

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Tese

Atividade biológica e parâmetros bioquímicos e fisiológicos influenciados por fatores abióticos em *Achillea millefolium* L.

Milene Conceição Lima

Pelotas, 2013

MILENE CONCEIÇÃO LIMA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
FISIOLÓGICOS INFLUENCIADOS POR FATORES ABIÓTICOS EM
Achillea millefolium L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas/UFPeL, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano do Amarante.

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

L732a Lima, Milene Conceição
 Atividade biológica e parâmetros bioquímicos e fisiológicos influenciados por fatores abióticos em *Achillea millefolium* L. / Milene Conceição Lima. – 117 f. ; il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2013. – Orientador Luciano do Amarante.

1.Mil-folhas. 2.*Achillea millefolium* L. 3.Óleos essenciais. 4.Qualidade de luz. 5.Período de coleta. 6.Concentrações de nitrogênio. 7.Terpenoides. I.Amarante, Luciano do. II.Título.

CDD: 633.88

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Prof. Dr. Luciano do Amarante

Prof. Dr. Márcio Paim Mariot

Profa. Dra. Massako Takahashi Dourado

***A minha avó Zilda de Almeida Conceição (in memoriam)
com todo amor, dedico.***

AGRADECIMENTOS

À Deus que me ilumina, me protege e me acompanha em todos os momentos.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal por implantar um corpo docente qualificado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa e auxílio financeiro.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano do Amarante pela orientação, dedicação, confiança, experiência, paciência, ética, ensinamento e amizade.

Aos professores Dr. Marcio Paim Mariot, Dra. Eugenia Jacira Bolacel Braga e Dra. Massako Takahashi Dourado pela valiosa contribuição na banca de defesa.

Aos professores Dr. Rogério Antonio Freitag, Dra. Gladis Aver Ribeiro, Dr. Sidnei Deuner e Dr. Edgar Ricardo Schöffel pela preciosa e indispensável colaboração no desenvolvimento dos experimentos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica pelo convívio, carinho e apoio.

Aos funcionários, professores e alunos do Campus Pelotas - Visconde da Graça (CAVG) do Instituto Federal Sul-rio-grandense pela ajuda incansável.

Aos funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela ótima convivência, amizade, suporte e incentivo.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal Sandra Sacco Silva pela atenção e momentos de descontração.

Aos colegas e amigos de trabalho Marcel Durigon, Rosana Serpa, Lizandra Bretanha, Daniela Gouvêa, Maraisa Sachini, Marco Ziemann e Gabriela Alves pela força, auxílio e apoio.

Às amigas e colegas Patrícia Marini, Cristina Larré e Caroline Moraes pela amizade verdadeira e pela ajuda imprescindível.

Ao colega e amigo Junior Borella pela agradável convivência, paciência, carinho e auxílio incondicional.

Aos meus pais Silvio e Clarice Lima e aos meus irmãos Michelle e Lucas Lima por acreditarem nos meus sonhos possíveis e impossíveis.

Ao meu amado marido pelo companheirismo, paciência e compreensão nos momentos de conquistas e perdas.

