloco de alumínio sobreposto. Posteriormente, após o tempo de extração e aquecimento, a fibra foi recolhida no próprio microextrator de MEFS e introduzida diretamente no injetor do cromatógrafo. Os parâmetros de extração, tais como, volume da amostra (1g), tempo de equilíbrio (20min), tempo de extração (15 min), temperatura de extração (60°C), tempo de dessorção (5 min), temperatura de dessorção (260 °C) e fibra de extração (PDMS-DVB) foram estabelecidos a partir de ensaios univariados e multivariados.

As análises foram conduzidas em sistema CGAR-EM (Shimadzu CG-2010/QP-2010 de alta eficiência, acoplada a detector de Massa Quadrupolo). As condições cromatográficas foram estabelecidas a partir de trabalhos descritos na literatura e da experiência do grupo de pesquisa na análise de COV, após a realização de uma série de ensaios univariados visando à obtenção das condições que permitissem a adequada separação dos compostos de interesse. Desta forma utilizou-se a velocidade do gás de arraste em 40 cm.s⁻¹, vazão do gás de arraste na coluna de 1.22 mL.min⁻¹, modo de injeção, split com taxa de 1:30, temperatura do injetor de 260 °C e Gradiente de temperatura do forno com 50 °C (0.0 min), 1.5 °C min⁻¹ até 80 °C (0,0min); 15 °C min⁻¹ até 160 °C (4min); 20 °C min⁻¹ até 250 °C (7 min), linha de transferência: 250 °C; fonte de íons: 250 °C; energia de impacto: 70 eV, perfazendo o tempo total de corrida de 40,5 minutos.

Os componentes do óleo essencial foram identificados com base no índice de retenção (IR), determinados através da utilização de curva de calibração com série homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₃₂) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com dados da literatura. (ADAMS, 2007), e com os dados de espectros contidos na biblioteca eletrônica NIST 147, disponível no equipamento.

A avaliação do perfil dos compostos orgânicos voláteis presentes nas plantas *in vitro* de *Plectranthus ornatus*, muitos deles em concentrações baixas nestes tipos de amostras constituem dados multivariados e, por isso, foram interpretados utilizando-se Análise do Componente Principal - ACP (*Principal Component Analysis* – PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA), que são métodos quimiométricos multivariados para identificar similaridades e grupos de tendência dos compostos dentro dos diferentes tratamentos estudados.

2.4 ANÁLISES MULTIVARIADAS DO CONJUNTO DE DADOS

PCA e HCA foram usadas na avaliação de um conjunto de dados obtido a partir dos perfis de COV por HS-MEFS-CGAR-EM de plantas *in vitro* de *Plectranthus ornatus* submetidas a diferentes tratamentos. As áreas dos picos cromatográficos de 64 compostos orgânicos voláteis avaliados em 21 diferentes amostras sendo que 20 amostras com três réplicas e uma amostra com duas réplicas foi empregado para construção de uma matriz de dados 62 x 64. Os pacotes quimiométricos Unscrambler 8.0 (CAMO) e Statistica 7.0 (Statsoft) foram empregados nos cálculos envolvendo PCA e HCA, respectivamente.

2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas com amostras foliares do terceiro nó das plantas com 90 dias cultivadas em meio contendo BAP nas concentrações de 4.5 e 9.0 μM e KIN nas concentrações 4.7 e 9.3 μM , com ambas as citocininas associadas com 5,37 μM (ANA). O controle utilizado foi o meio MS sem adição de reguladores (MS0). O material foi fixado em F.A.A. [formaldeído 37 %, ácido acético glacial, etanol 70 % (2:1:1)] e posteriormente desidratados em soluções crescentes de acetona. Posteriormente, os espécimes foram levados à secagem ao ponto crítico com CO_2 líquido (BAL-TEC CPD 030),

metalizados (BAL-TEC SCD 050) e examinados em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

3. RESULTADOS

Os componentes dos óleos essenciais de *P. ornatus* Codd obtidos de plantas cultivados *ex vitro* e *in vitro* com as diferentes concentrações das citocininas BAP e KIN e, com idade de 30 (30D), 60 (60D) e 90 dias (90D) de inoculação, reconhecidos por meio de HS-SPME-CGAR/MS estão representados na Tabela 1. Assim, foram encontrados para as plantas *in vitro* 62 compostos voláteis, constituídos basicamente por mono e sesquiterpenóides. Os componentes majoritários do óleo essencial por tratamento e por idade foram α -thujeno (12.7-32.7 %), α -pineno (5.5-23 %), sabineno (7.51-17.8 %), β -pineno (3.5-11.6 %), 1-octen-3-ol (0.6-11.1 %), 3-carene (0.84-5.6 %), (*E*) β -ocimene (1.5-8.4 %), acetato de α -terpinil (1.3-13.2 %), β -cariofileno (3.9-13.6 %) e germacreno D (0.3-18.5 %). Dentro de cada tratamento, e em cada período analisado (30D, 60D e 90D) foram encontradas variações qualitativas e quantitativas. Em relação à variação quantitativa observa-se no Gráfico 1 que maior média das áreas absolutas dos COV obtidas pelo CG-EM em todos os tratamentos dentro de cada idades, foi observado para as plantas cultivadas no meio MS0 independente do período. Enquanto que, nas plantas cultivadas com reguladores os maiores valores de COV foram obtidos com os tratamentos 4.5 μ M e 18.0 μ M de BAP e 18.5 μ M de KIN nas plantas com 60D, bem como, 4.5 μ M e 9.0 μ M de BAP e 18.5 μ M de KIN para as plantas com 90D.

Analisando os diferentes tratamentos dentro de cada idade (Tabela 1) observa-se que para as plantas com 30D os COV majoritários são α -pineno (18.9%), 1-octen-3-ol (4.4%) e (*E*) β -ocimene (4.9%) e, alcançam as maiores concentrações, quando cultivadas em MS0 (Tabela 1). A produção de sabineno (15.0%) e α -limoneno (15.2%) nas plantas de 30D independe da presença de reguladores, tendo em vista que as suas concentrações não diferem de maneira expressiva com o tratamento usando 9.0 μ M de BAP. Além disso, os COV das plantas cultivadas apenas em MS0 apresentam também as maiores concentrações de 2-hexenal (2.4%), β -mirceno (1.28%), 1,8-cineol (0.3%), (*Z*) β -ocimene (0.2%), 4-thujanol (0.3%), β -linalool (0.51%), *p*-menth-8-ol (0.2%) e α -copaeno (0.9%).

Do ponto de vista qualitativo pode ser observado exclusivamente a presença de β -selineno, α -selineno, β -guaiano, α -himachaleno, γ -muuroleno e γ -cadineno nas plantas cultivadas em MS0 (Tabela 1) com 30D. Enquanto que, nesse mesmo tratamento e período foi observada a maior quantidade de α -cubebeno, β -gurjuneno, cis-muurolo-4(14),5-diene. Por outro lado, foram detectados exclusivamente nos COV de plantas cultivadas em BAP, o isoterpinoleno, terpinoleno nas plantas com 30D, allo-aromadendreno nas plantas de 60D e, β -himachaleno nas plantas com as três idades. Nas plantas cultivadas em KIN foram detectadas com exclusividade o acetato de hexenol, β -isocumene, γ -himachaleno, β -cucurmeno e α -selineno.

Comparando as concentrações dos COV dentro de cada tratamento em relação às idades (Tabela 1 e Gráfico 1) verifica-se que as plantas com 60 e 90 dias alcançaram o maior percentual na concentração total dos compostos, especialmente para aquelas submetidas ao tratamento com MS0, 4.5 μ M de BAP e 18.5 μ M de KIN.

Na Tabela 1 estão relacionados também os 33 COV presentes na planta matriz (*ex vitro*), cujos compostos majoritários (>1 %) são α -thujene (13.6 %), α -pineno (~10 %), sabineno (5.5 %), β -pineno (3.1 %), 1-octen-3-ol (9.2 %), (*E*)- β -ocimeno (2.54 %), α -copaeno (1.6 %), β -cubebeno (1.4 %), α -gurjuneno (1.8 %), β -cariofileno (30.3 %), α -humuleno (1.8 %), germacreno D (8.20 %) e trans- β -guaiano (3.8 %). Nota-se que há alteração qualitativa e quantitativa no perfil dos compostos voláteis das plantas *ex vitro* frente aos COV das plantas *in vitro*. Comparando os resultados percentuais dos COV majoritários das plantas *ex vitro* com os percentuais dos COV das plantas *in vitro* no meio de cultivo sem qualquer influência de reguladores de crescimento (MS0) nos diferentes períodos observa-se que houve rendimento percentual de 14 % e 21 % no conteúdo de α -thujeno nas plantas com 30D e 60D respectivamente. Enquanto que, para o α -pineno o rendimento percentual nos períodos analisados (30D, 60D e 90D) foi de 89.6 %, 87.2 % e 68.5 % respectivamente, para o sabineno o ganho foi de respectivamente 172.7 %, 223.6 % e 85.5 %. Ao passo que para o β -pineno o rendimento foi de 135.5%, 141.9% e 109.7%, para o (*E*) β -ocimeno foi 96%, 116% e 104% e para o germacreno-D o rendimento foi de 13.4%, 9.8% e 82.95%. Contudo houve uma perda percentual expressiva no conteúdo de β -cariofileno nas plantas *in vitro* obtidos com o meio MS0, de aproximadamente 522 % frente ao conteúdo desse composto nas plantas *ex vitro*. A expressiva produção de cariofileno pode estar relacionada a fatores de stress bióticos e abióticos aos quais estão submetidas às plantas *ex vitro*. Estudos sobre a

síntese de β -cariofileno em resposta a ataques de herbívoros foi desenvolvida por köllner *et al.*(2008).

Comparando-se os resultados dos COV das plantas *ex vitro* com os melhores resultados dentro de cada tratamento nas três idades com as plantas *in vitro*, nota-se que o rendimento percentual dos COV alcançados *in vitro* é expressivamente maior do que os obtidos no COV *ex vitro*, chegando a representar um ganho percentual superior a 370 %, tal como no caso do β -pineno.

Confrontando o perfil cromatográfico dos COV *in vitro* e *ex vitro* (Tabela 1, Gráfico 1) pode-se observar a alteração qualitativa e quantitativa dos COV independentes do uso de reguladores (MS0) que favorecem ao cultivo *in vitro*, exceto para o β -cariofileno cujo percentual nas plantas *ex vitro* é significativamente maior. Todavia, levando-se em consideração a presença de reguladores no meio de cultivo, observa-se que no período de 60 e 90 dias os reguladores BAP e KIN na concentração de 4,5 μ M e 18.5 μ M respectivamente influenciam positivamente no perfil qualitativo e quantitativo dos COV.

Estudos com *Lavandula viridis* (GONÇALVES *et al.*, 2008), *Lantana camara* L.(AFFONSO *et al.*, 2007) e *Melissa officinalis* L. (Silva *et al.*,2005) demonstraram que o teor de óleos essenciais detectado *in vitro* são superiores do que os de plantas cultivadas *ex vitro*. Resultados positivos quanto a o incremento na produção de COV sob a influência de citocininas foram observados para *Thymus vulgaris* L (AFFONSO *et al.* 2009) e *Lavandula dentada* (SUDRIÁ *et al.*,1999).

Vale ressaltar que embora os sistemas de defesa das plantas superiores estejam relacionados à adaptação e às exigências do seu ambiente natural, observa-se que eles também podem ser ativados em condições de cultivo *in vitro* (TREAGEAR *et al.*, 2002).

A Figura 1 representa o gráfico dos *scores* (PC1xPC2) para os reguladores. Cada ponto representa um determinado tratamento. A avaliação do gráfico dos *scores* expõe a formação de um grupamento com perfil cromatográfico significativamente similar (G1). Enquanto os outros grupamentos identificados (G2, G3 e G4) são compostos pelos tratamentos que apresentam maiores dispersões nos seus perfis cromatográficos.

O grupamento G1 inclui os tratamentos 18,5 μM de KIN (T230D), 9.3 μM de KIN (T330D), 4.7 μM de KIN (T430D), 4.5 μM BAP (T530D), 9.0 μM BAP (T630D), 18 μM BAP (T730D) com 30 dias (30D) e a planta *ex vitro* (PMAE).

O grupo G2 compreende os tratamentos 4.5 μM BAP com 60 dias (60D) e 18 μM BAP com 90 dias (90D) codificados como T560D e T790D, respectivamente.

O grupo G3 é composto pelas amostras MS0 com 30, 60 e 90 dias, respectivamente codificado como T130D, T160D e T190D, além das amostras 18,5 μM de KIN (T260D), 9.3 μM de KIN (T360D) com 60 dias e 4.7 μM KIN (T490D), bem como 4.5 μM BAP (T590D) com 90 dias.

A Figura 2 ilustra o gráfico dos *loadings* (PC1xPC2) onde cada ponto representa um COV. A partir dos resultados obtidos no gráfico dos *loadings* verifica-se que a grande maioria dos COV apresenta valores de *loadings* próximos de zero, o que indica que estes contribuem pouco para a variabilidade do conjunto de dados e, os valores das áreas dos picos destes COV encontram-se aproximadamente constantes nos experimentos.

Na Figura 2 observa-se que as réplicas contidas em G2, G3 ou G4 não apresentam similaridade nos perfis cromatográficos comparáveis a daquelas que compõem o grupo G1, no dendograma obtido a partir da Análise Hierárquica de Grupamentos (Figura 3).

O grupo G4 abrange os tratamentos 9.0 μM BAP com 60 e 90 dias codificados como T660D, T690D e 18 μM BAP (T760D), além dos tratamentos com 18,5 μM de KIN (T290D), 9.3 μM de KIN (T390D), 4.7 μM de KIN (T460D).

Realizando uma avaliação conjunta dos resultados apresentados nas Figuras 1 e 2, verifica-se que o grupo de amostras G2 encontra-se no mesmo quadrante do que o α -terpenil, o que indica que os tratamentos agrupados em G2 apresentam em média teores de α -terpenil levemente mais baixos em relação aos demais tratamentos.

De forma similar, o grupo do tratamento G3 encontra-se no mesmo quadrante do gráfico que COV α -pineno, sabineno, β -pineno, (*E*) β -ocimeno, sendo que neste caso os elevados valores de *loadings* indicam que em média os teores destes COV são muito mais elevados nos tratamentos do grupo G3 que nos demais.

Os altos valores dos *loadings* dos COV α -thujeno, germacreno D, 1-octen-3-ol, e 3-careno, que se encontram no mesmo quadrante que do tratamento contido em G4, indicam correlação certa entre este grupo com estes COV e, que os níveis destes compostos, em média são mais elevados no grupo G4 do que nos demais.

Dentre os COV que se encontram no mesmo quadrante que os tratamentos do grupo G1, β -isocumeno, selina-3,7(11)-dieno, α -gurjuneno, apresentam os valores de *loadings* muito baixos, indicando que há pouca variação dos seus níveis em todo o conjunto de dados avaliado.

Na Figura 3 está ilustrado o dendograma obtido a partir da Análise Hierárquica de Grupamentos (HCA). Os resultados obtidos por HCA quando comparados aos resultantes do PCA são concordantes quanto à similaridade dos tratamentos do grupo G1, que apresentam grande similaridade nos níveis dos diferentes COV estudados. Por outro lado, a grande dispersão dos *scores* dos níveis dos COV estudados nos demais tratamentos, inclusive a dispersão durante réplicas, reflete a dificuldade de definir outros agrupamentos além de G1 por HCA. Os dados obtidos por HCA indicam que os tratamentos que não fazem parte do grupo G1 podem ser enquadrados em um grande grupamento. Contudo estes resultados não discordam dos obtidos por PCA, uma vez que nesta última técnica os grupamentos são realizados por inspeção visual e arbítrio do avaliador humano. Sendo assim, mesmo por PCA

pode ser considerada a existência de apenas dois grupos, aqueles pertencentes a G1 (muito mais similar entre si) e os demais tratamentos reunidos em outro grande grupo.

Assim, pode ser inferido que o melhor meio para a produção dos COV em *P. ornatus in vitro* foi o MS0 (controle) seguido dos tratamentos com 4,5 μM de BAP e 18.5 μM de KIN.

Na análise por MEV observou-se que o indumento *P. ornatus in vitro* consiste de tricomas não glandulares (tectores simples) e tricomas glandulares capitados e peltados, distribuídas em ambas as superfícies do limbo foliar.

Foram observados três tipos de tricomas não glandulares. Tipo I (Figura 4 A) tricoma tector simples, curto, bicelular unisseriados com ápice agudo e superfície granulosa, disposto sobre uma base larga, uni ou bicelular e de superfície lisa. Tricoma semelhante foi observado para a espécie *Micromeria marginata* (Moon *et al.*, 2009). Tricoma não glandular tipo II (Figura 4 B-C) medem de 75 a 500 μm de comprimento, são unisseriados, multicelulares, formados por três a oito células de superfície granulosa e dispostos sobre uma célula basal de superfície lisa, com 40 μm de largura. Observa-se na Figura 4 A-C que a união de cada célula que forma o pedúnculo é nitidamente marcada. A presença deste tipo de tricoma esta de acordo aos encontrados por Ascensão e Castro (1999) com o estudo de tricomas em *P. ornatus in vivo*. Tipo III, tricoma não glandular, simples, unicelular de superfície lisa e ápice arredondado, disposto sobre uma base unicelular (Figura 4D).

Os tricomas glandulares peltados localizados na face abaxial das folhas são constituídos por uma célula basal e uma ampla cabeça arredondada medindo de 60 a 100 μm de altura e 45 a 70 μm de diâmetro (Figura 4 E), composta por oito células secretoras dispostas em círculo (Figura 4 F).

Baseado na morfologia da cabeça glandular e nas dimensões do pedúnculo, quatro tipos de tricomas glandulares capitados foram identificados. Tipo I (Figura 5 A-C), tipo II (Figura 5 D-G), tipo III (Figura 5 H-I) e tipo IV (Figura I). Os tricomas captados tipo I, possuem cabeça glandular arredondada unicelular (Figura 5 A) ou bicelular (Figura 5 B) e pedúnculo curto

unicelular ou multicelular (Figura 5C). Os tricomas captados tipo II possuem pedúnculo unicelular cônico de comprimento variável (Figura 5 D-G), A cabeça glandular é arredondada e unicelular. Anterior a cabeça glandular observa-se a presença de uma célula nitidamente diferenciada a "neck-cell" (Figura 5 E). Os capitados tipo III são pluricelulares, unisseriados, formados por 4 a 7 células de superfície lisa, uma célula diferenciada "neck -cell" e cabeça glandular oval unicelular.

Assim como nos tricomas não glandulares, a união das células que formam o pedúnculo do tricoma capitado tipo III é visivelmente marcada (Figura 5 H). O tricoma capitado tipo IV, é pluricelular, unisseriado, composto por quatro células visivelmente marcadas possui cutícula granular e estão dispostas em uma base larga bicelular de superfície lisa. A cabeça glandular tem forma arredondada.

Tricomas glandulares capitados e peltados são estruturas secretoras característico da família Lamiaceae, variando o número de células secretoras, o comprimento da célula peduncular, a densidade e seu arranjo na epiderme.

Neste trabalho, resultados distintos foram observados comparando-se com as observações realizadas por Ascensão e Castro (1999) em *P. ornatus in vivo*. Deste modo, não foi notada a presença de tricomas glandulares digitiformes. Além disso, diferente das observações realizadas em *P. ornatus in vivo* por esses autores que relataram a presença de apenas dois tipos de tricomas capitados, as observações realizadas neste trabalho utilizando MEV possibilitou a identificação de quatro tipos morfológicos de tricomas glandulares capitados em *P. ornatus in vitro* (Figura 5 A-J).

A Figura 6 A-J mostra o efeito dos reguladores de crescimento na distribuição dos tricomas sobre a superfície adaxial e abaxial da lâmina foliar. A Figura 6 A-B ilustra a distribuição dos tricomas nas plantas cultivadas em meio MS0 na face adaxial (Figura 6 A) e abaxial (Figura 6 B). As folhas sob o efeito de 4.5 μM de BAP + 5.4 μM de ANA estão ilustrada na Figuras 6 C-D. Observa-se que tanto o tratamento com MS0 quanto o com 4.5 μM de BAP + 5.4 μM de ANA, mostram um maior numero de tricomas glandulares peltados quando comparadas aos demais tratamentos e a planta *ex vitro* (Figura 6 E-J e Figura 7 A-B). O efeito do tratamento com 9.0 μM de BAP + 5.4 μM ANA esta ilustrado na Figura 6 E-F que mostra, uma redução no numero de tricomas não glandulares especialmente na face abaxial (Figura

6F) quando comparadas a planta *ex vitro* (Figura 7 B). O efeito dos tratamentos com 4.7 e 9.3 μM de KIN + 5.4 μM ANA, estão ilustrados na Figura 6 G-I. Confrontando esse tratamento com as plantas cultivadas no meio MS0 e com a planta *ex vitro*, nota-se uma diminuição expressiva no número total de tricomas glandulares e não glandulares.

Estes os resultados indicam que os reguladores de crescimento adicionado ao o meio de cultura não só afetada o perfil qualitativo e quantitativo dos COV, como também a densidade dos tricomas em *P. ornatus in vitro*. Resultados semelhantes foram observados em *Lavandula dentata* (Sudriá *et al.*,1999).

Os tricomas são importantes para a resistência passiva de plantas aos agentes patogênicos, parasitas dentre outros (Levin, 1973) e podem desempenhar um papel importante na adaptação aos ambientes com altos níveis de irradiância (Stenglein *et al.*, 2005).

Portanto, apesar das características fisiológicas, anatômicas e bioquímicas das plantas serem genótípicas, fatores como uso de fitoreguladores e composição do meio de cultura, exerce forte influência na expressão dos reguladores envolvidos no processo de defesa e de organogênese *in vitro*.

A compreensão dos mecanismos e dos fatores que influenciam a biossíntese de metabólitos e a diferenciação das plantas cultivadas *in vitro* podem contribuir para o aperfeiçoamento das estratégias visando produção de plantas competentes durante a aclimatação, assim como para a produção de compostos de interesse.

REFERÊNCIAS

Affonso, V. R., Bizzo H.R., Lage, C.L. S., Sato, A.2009. Influence of Growth Regulators in Biomass Production and Volatile Profile of *in vitro* Plantlets of *Thymus vulgaris* L. *J. Agric. Food Chem.*, 57 (14), 6392-6395.

Affonso, V.R., Bizzo, H.R., Lima, S.S., Esquibel, M.A., Sato, A., 2007. Solid Phase Microextraction (SPME) analysis of volatile compounds produced by *in vitro* shoots of *Lantana camara* L. under the influence of auxins and cytokinins. *J. Braz. Chem. Soc.* 18(8), 1504-1508

Anačkov, G., Božin, B., Zorić, L., Vukov, D., Mimica-Dukić, N., Merkulov, L., Ružica, I., Jovanović, M., Boža, Pal. (2009) Chemical Composition of Essential Oil and Leaf Anatomy of *Salvia bertolonii* Vis. and *Salvia pratensis* L. (Sect. *Plethiosphace*, Lamiaceae). *Molecules* 14, 1-9.

Ascensão, L., Mota, L. and Castro M de M. (1999) Glandular Trichomes on the Leaves and Flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, Distribution and Histochemistry. *Annals of Botany* 84: 437-447.

Avato, P., Fortunato, I.M., Ruta, C., D'Elia, R. (2005) Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Science* 169 (2005) 29-36.

Gonçalves, S., Serra, H., Nogueira, J.M.F., Almeida, Custódio, R.L., Romano. A. 2008. Headspace-SPME of *in vitro* shoot-cultures and micropropagated plants of *Lavandula viridis*. *Biologia Plantarum* 52 (1): 133-136.

Grzegorzcyk, I., Bilichowski, I., Mikiciuk-Olasik, E., Wysokin´ska, H.(2005). *In vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. as a source of antioxidant compounds. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 74, 17-21.

Güllüce M, Sökmen M, Daferera D, Açar G, Ozkan H, Kartal N, Polissiou M, Sökmen A, Sahin F. (2003). In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3958-3965

Hakkim, F. L., Shankar, C. G., Giriya, S. (2007). Chemical Composition and antioxidant Property of Holy Basil (*Ocimum sanctum* L.) Leaves, Stems, and Inflorescence and Their in Vitro Callus Cultures. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 9109-9117.

Levin DA. 1973. Role of trichomes in plant defence. *Quarterly Review of Biology* 48: 3–15
apud Moon H.K., Hong, S.P., Smets, E., Huysmans, S. 2009. Phylogenetic significance of leaf micromorphology and anatomy in the tribe Mentheae (Nepetoideae: Lamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 160, 211-231.

Kirakosyan, A.: Plant Biotechnology for the Production of Natural Products In.: **Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman P.B., et. al.**(ed): *-Natural Products from Plants*, Second Edition, p222-256. Taylor & Francis Group, LLC - Boca Raton - FL, 2006.

Köllner, T.G., Held, M., Lenk, C., Hiltbold, I., Turlings, T.C.J., Gershenzon, J., Degenhardt, J.2008. A maize (E)- β -Caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most american maize varieties. *The Plant Cell*, Vol. 20: 482–494.

Moon H.K., Hong, S.P., Smets, E., Huysmans, S. 2009. Phylogenetic significance of leaf micromorphology and anatomy in the tribe Mentheae (Nepetoideae: Lamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 160, 211–231.

Serrato-Valenti, G., Bisio, A., Cornara, L., Ciarallo, G.(1997). Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salviaaurea* L. Leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany* 79: 329-336, 1997.

Silva,S., Sato, A., Lage, C.L.S., Gil, R.A.S.S., Azevêdo, D.A., Esquibel, M.A., 2005. Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. *in vitro* produced under the influence of growth regulators. *J. Braz. Chem. Soc.* 16, 1387-1390.

Stenglein SA, Arambarri AM, Menendez-Sevillano MC, Balatti PA. 2005. Leaf epidermal characters related with plant's passive resistance to pathogens vary among accessions of wild beans *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (Leguminosae-Phaseoleae). *Flora* 200: 285-295.

Sudria, C., Piñol M.T., Palazón, J., Cusidó, R.M., Vila, R., Morales, C., Bonfill, M., Cañigueral, S. 1999. Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 177-184.

Tisserat, B., Vaughn, S. F., 2008. Growth, morphogenesis, and essential oil production in *Mentha spicata* L. plantlets in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 44, 40-50.

Tregear, J. W., Morcillo, F., Richaud, F., Berger, A., Singh, R., Cheah, S.C., Hartmann, C., Rival, A., Duval, Y. 2002. Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. *Journal of Experimental Botany*, 53, 373, 1387-1396.

Tsuro, M., Inoue, M., Kameoka H. 2001. Variation in essential oil components in regenerated lavender (*Lavandula vera* DC) plants. *Scientia Horticulturae* 88, 309-317.

Turner, G.W., Gershenzon, J. Croteau, R. B. 2000. Development of peltate glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiology*, 124. 2, 665-679.

Yesil-Celiktas, O. Nartop, P., Gurel, A., Bedir, E., Vardar-Sukan, F. 2007. Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*' calli. *Journal of Plant Physiology* 164, 1536-1542.