E por fim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

***“Uma descoberta não consiste em ver
o que todo mundo não viu, mas em
pensar o que ninguém pensou”.***

Johann Wolfgang Goethe

RESUMO

LIMA, Milene Conceição. **Atividade biológica e parâmetros bioquímicos e fisiológicos influenciados por fatores abióticos em *Achillea millefolium* L.** 2013. 117 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Diversos fatores abióticos podem coordenar ou alterar os processos metabólicos de crescimento e desenvolvimento em plantas como a luz, temperatura, disponibilidade hídrica, clima, nutrição do solo e compostos inorgânicos. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de *A. millefolium* L. (mil-folhas) frente aos fatores abióticos. Para atingir este objetivo foram realizados dois experimentos, na qual no primeiro foi verificada a atividade antimicrobiana *in vitro* e rendimento do óleo essencial de mil-folhas cultivada com concentrações de nitrogênio (0, 75 e 150 Kg ureia ha⁻¹) e submetida a diferentes níveis de sombreamento 0% (luz plena) e 70% (sombreamento 70%). No segundo experimento foram avaliadas características de crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos, atividade de enzimas antioxidantes, teores de peróxido de hidrogênio, malondialdeído, ascorbato e deidroascorbato, atividade antioxidante pelo método DPPH e síntese de metabólitos secundários em mil-folhas cultivada sob condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha azul, vermelha e preta) e submetida a diferentes períodos de coleta (oito semanas de sombreamento, duas e quatro semanas após o sombreamento). Os principais resultados mostram que o rendimento do óleo extraído de flores foi estimulado pela concentração nitrogenada intermediária e o extraído de folhas foi favorecido pela luz plena, sendo maior nas estruturas reprodutivas. A atividade antimicrobiana do óleo foi confirmada frente aos microrganismos, sendo as cepas fúngicas inibidas pela menor concentração. A massa seca das folhas e flores foi favorecida nas plantas cultivadas com luz plena. Os teores de clorofila *a* e *b* foram maiores nas plantas cultivadas com a malha azul, o conteúdo de clorofila total foi menor nas plantas sob luz plena e em plantas com duas semanas após o sombreamento ocorreu um incremento de clorofila *a*, *b* e total, equivalendo-se às plantas não sombreadas. A atividade da catalase aumentou em plantas aclimatadas em alta intensidade de luz e a baixa luminosidade não estimulou a ascorbato peroxidase, mas incrementou a superóxido dismutase e o teor de peróxido de hidrogênio. A peroxidação lipídica foi reduzida na presença dos espectros de luz azul e vermelha e a baixa intensidade de luz, gerada pelas malhas preta e azul, reduziu o acúmulo de ascorbato. O conteúdo de deidroascorbato aumentou em processo de aclimação à luz solar e a atividade antioxidante foi mais acentuada em extratos de flores. Os teores de fenóis e flavonoides totais foram estimulados pela luz plena. O rendimento do óleo extraído de flores foi maior em relação ao de folhas. O metabólito majoritário do óleo extraído de folhas foi o farnesol e os extraídos de flores foram o farnesol e camazuleno. Os resultados encontrados para a espécie medicinal *A. millefolium* L. indicaram que a intensidade luminosa, qualidade de luz, períodos de coleta e fertilização nitrogenada influenciam no crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos, de metabólitos secundários e resposta antioxidante.

Palavras-chave: mil-folhas, qualidade de luz, períodos de coleta, concentrações de nitrogênio, terpenoides, óleo essencial.

ABSTRACT

LIMA, Milene Conceição. **Biological activity and biochemical and physiological parameters influenced by abiotic factors in *Achillea millefolium* L.** 2013. 117 f. Thesis (PhD). Graduation Program in Plant Physiology. Federal University of Pelotas, Pelotas, RS.

Several abiotic factors can coordinate or alter metabolic processes of growth and development plants such light, temperature, water availability, climate, soil nutrition and inorganic compounds. The objective of this study was to evaluate performance of *A. millefolium* L. (yarrow) against abiotic factors. To achieve this objective were have conducted two experiments in which the first was observed antimicrobial activity *in vitro* and essential oil yield of yarrow grown with nitrogen levels (0, 75 and 150 kg urea ha⁻¹) and subjected different levels of shading 0% (full light) and 70% (70% shading). The second experiment were observed growth characteristics, production photosynthetic pigments, antioxidant enzymes activity, concentrations hydrogen peroxide, malondialdehyde, ascorbate and deidroascorbato, antioxidant activity by method DPPH and secondary metabolites synthesis in yarrow cultivated under light conditions (full light and blue, red and black shade net) and subjected different collection periods (eight weeks shading, two and four weeks after shading). The results show that oil yield extracted from flowers was stimulated by medium nitrogen level and full light increased the oil yield extracted from leaves. The highest essential oil yield was observed in reproductive structures. Antimicrobial activity of oil was confirmed against microorganisms species. Yeast strains were inhibited by the lowest concentration. The dry mass of leaves and flowers was favored in plants grown under full light. The content of chlorophyll *a* and *b* were higher in plants cultivated under blue net, total chlorophyll content was lower in plants under full light and plants two weeks after shading was increase of chlorophyll *a*, *b* and total, equivalent did not shaded plants. Catalase activity increased plants acclimated to high light intensity and low light did not stimulate ascorbate peroxidase, but increased superoxide dismutase and content of hydrogen peroxide. Lipid peroxidation was reduced presence of the spectrum blue and red light and low light intensity generated by nets black and blue, reduced accumulation of ascorbate. Content of deidroascorbato increased acclimation process to sunlight and antioxidant activity was more pronounced extracts of flowers. Levels total phenols and flavonoids were stimulated by full light. Oil yield extracted from flowers was higher than leaves. Major metabolite oil extracted from leaves was farnesol and flowers were farnesol and chamazulene. Results for medicinal species *A. millefolium* L. indicated that light intensity, light quality, collection periods and nitrogen fertilization influence growth, photosynthetic pigments production, secondary metabolites and antioxidant response.