TR	IR	I K	SUBSTÂNCIA	30 dias							60 Dias							90 Dias							P.m ãe ex vitr o
				T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
				*																					
5,1	85	85		2,3	0,9	0,9	1,9	2,0	1,5	0,4	1,3	2,2	2,1	1,7	1,9	1,8	1,1	1,6	1,9	0,9	3,4	1,1	3,4	1,9	0,5
23	4	4	2-HEXENAL	6	2	0	3	6	2	2	3	2	8	1	1	4	5	6	3	2	0	5	6	6	0
7,7	91	93		15	32	30	28	19	31	23	17	14	12	15	19	22	31	13	24	17	14	14	25	24	13
61	7	1	α -THUJENE	76	65	16	12	09	83	54	06	11	68	95	67	14	67	46	30	66	12	01	09	15	64
8,0	92	93		18	12	18	11	5,7	13	5,5	18	15	13	11	8,6	15	8,5	16	15	18	23	15	15	9,7	9,9
74	6	9	α -PINENE	86	88	92	43	5	83	0	66	66	55	86	2	93	4	75	11	65	04	54	10	8	7
10	97	97		15	9,0	12	14	8,7	15	11	17	16	14	11	7,8	8,9	6,3	10	10	16	11	14	9,6	7,5	5,4
033	2	6	SABINENE	04	1	72	32	7	21	27	83	51	35	03	7	6	9	15	44	67	58	15	0	1	6
10	97	98		7,3	4,1	6,3	5,9	11	4,8	3,5	7,4	10	6,4	4,8	4,3	7,4	3,5	6,5	5,1	7,1	6,9	9,4	4,9	4,5	3,0
260	7	0	β -PINENE	2	5	7	8	59	8	9	7	56	2	3	2	3	1	2	9	5	4	3	5	0	9
10	97	97		4,3	2,2	2,6	4,6	0,5	3,0	1,7	5,3	3,3	5,6	11	8,5	8,8	4,0	3,4	9,0	5,5	7,8	4,3	4,8	8,1	9,2
535	6	8	1-OCTEN-3-OL	8	3	8	7	6	1	5	0	4	6	11	1	8	3	1	2	9	9	0	0	0	3
11	99	99		1,2	1,1	0,9	1,2	0,7	0,9	0,4	0,9	1,5	1,2	0,4	0,8	1,4	0,6	0,8	1,0	0,8	0,9	1,2	0,8	1,1	0,4
031	2	1	β -MYRCENE	8	6	8	8	9	3	5	4	6	9	7	7	4	3	8	4	8	6	2	8	0	0,4
11	99	99		0,7	1,0	0,6	1,1	0,9	0,5	0,3	0,7	1,8	1,5	1,8	2,4	3,1	1,0	0,5	3,1	0,3	1,1	0,9	0,5	1,3	0,8
523	5	3	3-OCTANOL	5	2	3	3	1	6	7	5	8	5	4	0	0	2	9	9	6	9	4	8	8	1
12	10	10	HEXENOL																0,5						0,1
037	05	04	ACETATE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	6
12	10	10				0,1		0,2						1,2											
225	09	05	α -FELANDRENE	-	-	2	-	9	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	10	10		2,9	2,1	2,9	3,0	2,1	4,2	4,7	3,3	2,0	1,4	0,8	4,5	2,0	5,6	1,8		1,3	1,7	5,3	4,2	4,0	
345	11	11	3-CARENE	4	0	6	8	3	3	0	9	7	7	4	3	9	2	8	-	8	8	2	1	2	
13	10	10		1,6	1,0	1,2	1,4	1,1	1,7	0,9	1,0	1,6	1,3		0,6	1,6	0,9	1,1	1,1	0,9	1,3	1,4	0,9	0,8	0,4
697	33	31	α -LIMONENO	5	0	8	3	9	0	0	0	9	7	-	8	5	9	4	7	0	7	1	5	1	3
13	10	10		0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2			0,3	0,2			0,3		0,1	0,3		0,2				0,2
850	35	33	1,8-CINEOLE	4	6	3	1	1	0	-	-	0	6	-	-	3	-	7	3	-	6	-	-	-	1
13	10	10		0,1		0,0			0,1			0,3	0,2	7,0											2,5
983	38	40	(Z) β -OCIMENE	7	-	6	-	-	4	-	-	0	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
14	10	10		4,8	3,2	2,6	2,8	1,5	2,6	1,7	5,3	8,3	4,7		4,8	5,2	3,5	5,0	5,2	5,7	4,6	4,7	4,8	4,8	
674	48	50	(E) β -OCIMENE	9	0	9	0	1	9	6	5	7	3	-	8	1	1	6	5	4	2	0	5	1	
16	10	10		0,2		0,2	0,2	0,0	0,1			0,3	0,2		0,2	0,3			0,4		0,2				
581	74	68	4-THUJANOL	8	-	2	9	9	4	-	-	7	6	-	7	6	-	-	3	-	6	-	-	-	
17	10	10	ISOTERPINOLO						0,1																
345	83	86	NE	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	10	10							0,1																
633	87	88	TERPINOLENE	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	10	10		0,5	0,4	0,3	0,5	0,4	0,1			1,0	0,5		1,0			0,5	0,8		0,9				
974	98	98	β -LINALOOL	1	7	3	5	4	4	-	-	0	3	-	5	-	-	6	3	-	-	4	-	-	
22	11	11					0,2				0,9			0,1					0,1		0,2		0,2	0,3	
503	35	36	P-MENTH-1-OL	-	-	-	8	-	-	-	7	-	-	4	-	-	-	-	3	-	2	-	1	9	
23	11	11		0,1	0,2	0,1		0,1	0,0	0,0		0,4	0,4	0,1	0,3	0,3			0,4			0,1			
051	41	44	P-MENTH-8-OL	5	1	5	-	3	8	9	-	9	5	4	7	8	-	-	6	-	-	9	-	-	
23	11	12												0,1	0,1		0,2								
218	42	04	DECANAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	-	8	-	-	-	-	-	-	-	0,1
24	12	12	ISOBORNYL	0,2	0,2	0,4	0,4	1,9	0,7	0,3							0,7				0,1				
751	87	85	ACETATO	2	1	4	8	8	3	7	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	7	-	-	-	
25	13	13		0,5			0,2				0,2	0,8	0,3	0,8		0,5		1,3	0,5	0,4	1,2	1,2			0,6
524	56	51	α -CUBEBEN	7	-	-	3	-	-	-	9	3	0	1	-	3	-	6	8	9	6	7	-	-	9
25	13	13	α -TERPINYL		7,3	1,5	2,5	13	2,9	7,4					1,9		3,2						1,6	1,3	
626	56	50	ACETATE	-	6	1	7	16	8	2					9		3						9	2	
25	13	13		0,9	0,3	0,6	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	1,0	1,3	1,1	1,5	1,0	0,8	2,5	1,0	1,2	1,0	1,0	0,9	0,9	1,5
940	81	76	α -COPAEN	2	9	1	2	1	0	3	9	9	3	8	0	0	0	0,9	0,7	3	7	0	8	9	9
26	13	13												0,1						0,1	0,0		0,8		0,8
066	89	84	β -BOURBONEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	5	-	5	4	5	-	2	8
26	13	13		1,2			0,6				0,9	1,6	1,1	1,3	1,4	1,4	0,7	1,5	1,2	1,6	0,8	0,6	0,6		1,3
115	92	90	β -CUBEBENE	6	-	-	0	-	-	-	9	4	6	6	1	6	8	4	3	5	2	7	9	-	5
26	13	14						0,8	0,5	1,0			0,1	0,1							0,1	0,1	0,1		1,7
209	97	09	A-GURJUNENE	-	-	-	-	1	2	0	-	6	3	1	-	-	-	-	-	-	3	4	8	-	5
26	13	13		1,2	1,0	0,6	0,7	3,9	1,5	4,4	0,1		0,1		0,8	0,1	3,2	0,1	0,1			0,7	1,3		
253	99	99	AZULENE	4	9	7	8	6	0	7	8	-	3	-	2	7	6	7	0	-	-	-	1	4	
26	14	14			1,4	1,1	2,0																		
385	08	03	β -ISOCUMENE	-	6	8	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	14	14	β -																						
618	20	18	CARYOPHYLLE	5,8	5,0	4,3	3,8	9,3	3,9	9,7	5,0	7,0	13	11	9,8	6,4	6,1	9,8	6,0	7,7	7,4	8,1	7,0	7,7	30
26	14	14	NE	4	2	6	9	3	0	9	5	2	60	59	6	5	0	9	6	9	6	4	1	1	34
26	14	14		0,2			0,1				0,2	0,3	0,2	0,4	0,4	0,2	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4
767	29	32	β - GURJUNENE	9	-	-	0	-	-	-	1	1	6	7	4	8	6	6	8	7	6	6	8	0	1
26	14	14			0,1	0,1	0,0	1,0			0,1							0,1					0,1		
902	38	39	α -GUAIENE	-	0	0	5	9	-	-	6	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	1	
26	14	14	(Z) β -								0,1						0,2					0,2	0,2		0,1
964	41	43	FARNESENE	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	8	-	8	-	4	9	-	6	6	5
27	14	14	CIS-MUROLA-	0,2		0,0						0,1	0,1	0,1	0,3	0,1</									

27,	14	14		0,6	0,3	0,5	0,2	0,7	0,2	0,7		0,3	0,3	0,8	0,7	0,4	0,6	1,0	0,7		0,4		0,7	1,0	1,8
208	54	54	α -HUMULENE	8	7	2	8	9	6	4	-	0	0	7	3	3	1	0	3	-	3	-	3	0	2
27,	14	14	AROMADENDR			0,2	0,2											0,1							
275	59	59	ENE	-	-	1	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	
27,	14	14	γ -			0,4																			
299	60	76	HIMACHALENE	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			ALLO-																						
27,	14	14	AROMADENDR														0,1								0,1
433	68	61	ENE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	9
27,	14	14		0,1							0,2		0,2		0,2	0,2		0,4	0,2	0,3		0,3	0,2	0,2	0,0
505	71	77	γ -MUUROLENE	4	-	-	-	-	-	-	0	-	5	-	2	1	-	3	7	8	-	4	2	7	8
27,	14	14										0,2		0,4											
506	79	85	β -IONONE	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27,	14	14	GERMACRENE	9,2	10,	7,6	9,7	8,4	6,9	18,	8,9	6,6	13,	12,	13,	7,8	12,	15,	8,0	8,6	0,2	12,	9,2	13,	
641	79	80	D	8	27	6	1	7	3	52	6	3	88	63	71	5	15	03	9	6	5	85	9	73	8,2
27,	14	14		0,1											0,1			0,2	0,1	0,3	7,2	0,1	0,1	0,2	
815	89	85	β -SELINENE	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	5	3	9	9	-	6	1	5
27,	14	14		0,2									0,1	0,1				0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	
908	94	94	α -SELINENE	5	-	-	-	-	-	-	-	-	9	2	-	-	-	6	9	6	1	-	3	4	
27,	14	14				0,1										0,0					0,3				0,2
920	94	90	cis- β -GUAIENE	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	2	-	-	-	9
27,	14	15	trans- β -	0,3							0,1		0,1	0,1	0,2			0,1	0,1	0,1		0,3			3,7
99	98	00	GUAIENE	4	-	-	-	-	-	-	4	-	2	2	5	-	-	2	6	6	-	5	-	-	7
28,	15	14	β -					0,1	0,4							0,5								0,3	
190	09	99	HIMACHALENE	-	-	-	-	4	5		-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	3	
28,	15	15			0,1	0,1	0,1																		
199	10	12	β -CUCURMENE	-	8	3	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
28,	15	15	α -	0,1							0,2		0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,4	0,1	0,1		0,3	0,2		
218	11	11	HIMACHALENE	4	-	-	-	-	-	-	0	-	4	2	2	0	5	4	7	8	-	3	4	-	
28,	15	15		1,0							1,9	0,6	0,7	1,0	0,8	0,6	1,0	1,5	1,0	2,0	0,2	0,9	0,6	1,3	
288	14	13	γ -CADINENE	9	-	-	-	-	-	-	6	7	3	3	2	5	8	6	1	6	4	9	9	7	
28,	15	15																		1,0					
298	15	17	α -SELINENE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	
28,	15	15	GERMACRENE		0,0		0,5		0,4	0,8															
475	25	56	B	-	8	-	5	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
28,	15	15			0,8	0,5																	1,5		
489	25	24	δ -CADINENE	-	2	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	
28,	15	15		0,2				1,1			0,2	0,3				0,4	1,7				0,2			0,8	
607	32	28	KESSANE	7	-	-	-	2	-	-	6	1	-	-	-	-	1	2	-	-	-	0	-	4	
28,	15	15	SELINA-3,7(11)-		0,9	0,3	0,3	2,5	0,8																
827	43	42	DIENE	-	9	5	7	8	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29,	15	15	γ -							0,1															
511	27	26	HIMACHALENE	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29,	15	15	GERMACRENE-	0,1		0,0	0,0				0,1	0,2	0,2	0,1	1,0	0,1		0,1	0,1	0,1				0,5	
636	86	74	D-OL	3	-	8	4	-	-	-	4	1	1	2	1	9	-	7	6	-	3	-	-	-	8
29,	15	15	CARYOPHYLLE					0,5										0,1		0,1				0,7	
770	92	81	NOXID	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	2	-	-	2	
30,	16	16									0,1			0,0			0,2							0,2	0,0
716	41	41	α -MUUROLOL	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	9	-	-	9	-	-	-	-	-	-	0	8

*T1-MS0; T2-18.5 μ M de KIN; T3-9.3 μ M de KIN; T4-4.7 μ M de KIN; T5-4.5 μ M de BAP; T6- 9.0 μ M de BAP; T7- 18.0 μ M de BAP;

Planta mãe- *ex vitro*

Tabela 1. COV do *P. ornatus in vitro e ex vitro*

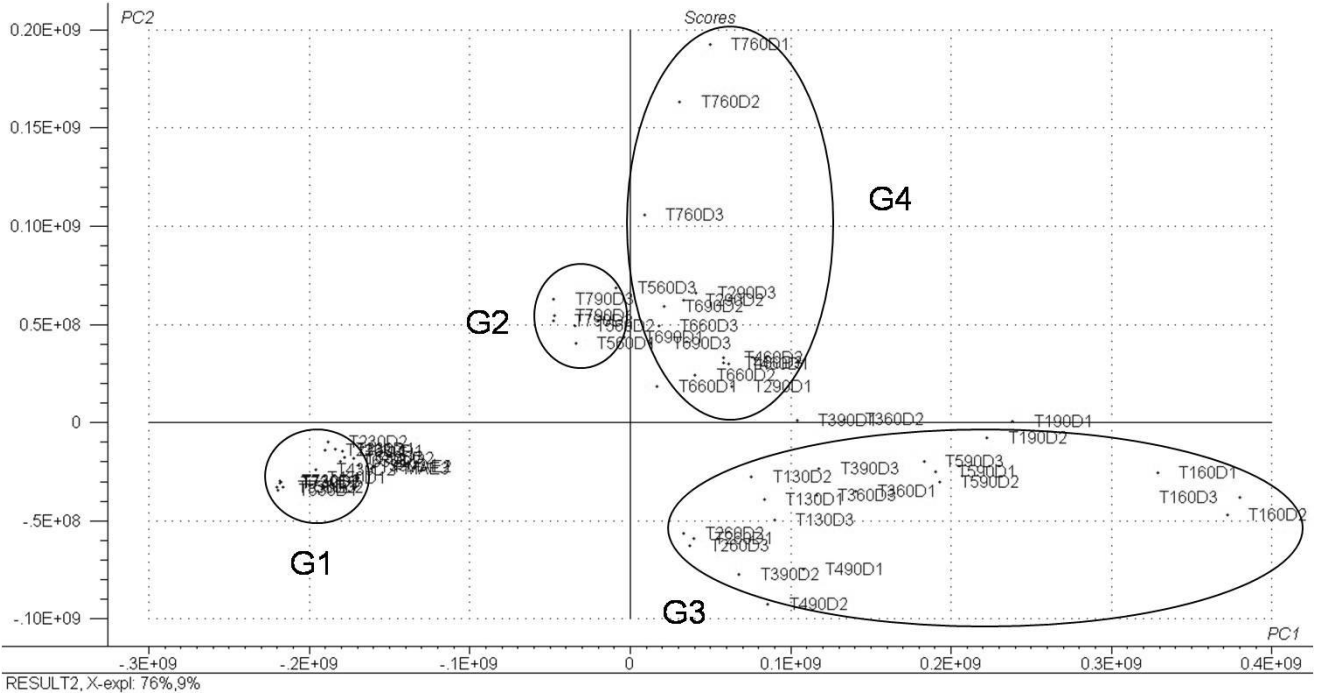


Figura 1. Gráfico dos *scores* (PC1XPC2) obtido por PCA a partir de dados cromatográficos obtidos nas análises de óleos avaliando diferentes reguladores. Os dois primeiros componentes principais juntos explicam 85,4% da variância total do conjunto de dados. T1 = MS0; T2 = 18,5 µM KIN; T3 = 9.3 µM KIN; T4 = 4.7 µM KIN; T5 = 4.5

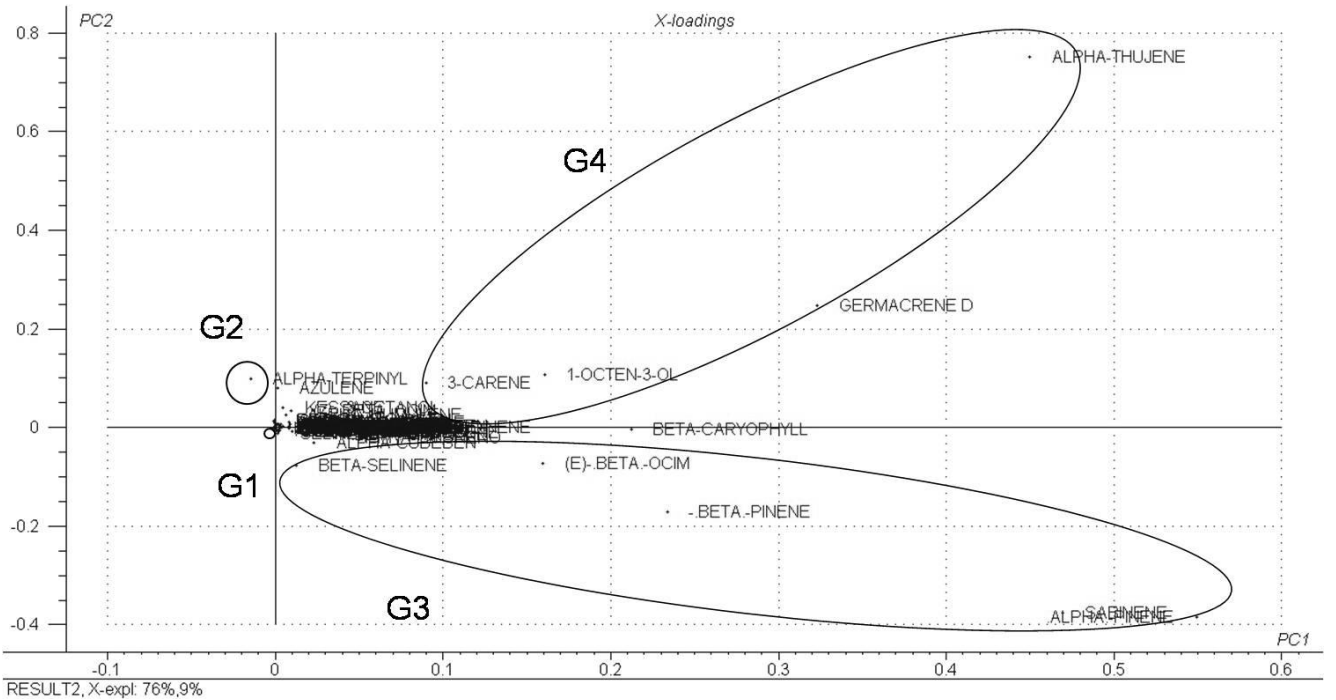


Figura 2. Gráfico dos *loadings* (PC1XPC2) obtido por PCA a partir de dados cromatográficos obtidos nas análises de óleos avaliando diferentes reguladores. Os dois primeiros componentes principais juntos explicam 85,4% da variância total do conjunto de dados.

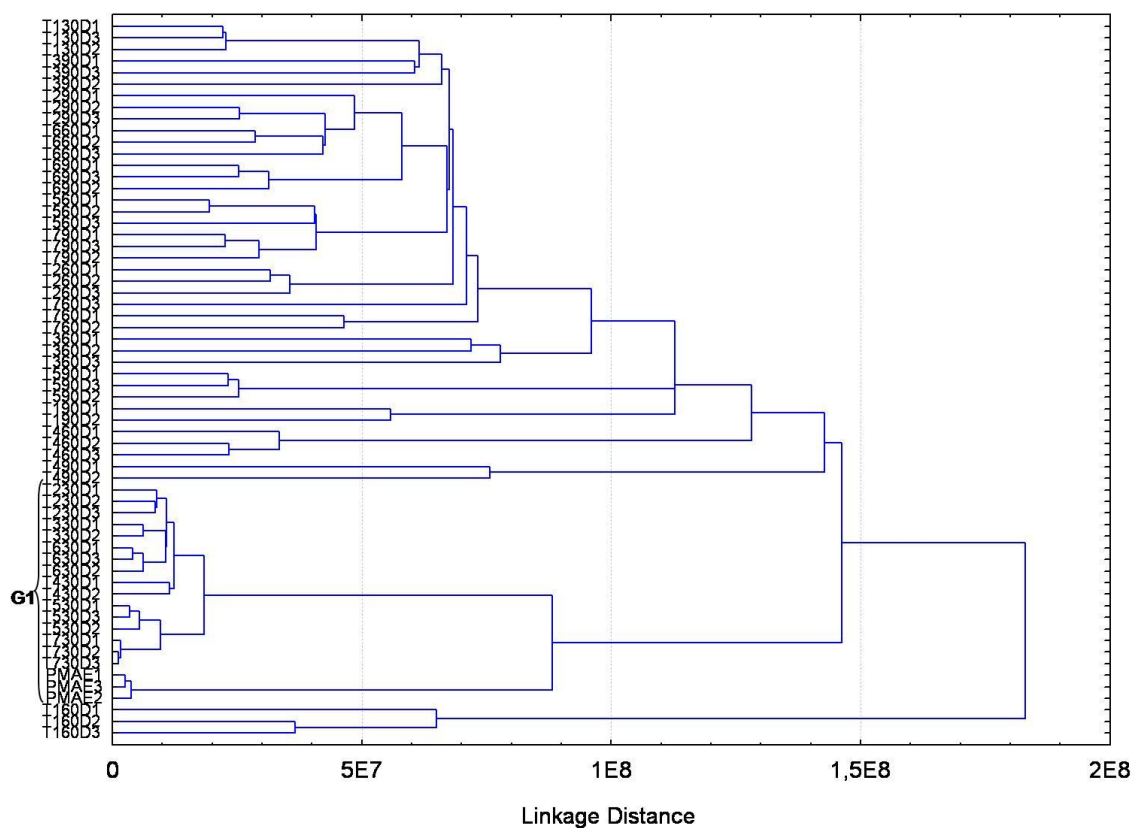


Figura 3. Dendrograma obtido a partir da Análise Hierárquica de Grupamentos. T1 = MS0; T2 = 18,5 μ M KIN; T3 = 9.3 μ M KIN; T4 = 4.7 μ M KIN; T5 = 4.5 μ M BAP; T6 = 9.0 μ M BAP; T7 = 18 μ M BAP

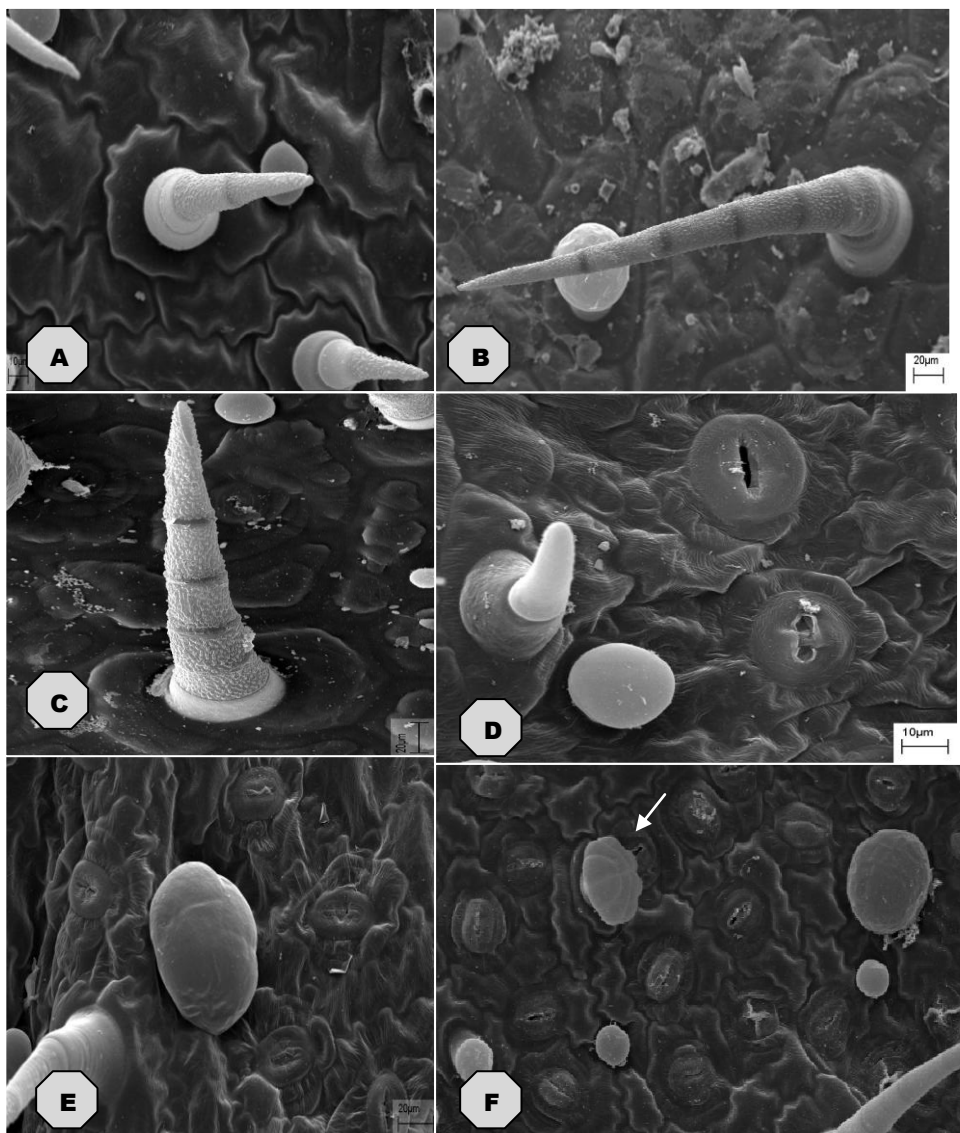


Figura 4- Micrografia eletrônica de varredura (MEV) dos não glandulares e glandulares peltados em folhas de *P. ornatus* cultivado *in vitro*. A-D. Tricomas não glandulares. E-F Tricomas glandulares peltados

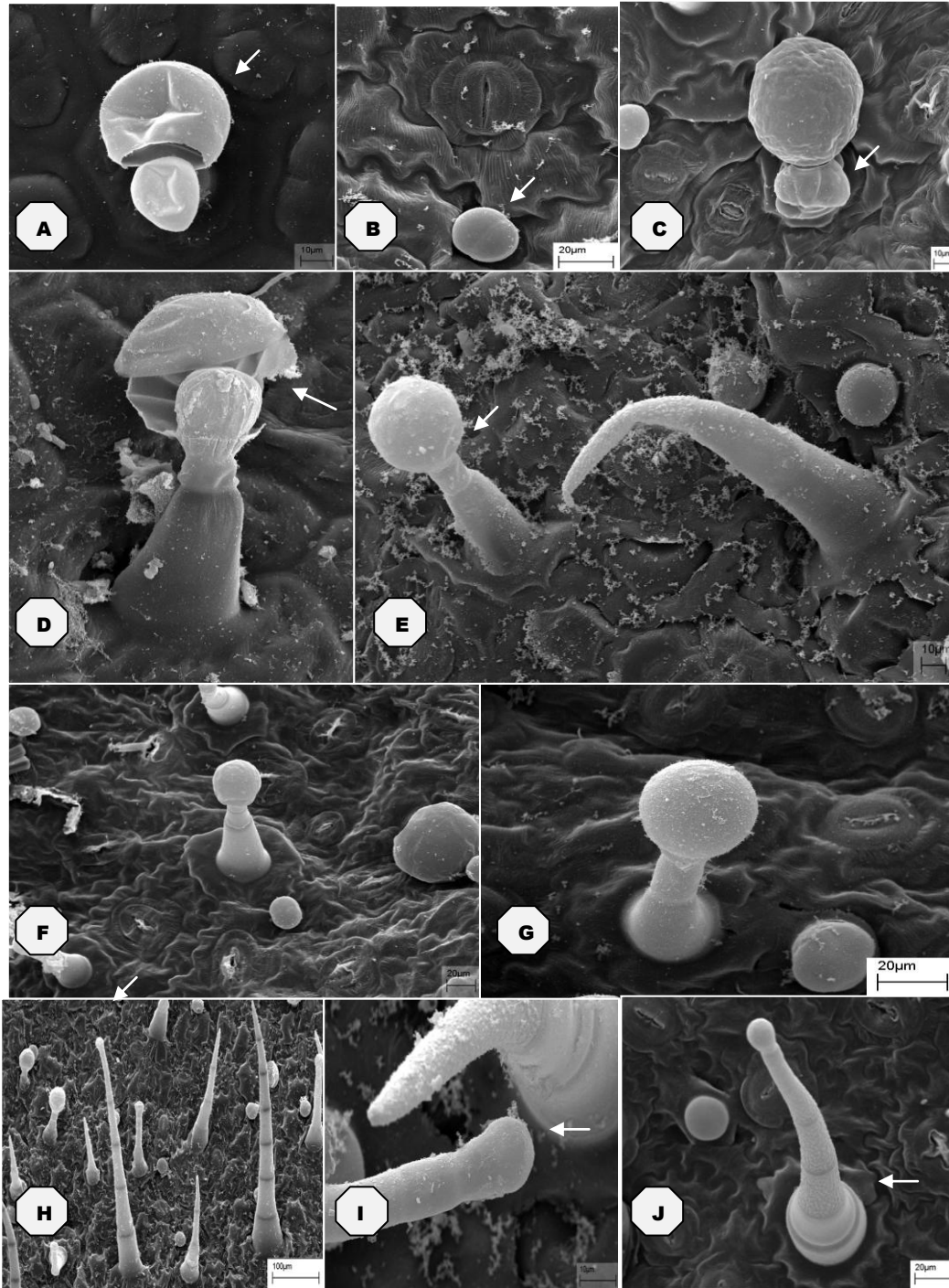


Figura 5 Micrografia eletrônica de varredura (MEV) dos tricomas glandulares capitados em folhas de *P. ornatus* in vitro. A-C, Tricomas capitados tipo I. A, Capa cuticular que recobre a cabeça glandular do tricoma. B, Tricoma peltado de vista frontal mostra cabeça glandular bicelular. C, Cabeça glandular unicelular, base do tricoma multicelular. D-G. Tricomas capitados tipo II. D, Capa cuticular que recobre a cabeça glandular pluricelular do tricoma. E, Célula do pescoço do tricoma F, Tricomas capitados Tipo I e Tipo II e tricoma peltado H-I. Tricoma tipo III. H, Vista panorâmica da epiderme adaxial com tricomas não glandulares e tricomas capitados tipo III. I, Cabeça glandular oval. J. Tricoma tipo IV. Base bicelular, células do pedúnculo com células bem visíveis.