Key words: yarrow, light quality, collection periods, nitrogen levels, terpenoids, essential oil.

SUMÁRIO

1. Introdução geral	12
2. Referências bibliográficas	16

Artigo 1. **Atividade antimicrobiana *in vitro* e rendimento do óleo essencial de *Achillea millefolium* L.**

Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (ISSN 1516-0572)

Resumo	20
Abstract	21
Introdução	21
Material e métodos	25
Resultados e discussão	29
Conclusões	36
Referências	37

Artigo 2. **Efeito da qualidade de luz sobre o crescimento e síntese de pigmentos fotossintéticos em *Achillea millefolium* L.**

Revista Cerne (ISSN 0104-7760)

Resumo	42
Abstract	43
Introdução	43
Material e métodos	46
Resultados e discussão	49
Conclusões	57
Referências	57

Artigo 3. **Atividade antioxidante de *Achillea millefolium* L. submetida a diferentes condições de luminosidade**

Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (ISSN 0717-7917)

Resumo	61
Abstract	61
Introdução	62
Material e métodos	64
Resultados e discussão	68
Conclusões	83
Referências	84

Artigo 4. Síntese de metabólitos secundários em *Achillea millefolium* L. sob influência da qualidade luminosa

Revista Química Nova (ISSN 1678-7064)

Abstract	88
Introdução	88
Material e métodos	91
Resultados e discussão	95
Conclusões	104
Referências	105
3. Considerações finais	113
Anexos	114

1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas medicinais são utilizadas no tratamento e na cura de enfermidades, sendo muitas vezes consideradas o único recurso terapêutico de determinados grupos étnicos e comunidades. O uso dessas plantas é tão antigo, perdurando até os dias atuais a partir de observações feitas pela população, que acabam por divulgar as virtudes terapêuticas e efeitos medicinais que essas produzem. Desse modo, informações são acumuladas ao longo dos anos, despertando ainda mais o interesse de pesquisadores (MACIEL et al., 2002).

A atividade biológica de plantas medicinais tem sido objeto de intensa investigação científica. Plantas superiores e aromáticas são amplamente utilizadas na medicina popular, uma vez que apresentam um amplo espectro de atividade e inibição comprovada contra bactérias e fungos, apresentando uma grande importância na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (DUARTE et al., 2004; SARTORATTO et al., 2004). Essas propriedades são reconhecidas por suas substâncias ativas, como é o caso dos terpenoides e compostos fenólicos, produtos do metabolismo secundário, que fazem parte dos óleos essenciais (LOGUERCIO et al., 2005).

O uso de extratos vegetais, óleos essenciais e fitoquímicos de conhecida atividade antimicrobiana pode adquirir significado nos tratamentos terapêuticos. Diversas espécies vegetais têm sido utilizadas, pelas características antimicrobianas, através de compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta (LOGUERCIO et al., 2005).

Objetivando preservar os teores de óleos essenciais inseridos nas plantas medicinais e otimizar o processo de extração, operações pós-colheita devem ser empregadas corretamente. Dentre estas, as condições de secagem e armazenamento são importantes para conservar de forma adequada os princípios ativos, levando essas plantas a baixos teores de umidade (SIMÕES et al., 2004).

Segundo Noldin (2003) a importância das plantas medicinais deve-se também por sua contribuição como fonte natural de fármacos e por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo devido à diversidade de compostos químicos presentes. No entanto, inúmeras plantas que são utilizadas em preparações fitoterápicas carecem de um maior controle de qualidade, uma vez que

a literatura científica indica que diversas destas podem apresentar uma composição química variável.

Estudos sobre uma diversidade de plantas com poder medicinal têm sido desenvolvidos, mas a maioria deles se relaciona às propriedades medicinais e químicas das espécies. É de extrema importância conhecer a influência do meio ambiente e do manejo adotado durante o cultivo, como a adubação nitrogenada dessas plantas, pois irão responder com alterações e variabilidade química dependendo do meio em que estão inseridas e da concentração e tipos de nutrientes fornecidos.

A partir dos anos 80, ocorreu um crescente interesse pela fisiologia do estresse, para se observar o efeito deste no metabolismo das plantas e verificar as possíveis adaptações e modificações que poderiam ocorrer no seu metabolismo, uma vez que poderiam aumentar a produção de constituintes ativos (FARN DEN; ROBERTSON, 1980).