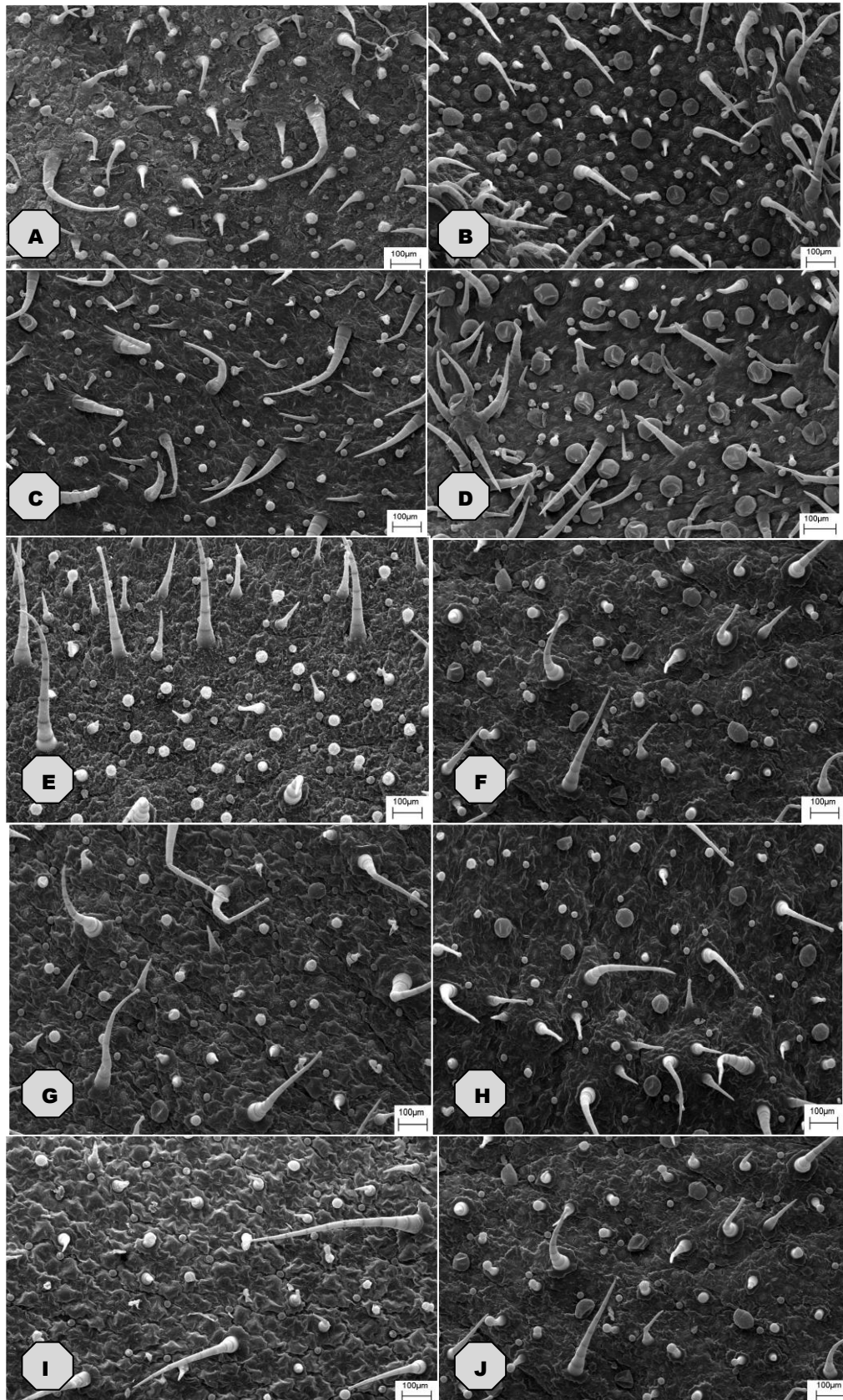


Figura 6: Micrografia eletrônica de varredura (MEV) demonstra o efeito dos reguladores de crescimento na distribuição dos tricomas nas faces adaxial e abaxial respectivamente, das folhas de *P. ornatus in vitro*. A-B. MS0. C-D. 4.5 μM de BAP+ 5.4 μM de ANA. E-F. 9.0 μM de BAP+ 5.4 μM de ANA; G-H. 4.7 μM de KIN+ 5.4 μM de ANA. I-J. Efeito de 9.3 μM de

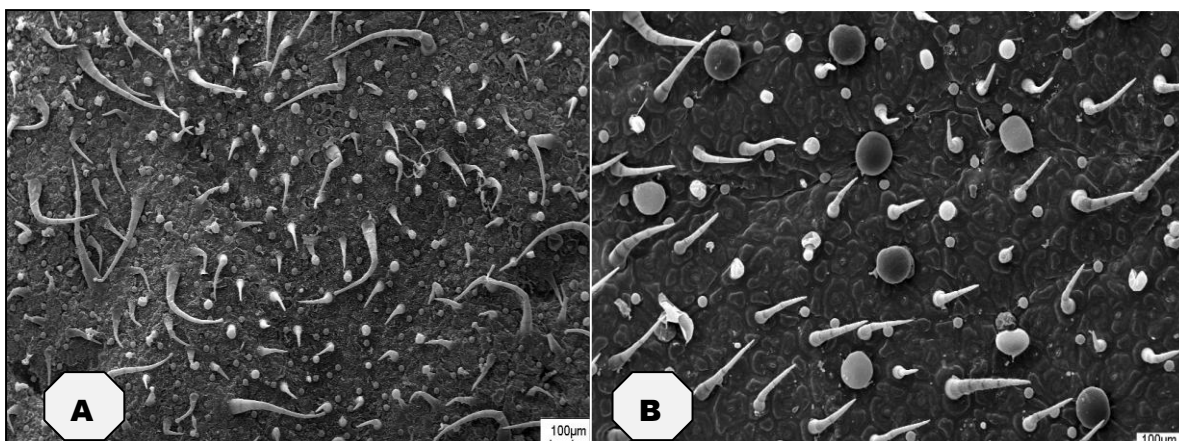


Figura 7. Micrografia eletrônica de varredura (MEV) da planta *ex vitro* (planta mãe). A. Face adaxial. B. Face abaxial

Capítulo 5

Conclusões Gerais

Os resultados apresentados demonstram que a calogênese e a formação de brotos e raízes em *Plectranthus ornatus* é influenciada pelo balanço entre os reguladores de crescimento BAP e ANA.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos sobre a formação de calos na base do explante.

Com relação à calogênese no ápice do explante, houve interação significativa entre os tratamentos utilizados.

Para este parâmetro não houve diferença entre as concentrações de ANA.

No entanto em meios sem ANA ou com 5,4 μM de ANA os melhores resultados foram obtidos com a utilização de 9,0 μM de BAP diferindo significativamente da concentração 18,0 μM de BAP.

Foi obtido até 100% de explantes responsivos para indução de calos na base na presença de 9,0 μM ou 18,0 μM de BAP e ausência de ANA, o que indica que não é necessária a adição de auxina para a indução de calos na base do explante em *P. ornatus*.

Foram observadas interações entre os tratamentos para as variáveis, número de brotos por explante e número de folhas por broto. Obteve-se uma média de 0,9 a 2,0 brotos de *P. ornatus* nos tratamentos utilizados. As maiores médias para brotos e folhas foram obtidas em meios suplementados com 9,0 μM de BAP na ausência ou presença de 5,4 μM de ANA. No entanto, assim como em outras espécies, no *Plectranthus ornatus* a utilização de BAP sozinho foi suficiente para a formação de múltiplos brotos a partir de segmentos nodais

Foram encontrados 23 compostos voláteis, constituídos basicamente por mono e sesquiterpenóides.

Uma análise dos COV presentes nos calos de *P. ornatus* aponta que a diminuição das proporções do acetato de α -terpinil no óleo é igual ao aumento dos monoterpenos. o, visto que o cátion do α -terpinil é o precursor direto de diversos desses compostos.

O α -terpinil acetato, isobornil e α -limoneno foram os constituintes cuja concentração foi mais acentuada (>5%).

Nos períodos analisados (20 e 40 dias) foram encontradas variações qualitativas e quantitativas dos COV.

Ficou demonstrado que o melhor meio para a produção dos COV foi o MS0 (controle) seguido dos tratamentos com 2.68 μ M e 5.37 μ M de ANA (Grupo2).

Os piores resultados foram obtidos com 2.4-D nas concentrações 9.0 uM, visto que só aparecem os COV α -terpinil e 2.2% de isocumene nesse tratamento e, 2.26 μ M de 2.4-D que produziu apenas α terpinil, β -thujeno e 16.2% de cariofileno.

Os calos de *P. ornatus* cultivados em meio MS0 apresentaram as maiores concentrações de α -pineno, α -limoneno, canfeno e isobornil e humuleno. Esses resultados sugerem que a adição dos reguladores no meio de cultivo interfere na síntese desses compostos.

Tendo em vista o fato de que as condições de cultivo empregadas neste trabalho, foram completamente controladas, os resultados obtidos mostram que o perfil dos COV diferiram exclusivamente de acordo com o tipo e concentração da auxina empregada .

A análise de PCA e HCA possibilitou identificar quatro agrupamentos entre as amostras dentro dos diferentes tratamentos estudados, a partir dos compostos identificados em cada conjunto de amostras.

Foram encontrados *in vitro* 62 COV, constituídos basicamente por mono e sesquiterpenóides. Os componentes majoritários do óleo essencial por tratamento e por idade foram α -thujeno α -pineno, sabineno, β -pineno, 1-octen-3-ol 3-carene, (*E*) β -ocimene, α -terpinil β -cariofileno e germacreno D.

A variação qualitativa e quantitativa no conteúdo dos COV sofreu influência do tempo de cultivo em dias, bem como, do tipo e da concentração do regulador utilizado no preparo dos meios de cultivo.

No meio MS0 foram observadas as maiores concentrações de α -pineno, canfeno, sabineno, decanal e α -humuleno, bem como a menor concentração de acetato de α -terpinil

Houve alteração qualitativa e quantitativa no perfil dos compostos voláteis das plantas *ex vitro* frente aos COV das plantas *in vitro*.

Comparando-se os resultados dos COV das plantas *ex vitro* com os melhores resultados dentro de cada tratamento nas três idades com as plantas *in vitro*, nota-se que o rendimento percentual dos COV alcançados *in vitro* é expressivamente maior do que os obtidos no COV *ex vitro*, chegando a representar um ganho percentual superior a 370 %, tal como no caso do β -pineno

Confrontando o perfil cromatográfico dos COV *in vitro* e *ex vitro* observa-se alteração qualitativa e quantitativa dos COV independentes do uso de reguladores (MS0) que favorecem ao cultivo *in vitro*, exceto para o β -cariofileno cujo percentual nas plantas *ex vitro*

é significativamente maior. Todavia, levando-se em consideração a presença de reguladores no meio de cultivo, observa-se que no período de 60 e 90 dias os reguladores BAP e KIN na concentração de 4,5 μM e 18.5 μM respectivamente influenciam positivamente no perfil qualitativo e quantitativo dos COV.

O melhor meio para a produção dos COV em *P. ornatus in vitro* foi o MS0 (controle) seguido dos tratamentos com 4,5 μM de BAP e 18.5 μM de KIN.

Em trabalho anterior com *P. ornatus in vivo* foi relatada a presença de apenas dois tipos de tricomas capitados.

A utilização de MEV possibilitou a identificação de quatro tipos morfológicos de tricomas glandulares capitados.

Foi observado o efeito dos reguladores de crescimento na distribuição dos tricomas sobre a superfície adaxial e abaxial da lâmina foliar.

Observou-se que tanto o tratamento com MS0 quanto o com 4.5 μM de BAP + 5.4 μM de ANA, mostraram um maior número de tricomas glandulares peltados quando comparadas aos demais tratamentos e a planta *ex vitro*.

O efeito do tratamento com 9.0 μM de BAP + 5.4 μM ANA mostrou uma redução no número de tricomas não glandulares especialmente na face abaxial quando comparadas a planta *ex vitro*.

O efeito dos tratamentos com 4.7 e 9.3 μM de KIN + 5.4 μM ANA quando confrontado com aquele das plantas cultivadas no meio MS0 e com a planta *ex vitro* evidenciou a diminuição expressiva no número total de tricomas glandulares e não glandulares.

Nesse trabalho as condições de cultivo empregadas , tais como, a quantidade de luz, temperatura, composição do meio, pH e idade dos calos foram completamente controladas, dessa forma os resultados obtidos mostram que o perfil dos COV diferiram exclusivamente de acordo com o tipo e concentração da auxina empregada. Sendo que esses agrupamentos foram observados pelo ACP e, confirmam que o perfil dos COV está diretamente relacionado ao tipo e a concentração dos reguladores no meio de cultivo.

ANEXOS

biologia plantarum

Establishment in vitro of garden Boldo (*Plectranthus ornatus*, Lamiaceae)

Journal:	<i>Biologia Plantarum</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Brief Communications
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	SOARES, HELNA; Universidade Federal da Bahia, Medicamento David, Jorge; Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química de Santana, José; Universidade Estadual de Feira de Santana, Ciências Biológicas Meira, Paloma; Universidade Estadual de Feira de Santana, Ciências Biológicas David, Juceni; Universidade Federal da Bahia, Medicamento
Keywords:	<i>Plectranthus ornatus</i> , Lamiaceae, organogenesis, plant growth regulators



Publisher • Editors • Contact • Contents • Indexes •

New submission

Notice to contributors

<http://www.ueb.cas.cz/bp>

BIOLOGIA PLANTARUM is an international journal for experimental botany. It publishes original scientific papers and brief communications, reviews on specialized topics, and book reviews in plant physiology, biochemistry, physiological anatomy, ecophysiology, genetics, molecular biology, and pathophysiology. Only papers presenting generally valid findings are usually accepted. Papers should not be published or under consideration for publication elsewhere.

The manuscripts in English should be prepared in electronic version (text in MS Word for Windows, figures and photographs as JPG or TIF files) and submitted on-line (new submission). Other correspondence should be sent to editorial office by e-mail: biol.plant@ueb.cas.cz.

Every manuscript is reviewed usually by two reviewers familiar with the relevant field of research, being from a different country or at least from different institution from the author.

In further correspondence do not forget to use manuscript number.

FOLLOWING SECTIONS:

[Original papers]
 [Brief communications]
 [Review articles]
 [Book reviews]
 [Announcements]
 [SI units and symbols]
 [Examples of figure design]
 [Most common abbreviations]

ORIGINAL PAPERS

The length of a paper including figures, tables and references should not exceed 12 pages (final size in the journal). The paper should be arranged as follows:

- title
- names and addresses of the author(s)
- abstract with additional key words
- abbreviations
- acknowledgements
- introduction
- materials and methods

- results
- discussion
- references
- tables with a heading
- figure legends.

The results and discussion might be joined together. Units, dimensions, terms, symbols, abbreviations, *etc.*, recommended by the *Système International d'Unités* (SI) (see the section SI units and symbols) should be used.

Line drawings should be surrounded by a frame which forms their axes. Grid marks should point inwards. As far as possible, different curves should be individually labelled. Alongside the scale of the ordinate and abscissa the quantity measured should be given, followed by appropriate dimension in SI units in brackets, *e.g.*: TRANSPIRATION RATE [mg(H₂O) m⁻² s⁻¹] (see the Examples of figure design).

Photographs must be of the press quality with a full range of tones and of good contrast. Colour photographs are printed on authors' expenses (*ca.* 120 EUR per page).

References in the text should contain the authors' names followed by the year of publication, *e.g.* Amesz (1989) or (Lüttge *et al.* 1989, Herbert and Nilson 1991). References at the end of the paper should be arranged alphabetically (by authors' names) (for abbreviations of journal titles see the section Most common abbreviations):

Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C.: Activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunus armeniaca* leaves. - *Biol. Plant.* **44**: 41–46, 2001.

Tausz, M.: The role of glutathione in plant response and adaptation to natural stress. - In: Grill, D., Tausz, M., De Kok, L.J. (ed.): *Significance of Glutathione in Plant Adaptation to the Environment*. Pp. 101–122. Kluwer Academic Press, Dordrecht - Boston - London 2001.

Koch, G.W., Mooney, A.A. (ed.): *Carbon Dioxide and Terrestrial Ecosystems*. - Academic Press, San Diego - New York - Boston - London - Sydney - Tokyo - Toronto 1996.

Gribova, Z.P., Antonovskii, V.L.: [Ultraviolet radiation effect on paramagnetic centres of plant leaves and chloroplasts.] - *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol.* 1991(1): 51–58, 1991. [In Russ.]

Titles of articles written in languages other than English are given only in English translation (see the above example). However, book titles should be given also in the original language.

Additional key words (10 or less) best characterizing the contents of article and not contained in its title follow the abstract. The list of abbreviations in alphabetical order is also necessary.

BRIEF COMMUNICATIONS

Papers not longer than 4 pages (final size in the journal) including abstract, text, references, one table and one figure, or two figures, or two tables are usually published more rapidly than the longer papers.

REVIEW ARTICLES

Short but comprehensive reviews with full bibliography are accepted after preliminary discussion of the intended topics with the editors.

BOOK REVIEWS

Reviews of new books up to 1 page (final size in the journal) dealing with experimental botany or related fields, sent to the Editor, are published as soon as possible.

ANNOUNCEMENTS

The journal publishes announcements of conferences, symposia, *etc.* in the respective fields only on free pages.



© 1998-99 Institute of Experimental Botany,
Academy of Sciences of the Czech Republic

[Browse Journals](#) > [Phytochemistry](#) > [Guide For Authors](#)

Phytochemistry

**The International Journal of Plant Chemistry, Plant Biochemistry and
Molecular Biology.**

ISSN: 0031-9422

Imprint: PERGAMON

Actions

- [Submit Article](#)

- [Order Journal](#)
- [Free Sample Issue](#)
- [Recommend to Friend](#)
- [Bookmark this Page](#)

Statistics

Impact Factor: 2.946

5-Year Impact Factor: 3.169

Issues per year: 18

Guide for Authors

The International Journal of Plant Chemistry, Plant Biochemistry and Molecular Biology.
An Official Journal of the Phytochemical Society of Europe and the Phytochemical Society of North America.

- | | |
|--|--|
| • Use of wordprocessing software | |
| • Article Structure | |
| • Introduction | |
| • Discussion | • Tables |
| • Experimental | • References |
| • Abstract | • Journal Abbreviations Source |
| PREPARATION • Keywords | • Video data |
| • Abbreviations | • Supplementary data |
| • Acknowledgements | • Submission checklist |
| • Nomenclature and Units | • Additional Information |
| • Accession numbers | |
| • Artwork | |
| • Color Artwork | |

Phytochemistry invites research articles on all aspects of pure and applied plant chemistry, plant biochemistry, plant molecular biology and chemical ecology. The Journal is currently divided up into the following sections:

Editorial Comment, Molecules of Interest, Review Articles, Structural Elucidation and Full Papers.

Editorial Comment will be an occasional series where Regional Editors, Board Members or other scientists will be invited to comment on phytochemistry topics of global interest and debate.

Molecules of Interest will consist of invited short reviews (3-4) printed pages of individual compounds or macromolecules of plant, fungal or algal origin. These can be novel compounds or newly discovered properties of familiar compounds. Please contact Professor Bolwell if you wish to prepare a Molecules of Interest paper.

Review Articles are published at regular intervals, ranging in scope from primary metabolism and regulation of plant growth, through plant enzymology to natural product chemistry and the biological activity of plant products. They deal with significant new areas of research and are intended to command the interest of the general reader. Authors should consult their Regional Editors with an outline of their proposed Review before preparing such articles. Published Reviews include a biography and picture of each author.

Structure Elucidation papers, accepted as full papers in the Chemistry section, should include either a substantial description of several new compounds without any conclusion as to their significance, or a description of the study of new compounds with expected structures incorporating conclusions. These papers are succinct (6-8 pages of double-spaced manuscript) and should follow the general style of Full Papers although the Introduction, Results and Discussion may be combined as a single narrative. Brief abstracts must be included, containing significant facts derived from the work. Reports of known compounds, however rare, from new plant sources will not generally be accepted unless they have real chemotaxonomic or other biological significance. Authors are specifically discouraged from submitting papers as fragmented analyses of particular plant constituents.

Full Papers: Full journal articles will be drawn from areas described in the Aims and Scope:

Bioactive Products
Chemotaxonomy
Chemistry
Ecological Biochemistry
Metabolism

Molecular Genetics & Genomics
Protein Biochemistry & Proteomics
Update in Bioinformatics

They are comprehensive papers, typically 6-8 printed pages in length (24-28 pages of double-spaced manuscript). Papers on plant chemistry must be substantial and contain convincing justification for undertaking the study, as well as having conclusions (e.g. on the biology, chemotaxonomy, new biosynthetic pathways etc.).

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article Structure

The content of manuscripts **must** be arranged as follows: (1) a *Graphical Abstract*; (2) a *Title Page* with authors name(s) and address(es); (3) and *Abstract*, in which contents are briefly stated; (4) *Keywords*; (5) *Introduction*, and (6) the *Results* and *Discussion* (preferably combined). Although each section may be separated by headings, they should form one continuous narrative and only include details essential to the arguments presented. If a discussion is separately provided, it should not include a repetition of the results, but only indicate conclusions reached on the basis of them, and those from other referred works; (7) *Conclusions* or *Concluding Remarks*; (8) the *Experimental* should include brief details of the methods used such that a competent researcher in the field may be able to repeat the work; (9) *Acknowledgments*; (10) *Figures* and *Legends, Formulae, Tables* and *References*. Authors have to include pagination.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Specific names (genus, species, authority for the binomial) of all experimental plants must be given at first mention according to the *Index Kewensis* (searchable online at <http://www.ipni.org/>) or similar authority (The Plant-Book: A Portable Dictionary of the Vascular Plants, by D.J. Mabberley, 2nd ed., June 1997, Cambridge University Press; ISBN: 0521414210), and preferably be in the form recommended by the International Code of Botanical Nomenclature. Named varieties of cultivars are given, e.g. *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids. (The official printed version of the International Code of Botanical Nomenclature has been published as International Code of Botanical Nomenclature {Tokyo Code}. Regnum Vegetabile 131. Koeltz Scientific Books, Königstein. ISBN 3-87429-367-X or 1-878762-66-4 or 80-901699-1-0.)

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Subsections on the Experimental Procedures should be italicized and inserted as part of the first line of the text to which they apply. *Phytochemistry* encourages an extensive use of abbreviations (these are listed at the back of the Instructions to Authors, or the reader is referred to other sources). The Experimental should begin with a subsection entitled General Experimental Procedures. This subsection will typically contain brief details of instruments used, and identification of sources of specialized chemicals, biochemicals and molecular biology kits.

The next subsection describes the source(s) and documentation of biological materials used, whether in reference to whole plants or parts therefrom, crude drugs, or any other plant material from which identifiable chemical substances are obtained for the first time. Documentation must also include a reference to voucher specimen(s) and voucher number(s) of the plants or other material examined. If available, authors should quote the name and address of the authority who identified each non-cultivated plant investigated. Specimens should preferentially be deposited in a major regional herbarium where the collection is maintained by state or private institution and which permits loan of such materials.

With other microorganisms, the culture collection from which they were either accessed and/or deposited should be included, together with identification of the strain designation code. The Experimental Procedures employed should be concise but sufficiently detailed that a qualified researcher will be able to repeat the studies undertaken, and these should emphasize either truly new procedures or essential modifications of existing procedures. Experimental details normally omitted include: (1) method of preparation of common chemical and biochemical derivatives, (2) excessive details of separation of compounds, proteins and enzymes, e.g. preparation of columns, TLC plates, column and fraction size.

Compound characterization: Physical and spectroscopic data for new compounds must be comprehensive, and follow the order shown below: compound name (and assigned number in text); physical state of compound (e.g. oil, crystal, liquid, etc.), melting and/or boiling point; optical rotation and/or circular dichroism measurements, if optically active; UV; IR, ¹H NMR; ¹³C NMR; MS. For all new compounds, either high-resolution mass spectral or elemental analysis data are required.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. "New" and "novel" are not allowed within title and abstract.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Please provide, when submitting your article, a graphical abstract. This comprises the title, authors, identical to the article itself, a summary of about 25 words, and a pictogram: one figure representative of the work described. Maximum final dimensions of the pictogram are 5 x 5 cm: bear in mind readability after reduction, especially if using one of the figures from the article itself. Graphical abstracts will be collated to provide a contents list for rapid scanning.

Keywords

Authors must give 3-10 keywords or phrases, which identify the most important subjects covered by the paper. They should be placed at the beginning of the manuscript in the following order: name of plant species examined (Latin binomial); plant family; common epithet (where applicable); type of investigation; class of compound; protein or gene; name of compound(s); protein(s) and gene(s).

Abbreviations

About, approximately: ca.
 Anhydrous: dry (not anhyd.)
 Aqueous: aq.
 Circular dichroism: CD
 Concentrated (or mineral acids): conc.
 Concentrations: ppm (never ppb!), μ M, mM, M, %, mol
 Dry weight: dry wt; fresh weight: fr. wt
 Electricity: V, mA, eV
 Force due to gravity (centrifugation): g; rpm (revolutions/min)
 Gas chromatography: GC
 Gas chromatography-mass spectrometry: GC-MS
 trimethylsilyl derivative: TMSi (TMS cannot be used as this refers to the internal standard tetramethylsilane used in ¹H NMR)
 High performance liquid chromatography: HPLC
 Infrared spectrophotometry: IR
 Length: nm, μ m, mm, cm, m
 Literature: lit.

Mass spectrometry: m/z [M]⁺ (molecular ion, parent ion)
 Melting points: uncorr. (uncorrected)
 Molecular mass: Da (daltons), kDa
 Molecular weight: Mr
 Nuclear magnetic resonance: ¹H NMR, ¹³C NMR, Hz, δ
 Numbers: e.g. 1, 10, 100, 1000, 10,000: per or -1
 Optical rotatory dispersion: ORD
 Paper chromatography: PC
 Precipitate: ppt.
 Preparative thin-layer chromatography: prep. TLC
 Radioactivity: dpm (disintegrations per min), Ci (curie), sp. act (specific activity), Bq (1 becquerel = 1 nuclear transformation/sec)
 Repetitive manipulations: once, twice, $\times 3$, $\times 4$, etc.
RRt (relative retention time), *Rt* (Kovat's retention index), ECL (equivalent chain length - term frequently used in fatty acid work)
 Saturated: satd.
 Solution: soln.
 Solvent mixtures including chromatographic solvents: abbreviate as follows *n*-BuOH–HOAc–H₂O (4:1:5)
 Statistics: LSD (least significant difference), s.d. (standard deviation), s.e. (standard error)
 Temperature: (with centigrade), mp, mps, mmp, bp
 Temperature: temp.
 Thin-layer chromatography: TLC, *R_f*
 Time: s, min, h, day, week, month, year
 Ultraviolet spectrophotometry: UV, *A* (absorbance, not OD - optical density)
 Volume: l (litre), μ l, ml
 Weight: wt, pg, ng, μ g, mg, g, kg

Inorganics, e.g.

AlCl₃ (aluminum chloride), BF₃ (boron trifluoride), Cr-, CO₂, H₂, HCl, HClO₄ (perchloric acid), HNO₃, H₂O, H₂O₂, H₂SO₄, H₃BO₃ (boric acid), He, KHCO₃ (potassium bicarbonate), KMnO₄ (potassium permanganate), KOH, K-Pi buffer (potassium phosphate buffer), LiAlH₄ (lithium aluminium hydride), Mg²⁺, MgCl₂, N₂, NH₃, (NH₄)₂SO₄, Na⁺, NaBH₄ (sodium borohydride), NaCl, NaIO₄ (sodium periodate), NaOH, Na₂SO₃ (sodium sulphite), Na₂SO₄ (sodium sulphate), Na₂S₂O₃ (sodium thiosulphate), O₂, PPI (inorganic phosphate), SO, Tris (buffer).

Organics, e.g.

Ac₂O (acetic anhydride), *n*-BuOH (butanol), C₆H₆ (benzene), CCl₄ (carbon tetrachloride), CH₂Cl₂ (methylene chloride), CHCl₃ (chloroform), CH₂N₂ (diazo-methane), CM (carboxymethyl), DEAE (diethylaminoethyl), DMF (dimethylformamide), DMSO (dimethyl sulphoxide), EDTA (ethylene-diaminetetra-acetic acid), Et₂O (diethyl ether), EtOAc (ethyl acetate), EtOH (ethanol), HCO₂H (formic acid), HOAc (acetic acid), *iso*-PrOH (*iso*-propanol), Me₂CO (acetone), MeCOEt (methyl ethyl ketone), MeOH (methanol), NaOAc (sodium acetate), NaOMe (sodium methoxide), petrol (not light-petroleum or petroleum ether), PhOH (phenol), PrOH (propanol), PVP (polyvinylpyrrolidone), TCA (trichloroacetic acid), TFA (trifluoroacetic acid), THF (tetrahydrofuran).

¹H NMR solvents and standards: CDCl₃ (deuteriochloroform), D₂O, DMSO-*d*₆ [deuterodimethylsulphoxide, not (CD₃)₂SO], pyridine-*d*₅ (deuteropyridine), TMS (tetramethylsilane).

For further terms used in biochemistry and molecular biology the authors should see the websites of the nomenclature committees. (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/).

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

Chemical nomenclature, abbreviations and symbols must follow IUPAC rules. Whenever possible, avoid coining new trivial names; every effort should be made to modify an existing name. For example, when a new compound is described, it should be given a full systematic name according to IUPAC nomenclature and this should be cited in the Abstract or in the Experimental section. Isotopically-labeled substances should be written with the correct chemical name of the compound. The symbol for the isotope should be placed in square brackets and should precede that part of the name to which it refers, e.g. sodium [¹⁴C]formate.

Optical rotation, optical rotatory dispersion, circular dichroism: Data should be presented in the established form, e.g.

[α] Value (+ or –) in ° (*c* { wt of compound in 100 ml of solvent }, solvent used)_{temp.D}

Example: [α] +32° (*c* 0.3210, EtOH)_{23D}

ORD curves usually described as a series of values based on [α] or [θ] (molecular rotation) at various wavelengths.

CD values may be expressed as molecular ellipticity values [θ], e.g., [θ]₂₅₆ + 21 780, [θ]₃₀₇ – 16 113 or as differential dichroic absorption, e.g. $\delta\epsilon_{253}$ – 1.0 (MeOH; *c* 0.164).

Ultraviolet–visible spectra: ϵ values are given as log values in parentheses, e.g. λ nm (log ϵ): 203 (4.7), etc. EtOH_{max}

Infrared spectra: Data should be presented in the established form, e.g. ν cm^{–1}: 1740, etc. 3CHC_{max}

Absorption should be expressed only in wave-numbers and structural assignments should be indicated when possible in parentheses after the relevant wave-number, e.g. 1740 (>C=O), etc. The following abbreviations should be used if the intensity of absorption bands are included: w - weak intensity, m - medium intensity, v - variable intensity, s - strong intensity, vs - very strong intensity.

NMR spectral data should be presented in full as Supplementary Information for all newly identified compounds. If the data are already published elsewhere then relevant references should be quoted. Data must be specified as ¹H NMR or ¹³C NMR and should indicate the frequency of the instrument, the solvent used and the internal standard. Chemical shifts should be quoted in δ units relative to TMS with indication of whether the signal is a singlet s, doublet d, doublet of doublets dd, triplet t, multiplet m, etc. ¹³C NMR spectral data should specify the carbon concerned, using the recommended IUPAC numbering (e.g. C-1, C-2), and should be given to one decimal place. ¹H NMR spectral data should indicate the number of hydrogens involved and their position of attachment based on the numbering of the carbon atoms, preferably according to IUPAC rules. For example, ¹³C NMR spectral data (25.15 MHz, CDCl₃): δ 30.1 (t, C-5), 74.1 (d, C-6), 121.7 (d, C-3), 144.2 (s, C-4), etc. ¹H NMR spectral data (100 MHz, CDCl₃): δ 0.68 (3H, s, H-18), 0.88 (6H, d, $J=6$ Hz, H-26 and H-27), 0.90 (3H, d, $J=5$ Hz, H-21), 4.34 (1H, q, $J_{6\alpha,7\alpha}=4.5$ Hz, $J_{6\alpha,7\beta}=2$ Hz, H-6), 4.21 (1H, m, $W_{1/2}$ 18 Hz, H-3 α).

Mass spectral data should be presented in full as Supplementary Information for all newly identified compounds. If the data are already published elsewhere then relevant references should be quoted. Presentation of mass spectral data should in general follow the recommendations given in Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 142, 211-240 (1995), and must indicate the method used (EIMS, CIMS, GC-MS, etc.) and the ionizing energy. The data should give only diagnostically important ions, the character of the fragmentation ions in relation to the molecular ion and the intensity relative to the major ion. For example-EIMS (probe) 70 eV, m/z (rel. int.): 386 [M]⁺ (36), 368 [M - H₂O]⁺ (100), 353 [M - H₂O - Me]⁺ (23), 275 [M - 111]⁺ (35), etc. CIMS (*iso*-butane, probe), 200 eV, m/z (rel. int.): 387 [M + H]⁺ (100), 369 [(M + H) - H₂O]⁺ (23), etc. High-resolution spectra can be given in more detail if necessary for [M]⁺ and the more important fragment ions.

X-ray crystallography.

Only essential data (e.g. a three-dimensional structural drawing with bond distances) should be included in manuscripts. A complete list of data in CIF (Crystallographic Information File) format should be prepared separately and deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (see <http://www.ccdc.cam.ac.uk/> for further information) before the paper is submitted. A footnote indicating this fact is to be included in the manuscript. "CCDC...contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html> (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk)". Crystal structures of proteins should be submitted to the Protein Data Bank (see <http://www.rcsb.org/pdb/>; e-mail: info@rcsb.org). Please submit a copy of the CIF data when you submit your manuscript.

Elemental analysis results for compounds which have been adequately described in the literature must be given in the form: (Found: C, 62.9; H, 5.4. Calc. for C₁₃H₁₃O₄N: C, 63.2; H, 5.3%.) New compounds must be indicated by giving analytical results in the form: (Found: C, 62.9; H, 5.4. C₁₃H₁₃O₄N requires: C, 63.2; H, 5.3%.)

Thin-layer chromatography

- For analytical TLC, dimensions of the plates can be deleted if layer thickness is 0.25 mm.
- Abbreviate common adsorbents: (but use silica gel, not SiO₂ as this does not describe the material accurately), Al₂O₃ (alumina).
- Preparative forms of the technique should include details of (i) layer thickness (preparative TLC only), (ii) amount of sample applied to the layer, (iii) method of detection used to locate the bands and (iv) the solvent used to recover the compounds from the adsorbent after development.
- Special forms of TLC on impregnated adsorbents can be abbreviated, e.g. AgNO₃-silica gel (1:9), by wt can be assumed.

Gas chromatography

- Detector used should be specified, e.g. dual FID, EC, etc.
- Carrier gas and flow rate should be given, e.g. N₂ at 30 ml min⁻¹.
- Operating conditions, such as injector and detector heater temperatures etc., should be included.
- Packed columns, e.g. 6 m x 3 mm (i.d. measurement only) packed with 1% SE-30 (support material and mesh size can be omitted unless unusual).
- Capillary columns should be specified, e.g. WCOT (wall coated open tubular), SCOT (support coated open tubular). The split ratio used in the injection system and the injection volume for the sample should also be included.

High performance liquid chromatography

- Solvent or solvent gradients used together with flow rate should be given.
- Column dimensions (length x i.d. only) and packing used.
- Method of detection employed, e.g. UV or refractive index.

Biochemical conventions

Unless a common biochemical term (e.g. ATP, NADH), biochemicals that are abbreviated should be spelled out in full (in brackets) immediately following their first usage in the text.

Enzyme names are typically not abbreviated, unless there are accepted abbreviations, such as ATPase. Where possible, E.C. numbers should be used for enzymes, and the recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) should be used (see below).

Enzyme characterization

- Enzyme activity is expressed in units of katal (symbol kat), the conversion of one mol of substrate per sec. It should be made clear that the measurements were made under specified optimum conditions and were not seriously affected by losses during extraction and analysis.
- pH optima should be given together with pH values for half maximal activity.
- Kinetic parameters should be expressed as V_{max} , K_m etc.
- Enzyme inhibitors-effectiveness should be expressed as K_i or concentration for half-maximal activity.
- Optimal temperature of enzymes should not be given. This should be expressed in terms of "Energy of Activation" and "Energy

of Activation for Denaturation".

(f) Enzyme nomenclature is now given in "Enzyme Nomenclature, Recommendations", Academic Press (1992) (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb>).

(g) Labeling of proteins and nucleic acids-use of labelled precursors in assessing the rate of synthesis of macromolecules must be validated by evidence of real, direct incorporation. The possibility of occlusion or adsorption of isotopic material should be noted and it should be shown that the labeled precursor is incorporated without prior catabolism.

Protein and nucleotide sequences

The Experimental must contain explicit documentation of the ends of nucleotide probes used in the study if previously unpublished, or by appropriate reference to published nucleotide numbers and/or restriction map. In manuscripts to be published in Phytochemistry, any new protein and/or nucleotide sequence must have been submitted to EMBL, GenBank™ or DNA Data Bank of Japan databases, with designated accession number(s) obtained prior to paper acceptance by the Regional Editor. The Author(s) must ensure access to this database information by timely release of data prior to publication, as well as providing necessary documentation to those already in the databases.

Nucleotide sequence data can be submitted either electronically (e-mail) or in computer-readable format, GenBank™, EMBL and the DNA Data Bank of Japan addresses are:

GenBank Submissions, National Center for Biotechnology Information, Building 38A, Room 8N-803, Bethesda, MD 20894. Tel.: +1 301 496-2475; e-mail (submissions): gbsub@ncbi.nlm.nih.gov; e-mail (information): info@ncbi.nlm.nih.gov
EMBL Nucleotide Sequence Submissions, European Bioinformatics Institute, Hinxton Hall, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK. Tel.: +44 (0) 1223-494401; fax: +44 (0) 1223-494472; e-mail: datasubs@ebi.ac.uk; world wide web: <http://www.ebi.ac.uk/embl>
DNA Data Bank of Japan, Center for Information Biology, National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan. Tel.: (+81) 559-81-6853; fax: (+81) 559-81-6849; e-mail: ddbjsub@ddbj.nig.ac.jp (for data submissions); world wide web: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>.

Contributors must obtain the designated accession number, which will be incorporated into the paper, prior to printing.

Only novel DNA sequences will be published. Sequences that show close similarity to known coding or other sequences such as promoters will not be published and will be cited by accession number. Translated protein sequence information should be published as alignments against other gene family members. Papers containing such information about genes already known in other species should have sufficient novelty and biological significance. Sequence only papers or papers which duplicate work in another species will not be published.

Genes known by three letter names should be written in italics. The corresponding cognate protein should be written in capital, non-italic text.

Accession numbers

Accession numbers are unique identifiers in bioinformatics allocated to nucleotide and protein sequences to allow tracking of different versions of that sequence record and the associated sequence in a data repository [e.g., databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine ('GenBank') and the Worldwide Protein Data Bank]. There are different types of accession numbers in use based on the type of sequence cited, each of which uses a different coding. Authors should explicitly mention the *type of accession number together with the actual number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article. Please use the following format: accession number type ID: xxxx (e.g., MMDB ID: 12345; PDB ID: 1TUP). Note that in the final version of the *electronic copy*, accession numbers will be linked to the appropriate database, enabling readers to go directly to that source from the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color Artwork

Colour in print: The charge for printed colour will be given on request by contacting authors@elsevier.com.

Colour of the web: Any figure can appear free of charge in colour in the web version of your article, regardless of whether or not this is reproduced in colour in the printed version. Please note that if you do not opt for colour in print, you should submit relevant figures in both colour (for the web) and black-and-white (for print).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/>) and Reference Manager (<http://www.refman.com/>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer *et al.* (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Journal Abbreviations Source

Journal titles should be abbreviated (e.g. Carbohydr. Res.) following the Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) style (a list of abbreviated journal titles is available online at <http://www.cas.org/sent.html>).

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
 - References are in the correct format for this journal
 - All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
 - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
 - Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
 - If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes
- For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com/>.

Additional Information

Is the subject matter really appropriate to *Phytochemistry*–

Is the work described both new and significant?

Have you supplied a *Graphical Abstract*–

Is the *Title* both *short* and *informative*–

Does the *Abstract* fully represent your scientific contribution? Is it self-contained? (Avoid formulae, numbers and abbreviations given in the text.)

Have you avoided repeating yourself? Have you avoided presenting the same data more than once? Can you really justify writing separate 'Results' and 'Discussion' sections?

Have you checked plant names? Are you sure of the identity of the plants examined? Have you indicated the *part* of the plant you extracted? Have you deposited a voucher specimen and given access information?

Have you remembered to add the accepted IUPAC systematic names for new plant products?

Have you used all the suggested abbreviations in the Experimental?

Have you remembered to enclose with (or cite in) your manuscript and other relevant papers (e.g. reprint of previous paper in a series, any manuscripts of papers in press referred to in the paper, etc.)?

Is your manuscript double-spaced throughout with adequate margins and consists of one file containing all your text, figures and tables with a file name extension, plus separate original graphic files ready for online submission?

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alphanumeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

Copyright © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY

Information for Authors

Last updated: 2nd October 2009

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

GENERAL INFORMATION

The *Journal of Experimental Botany* publishes high-quality primary research papers together with Review articles and Special issues in the plant sciences.

Full-length primary papers should contribute to our understanding of how plants develop and function, and should provide new insights into biological processes. The journal will not publish purely descriptive papers or papers that report a well-known process in a species in which the process has not been identified previously. Articles should be concise and generally limited to 10 printed pages.

Review Articles are published regularly as *Perspectives in Experimental Botany*. *Opinion papers* that express a particular point of view on a controversial topic relevant to any aspect of plant science are also considered. Outlines of proposed reviews and opinions should be submitted to j.exp.bot@lancaster.ac.uk for consideration before preparation of a full manuscript.

Special Issues containing reviews and occasionally one or two primary papers in a specified subject area are published at intervals. Reviews should not be encyclopaedic, will ideally contain the author's views and be pitched at a level that will appeal to the non-specialist as well as those who work in the field. If primary papers are submitted for a Special Issue, then the Introduction should be longer than usual to help orientate the reader within the field, and the Discussion should also help to explain the context of the work.

Submission of a manuscript to the Journal of Experimental Botany implies that it is not under consideration by any other journal, and that all authors have agreed to submission. It is also submitted under the understanding that it is an original work and no part has been published elsewhere, with the exception of an abstract.

Manuscripts submitted to the journal may be checked for originality using anti-plagiarism software. The journal's policy is that in addition to acknowledging a source, authors are required to paraphrase the detail of other people's work in their own words, otherwise the text should be enclosed in quotation marks.

ONLINE SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

All manuscripts should be submitted via Bench>Press, our online manuscript submission and review system. If you are unable to submit in this way please contact the editorial office. To submit online please go to <http://submit-jxb.oxfordjournals.org/> and follow the instructions for creating an account (or sign in) and submitting your manuscript. Before submitting your manuscript please read and follow the Journal's [guidelines for presentation](#).

If you are a first time user of the 'Bench>Press system' please click on 'Create an account' and register following the website's instructions. If you are already registered with *JXB* Bench>Press, please sign in by using your e-mail as your username, and your password. If you have forgotten your password, you can obtain a new one by clicking on [lost password](#). Here you will be prompted to enter your e-mail address. The next page will ask you your security question. After entering your security question, a new password will be e-mailed to you (you can always change a password on your Personal Information page).

After you have logged in, please enter the 'Author Area' and select 'Submit a new manuscript'. Fill in all the required fields.

1. Manuscript metadata: Number of authors, article type, title, running title, key words, abstract, covering letter, submission agreement, and suggested editors. You are required to suggest three potential reviewers. You can also exclude reviewers, if so, please state your reasons in the covering letter. In both cases please provide as much information as possible. 2. Author(s) information: Please enter the name, institution, and e-mail for each author in the order they appear on the manuscript. 3. File upload

metadata: number of images and supplementary files that you will upload, which are not included in the manuscript file. Please fill in all the required fields: number of pages and figures, number of colour and black and white figures, number of tables. 4. Upload your file(s): a single Word or .PDF file with tables and figures included is the preferred format. Please note that before creating your .PDF file, fonts (Asian, Cyrillic, Eastern European, and Middle Eastern) should be embedded in the document. Embedding ensures that all readers can view the document in any system. Please embed all fonts even if you think you have not used any special fonts. They are often left in the original Word document or may occur in graphics and may not even be visible (see Acrobat Help: 'Embedding Fonts'). Alternatively, if tables are uploaded separately, these should be Word or PDF. If figures are not included in the text, they should be submitted as .JPEG, .TIFF or .GIF, and should be

If reference is made to a paper 'in press', a proof of this should also be submitted. If any material from other publications is included, it should be clearly referenced and copyright permission sought before submission. Please see section 'Permission to reproduce figures'.

GUIDELINES FOR PRESENTATION

Manuscripts should be typewritten on one side only of an A4 sheet, double-spaced throughout (except for the references - see below) and with at least a 4 cm margin on the left. Manuscripts should be written in the third person. Number all pages of the manuscript consecutively on the right hand side at the bottom of the page. Number the lines of the text in the left-hand margin, but omit line numbering from the beginning of the References section onwards. Page and line numbering help reviewers and editors easily to refer to specific sections of the manuscript. Please note that manuscripts without page and line numbering will be returned to authors for correction before being considered further.

For primary research articles, the manuscript should be arranged in the following order: Title page Abstract Introduction Materials and methods Results Discussion (this section may be combined with Results) Supplementary material (if applicable) Acknowledgements References Tables Figure legends Figures

The *Title page* should contain the title, the name(s) of the author(s), the name(s) and address(es) of the institution(s) where the work was carried out, followed by the contact details of the author to whom correspondence should be sent (address, telephone, fax, and e-mail). The date of submission and the number of tables and figures should also be given on the first page. The *Title* should be specific and concise but sufficiently informative to assist those scanning contents listings and abstract journals. Authors should also suggest a short running title. Please do not add the running title as a header.

The *Abstract* should not exceed 250 words; it should state the rationale, findings and conclusions of the study; it should contain no discursive matter or references.

Authors should suggest no more than ten *Key words* for their article in alphabetical order. Data should not be presented in both tabular and graphical form. Large bodies of primary data should not be included in the manuscript but they can be presented as 'Supplementary material', which will be published online at the time of publication.

ABBREVIATIONS, NUMBERS AND DATES

Abbreviations and their explanation should be composed in a list. Standard chemical symbols may be used in the text where desirable in the interests of conciseness. For long chemical names and other cumbersome terms, widely accepted abbreviations may be used in the text (e.g. ATP, DNA); the list of standard abbreviations published by *The Biochemical Journal* (<http://www.biochemj.org/bj/bji2a.htm>) is an acceptable guide. Abbreviations for the names of less common compounds may be used, but the full term should be given on first mention. It is confusing and unnecessary to use abbreviations for common English words (e.g. L for light).

Numbers up to ten should be spelled out in the text except when referring to measurements. Numbers higher than ten are to be represented as numerals except at the beginning of a sentence. Fractions are to be expressed as decimals.

Dates should be cited thus: 7 June 2001 and the 24 hour clock should be used.

SCIENTIFIC NAMES

The complete scientific name (genus, species, and authority, and cultivar where appropriate) must be cited for every organism at the first mention. The generic name should be abbreviated to the initial thereafter, except where intervening references to other genera with the same initial could cause confusion. If vernacular names are employed, they must be accompanied by the correct scientific name on first use. [s](#)

UNITS OF MEASUREMENT

The metric system is adopted as standard. The system of units known as 'SI' should be used. If non-standard abbreviations must be used they should be defined in the text. Units of measurement should be spelled out except when preceded by a numeral, when they should be abbreviated in the standard form: g, mg, cm³, etc. and not followed by full stops. Use negative exponents to indicate units in the denominator (i.e. mmol m⁻² s⁻¹).

CHEMICAL AND MOLECULAR BIOLOGY NOMENCLATURE

Follow *Chemical Abstracts* and its indexes for chemical names. The IUPAC and IUBMB recommendations on chemical, biochemical, and molecular biology nomenclature should be followed for amino acids, peptides, enzymes, nucleic acids, polynucleotides, carbohydrates, and lipids (see <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac> and [/iubmb](http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb)).

Nomenclature for genes and proteins must follow international standards. It is important to differentiate between genes and proteins. *Italics* is a standard for genes, so all gene symbols and loci should be in *italics* and capitalization as it applies for each organism's standard nomenclature format, in text, tables, and figures. Proteins should appear in Roman type. Nomenclature conventions differ amongst species, please follow them accordingly.

Arabidopsis: <http://www.arabidopsis.org/portals/nomenclature/guidelines.jsp>

Maize: http://www.maizegdb.org/maize_nomenclature.php

Rice: http://www.gramene.org/documentation/nomenclature/rice_gene_nomen.pdf

SEQUENCE DATA

Deposition of sequence data (proteins or nucleotides), array data, molecular interaction data, and any other data where there is a publicly held database is required before publication of the manuscript; and the database accession number must be given in the manuscript (Materials and methods). Appropriate databases for protein and nucleic acid sequences are: [EMBL](http://www.ebi.ac.uk/EMBL); [GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank), or the [Protein Data Bank](http://www.rcsb.org/).

Microarray Gene Expression Data should be [MIAME](http://www.miamdb.org/) compliant; and data should be deposited in a public repository such as [ArrayExpress](http://www.arrayexpress.org/) and [GEO](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). [Back to Contents](#)

EQUATIONS

If equations require more than one level of subscript or superscript, please use either 'Microsoft Equation Editor' or 'Math Type'. If anything else is used, the equation has to be re-typed which makes it vulnerable to errors. [Back to Contents](#)

TABLES

Tables should be on a separate page, and should be numbered in Arabic numerals with a concise and descriptive legend at the head. They should be cited in the text in a sequential order. Please create tables in Word using the 'table' feature and include them in the text file. [Back to Contents](#)

FIGURES

Figures should be self-explanatory and contain as much information as is consistent with clarity. Each figure should be provided on a separate page and be clearly labelled using Arabic numbers. Citation in the text should take the form Fig. 1A etc, and should be referred to in the text in sequential order. Wherever possible, figures should be grouped to fill a page. Label figures that have more than one panel in capital letters A, B, etc.

Lines and symbols should be drawn boldly enough to stand reduction. For graphs a suitable thickness for the axis would be 0.3 mm and for the other lines 0.4 or 1.0 mm depending on the complexity of the graph. The preferred symbols are closed circles, open circles, closed squares, open squares, closed triangles, and open triangles and should be no smaller than 2 mm (height/diameter) for reduction to one-half. The symbols x and + should be avoided.

The typeface used for lettering should be of a type similar in style to the text of the journal (e.g. Times New Roman or Arial). The height of the lettering should be uniform throughout and should have a capital height of 4.0 mm on the originals for reduction to one-half. A scale should be included for all micrographs; otherwise the scale of the original should be stated in the legends so that the final scale can be calculated.

Figure manipulation: Please note that no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. The grouping of images from different parts of the same gel, or from different gels, fields, or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure (i.e. using dividing lines) and in the figure legend. Adjustments of brightness, contrast, or colour balance are acceptable as long as they are applied to the whole image and if they do not obscure, eliminate, or misrepresent any information present in the original, including backgrounds. Without any background information, it is not possible to see exactly how much of the original gel is actually shown. Non-linear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

The minimum resolution for the figures is 300 dpi (dots per inch) for tone or colour, 1200 dpi for line art at approximately the correct size for publication. Colour figures should be CMYK (Cyan-Magenta-Yellow-Black).

To ensure that reviewers, editors, and readers can understand your figures please follow the recommendations to make them colourblind friendly (see <http://jfly.iam.u-tokyo.ac.jp/color/>) - In the fluorescent double-staining micrographs, DNA chips, etc, do not use the combination of red and green. Use magenta (purple) and green instead. - For micrographs with three or more channels, in addition, show either a greyscale picture of each channel or the combination of the two most important channels in magenta and green. - For graphs and line drawings, label elements of the graph on the graph itself rather than making a separate colour-coded key, since matching the same colours in distant places is extremely difficult. - Do not convey information in colour only. Show difference both in colour and shape (solid and dotted lines, different symbols, various hatching, etc.). Red does not appear as a bright and vivid colour. Avoid using red characters on a dark background.

Colour publication: The charges for colour publication in print are currently £100/\$150 per figure. Colour payment agreement is required before acceptance of your manuscript.

Reviews, focus papers and special issue papers are exempt from colour charges, but colour should be essential for the scientific understanding.

Authors of research papers can choose to have their figures published in colour in the online version of the article for free, while the print version will be published in black and white. The use of online-only colour will be limited to those figures which reproduce adequately in both greyscale and colour. Authors who wish to have their figures in colour both online and in print will be charged as specified above. Please consider these options carefully at the time of submission. The online system will ask you to select these options for each colour figure. If a figure is going to be published in colour online but not in print it is **essential** that no reference to colour is made in the legend or within the text of the manuscript that refers to the figure. The figure files for colour online-only should be supplied in CMYK. Authors will receive the proofs according to the print version of the manuscript.

Please note that orders from the UK will be subject to a 17.5% VAT charge. For orders from elsewhere in the EU you or your institution should account for VAT by way of a reverse charge. Please provide us with your or your institution's VAT number.

Figure legends should be provided on a separate page and included in the text file. Each legend should contain sufficient explanation to be meaningful without cross-referencing. A scale of the original should be included in the legend unless already indicated in the picture. A description of the symbols used in the figures should be written out in full. (Please do not include the character symbol in the legend.) Please note that figure legends may be used by search engines for figure searches.

Cover illustrations: authors are encouraged to submit interesting images for a potential issue cover. Illustrations may be taken from the article, or be closely related to it, and they should be original. The potential cover illustration figure(s) must be supplied in electronic format as .TIFF, and resolution must be above 300 dpi at publication size. The image size is 91×285 mm. Please provide a detailed legend and credit information. A short concise caption may also be provided to appear on the front cover. Authors may submit a potential cover illustration at the time of submission or at a later stage during the reviewing process via e-mail (j.exp.bot@lancaster.ac.uk). In this latter case please provide your manuscript number and title and your address.

SUPPLEMENTARY MATERIAL FOR ONLINE-ONLY PUBLICATION

Supplementary material may be submitted for online-only publication if it adds value for potential readers. However, it must not contain material critical to the understanding of the manuscript. The hard copy of the manuscript should stand alone, but it should be indicated at an appropriate point in the text that supplementary material is available online. In addition, the availability of supplementary material should also be indicated in the manuscript by a section headed 'Supplementary material' with a brief description of these data to appear before the Acknowledgements and References. If possible the best format to present these data is

a single PDF file. Please include the manuscript title and list of authors at the top of the first page, and whenever possible include the figure legends.

Supplementary material should be named and cited within the manuscript as Figure S1, Table S1, Video S1, etc. Supplementary material is available to reviewers and editors during the review process. If images are supplied as .GIFs or .JPEGs, the minimum acceptable resolution for viewing on screen is 120 dpi.

Videos: The preferred formats for video clips are .MOV, .MPG, .AVI, and animated .GIF files. Authors are advised to use a readily available program to create movies so that they can be viewed easily with e.g. Windows Media Player or QuickTime.

Authors should check the supplementary data carefully as this information is not professionally copy edited or proofread.

REFERENCES

The accuracy of the references and citation information is the responsibility of the authors. Please be aware that, if citation information is incomplete or inaccurate, links on the online journal will not work.

Line numbering should be omitted from the References section onwards.

Citations in the text should have the authors immediately followed by the date to facilitate the electronic linkages which are available on-line, for example: (Shen and Ma, 2001) or Shen and Ma (2001). If several papers by the same author in the same year are cited, they should be lettered in sequence (2000a, b), etc. When papers are by more than two authors they should be cited in the text: (Shen *et al.*, 2001).

The list of literature must be typed single-spaced throughout and with a single line space between each citation. References should be thoroughly checked before submission. If the list is not in the correct form it will be returned to the author for amendment and publication of the paper may be delayed. In the list, references must be placed in alphabetical order without serial numbering. The following standard form of citation should be used, including the title of each paper or book:

Jiang Q, Gresshoff PM. 1993. *Lotus japonicus*: a model plant for structure–function analysis in nodulation and nitrogen fixation. In: Gresshoff PM, ed. *Current topics of plant molecular biology*, Vol. II. Boca Raton, FL: CRC Press, 97–110.

N'tchobo H. 1998. Sucrose unloading in tomato fruits. II. Subcellular distribution of acid invertase and possible roles in sucrose turnover and hexose storage in tomato fruit. PhD thesis, Laval University, Canada, 87–118.

Richard C, Granier D, Inzé D, De Veylder L. 2001. Analysis of cell division parameters and cell cycle gene expression during the cultivation of *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1625–1633.

Only papers published or in press should be cited in the literature list. Unpublished results, including submitted manuscripts and those in preparation, should be cited as unpublished in the text. Journal titles should not be abbreviated but be given in full. Citation of articles from e-journals and journal articles published ahead of print should have the author names, year, manuscript title, journal title followed by the assigned digital object identifier (DOI) or the appropriate URL:

Parry MAJ, Andralojc PJ, Mitchell RAC, Madgwick PJ, Keys AJ. (March 14, 2003.) Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. *Journal of Experimental Botany* 10.1093/jxb/erg141.

Citation of other URL addresses (unless in reference to an e-journal) may be made in the text but should not be included in the reference list.

REVIEW PROCEDURE

A new submitted manuscript is sent to the relevant subject Associate Editor, who oversees the review process. Manuscripts are reviewed by two independent experts in the particular area. The reviewers will make a scientific assessment and recommendation to the Editors. In case of a disagreement, the Associate Editor may ask a third independent expert to assess the manuscript. Reviewers and Associate Editors remain unknown to authors. The Associate Editors will reach a final decision either to accept, accept with revision or to reject a manuscript. Rejected manuscripts with an invitation to re-submit will be considered as new submissions and undergo the full reviewing process at the Editors' discretion. Include a point by point response to reviewers with your re-submitted manuscript. [Back to Contents](#)

REVISED MANUSCRIPTS

Revised manuscripts should be received within four weeks of the date from when the invitation was sent; revised manuscripts received after this time will be considered as new submissions. Revised manuscripts should be accompanied by a detailed response letter on how all the concerns of the editor and referees have been addressed. Please give the exact page number(s), paragraphs(s), and line number(s) where each revision has been made, and copy this letter in 'Response to reviews' during submission.

Format for revised manuscript: Original source files are required to avoid delays if the manuscript is accepted. The main text must be provided as Microsoft Word. References, Figure legends, and Tables should be included in this Word file. Figures should be provided as .TIFF files. The minimum resolution for the figures is 300 dpi for tone or colour, 1200 dpi for line art at approximately the correct size for publication. Colour figures should be CMYK (Cyan-Magenta-Yellow-Black).

PERMISSION TO REPRODUCE FIGURES

Please note that if your manuscript (or supplementary material) includes any data in tables or figure(s) already published, you will need permission from the original publisher to reproduce them before your manuscript can be published. This includes figures adapted (modified or re-drawn) in any way from other publications. Permission to reproduce figures or data from other publications must be sought by authors at the time of acceptance. Please note that obtaining copyright permission could take some time. A copy of the permission document should be sent to the Production Editor, *Journal of Experimental Botany*, Oxford University Press, Great Clarendon Street, Oxford OX2 6DP. E-mail: [JXB production office](#) To seek copyright permission please contact the copyright permission department of the relevant journal or publisher.

OPEN ACCESS ARTICLES

Open Access articles are freely available online to all from the date of online publication. All primary papers whose corresponding author's institution has a full subscription to the *JXB* will be published Open Access. All material associated with that article will also be accessible to all. Authors from non-subscribing institutions can choose to make their article Open Access, and this in turn incurs a charge of £1700/\$3000/€2550. If authors choose not to pay the fee the article will remain under subscription access for one year, and during that time will only be accessible to those with a personal or institutional subscription or on a pay per view basis. After that time all online articles are freely accessible to all. Authors will be offered the Open Access option when their paper is accepted; For more information [click here](#).

PROOFS

Proofs will be sent electronically to the corresponding author as a .PDF file and will include illustrations set in the appropriate place in the type. The author should make a print copy and add any necessary typographical corrections before returning the corrected proofs by fax to Oxford University Press (+44 (0) 1865 355817) or e-mail (exbotj@oxfordjournals.org) within three days of receipt; otherwise the Editor reserves the right to correct the proofs and to send the material for publication. This is essential if all the material in a given issue is not to be delayed by the late receipt of one corrected proof. [Back to Contents](#)

OFFPRINTS AND UNIQUE URL

On publication of an article, corresponding authors can order 25 free offprints using the [offprint order form](#) and will also receive a unique URL that gives access to both PDF and HTML versions of the paper. The free URL link may be mounted on the authors' home page or institutional web site. This URL links visitors to the *JXB* site and the complete version of the paper online with all functionality; it is accessible regardless of subscription status. Additional offprints may be purchased if required. Order forms are sent out with the proofs. Late orders submitted after the Journal has gone to press are subject to a 100% surcharge (to cover the additional printing cost).

Please note that orders from the UK will be subject to a 17.5% VAT charge. For orders from elsewhere in the EU you or your institution should account for VAT by way of a reverse charge. Please provide us with your or your institution's VAT number.

The Journal

Published on behalf of

- [Society for Experimental Biology](#)

Impact factor: 4.001

Editor-in-Chief

Professor Jerry Roberts