O efeito de condições de estresse no metabolismo secundário das plantas é derivado principalmente de esforços da pesquisa para incrementar a síntese de substâncias bioativas em espécies medicinais e aromáticas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

De acordo com Marschner (1995) a utilização de adubação nitrogenada adequada pode exercer um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das espécies vegetais. As respostas do metabolismo das plantas medicinais, frente às formas de nitrogênio, podem estar associadas às diferentes etapas de aquisição e assimilação.

Ao longo do processo evolutivo, as plantas desenvolveram uma variedade de mecanismos de adaptação a mudanças e fatores ambientais, destacando-se as anatômicas, fisiológicas e químicas para o crescimento em condições desfavoráveis a diversos tipos de ambientes (LARCHER, 2004).

A luz influencia diretamente o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, causando alterações morfofisiológicas em plantas cultivadas sob diferentes níveis de luz e tem demonstrado influenciar o teor e composição dos princípios ativos. A radiação solar desempenha um papel relevante no controle dos processos associados ao acúmulo de biomassa e é um dos fatores responsáveis pela produção vegetal (VILELA; RAVETTA, 2000; VALIO, 2001).

Conforme Nobel (1991) as plantas adaptam-se à intensidade luminosa e qualidade da luz regulando sua morfologia, estrutura, composição e estado

fisiológico, gerando modificações em suas vias metabólicas primárias e secundárias, causando diferentes respostas na tentativa de permitir, por meio de regulações, o alcance de seu estado funcional máximo.

O procedimento de aclimação dos vegetais consiste na sua adaptação às novas condições ambientais. Plantas que experimentam mudanças nas condições de luminosidade são capazes de, em maior ou menor grau, aclimatar-se ao novo ambiente, podendo ocorrer alterações nas características das folhas relacionadas à fotossíntese, mudanças no padrão de alocação de biomassa e modificações no conteúdo de pigmentos fotossintéticos (LEE et al., 2000; STANCATO et al., 2002).

A exposição das plantas a diferentes níveis de luz pode intensificar a produção de espécies reativas de oxigênio, o qual ocorre em locais diversos na célula e é responsável pela indução do estresse oxidativo. Nessa situação, os vegetais ativam um eficiente mecanismo de defesa antioxidante, na qual é capaz de remover ou neutralizar essas espécies reativas (FOYER et al., 1994).

Dentro deste contexto, a espécie *Achillea millefolium* L. é considerada um modelo de planta medicinal que deve ser explorado, pois ainda são incipientes as informações a respeito das condições ótimas de cultivo que proporcionem o máximo de produção de biomassa e princípios ativos, bem como a influência de fatores abióticos que promovam a síntese seletiva dessas moléculas.

Os estudos de variações do ambiente como a intensidade luminosa, qualidade de luz e fontes de nutrição podem ser uma estratégia para compreender o metabolismo primário e secundário desta planta. Além disso, o conhecimento da atividade biológica dessa espécie poderá levar a quantificação, identificação e isolamento de novas substâncias bioativas para serem empregadas na medicina popular e farmacêutica.

A planta do gênero *Achillea* da família Asteraceae está representada por aproximadamente 85 espécies, sendo a maioria encontrada na Europa, Ásia e Norte da América e cerca de 40 dessas espécies distribuídas largamente na Turquia (CANDAN et al., 2003).

A espécie de estudo é conhecida popularmente como mil-folhas, mil-ramas e mil-folhada é uma planta herbácea perene, rizomatosa, ereta, aromática, de 30-50 cm de altura e nativa da Europa, Norte da América, Sul da Austrália e Ásia. As folhas são compostas, finamente pinadas, de 5-8 cm de comprimento e as flores são brancas. A multiplicação desta planta se dá por estacas de rizoma e por divisão da

touceira e é uma espécie representativa da riqueza do metabolismo secundário. O nome latino do gênero deriva do herói grego Aquiles que a utilizou em uma de suas batalhas para curar seu rei e, o epíteto específico *millefolium* que significa mil-folhas é alusivo ao grande número de folíolos que possui (LORENZI; MATOS, 2002; LOPES et al., 2005).

Esta planta medicinal é utilizada no Brasil na medicina tradicional, por suas atividades antibacterianas, antitumorais, antifúngicas, anti-inflamatórias, antioxidantes, anti-hipertensivas, anti-histamínicas, contra dores reumáticas, febres, infecções respiratórias, úlceras e cicatrizantes (JORGE et al., 1999; HOLETZ et al., 2002; SHAPIRA et al., 2005; SALVAGNINI et al., 2006).

Este vegetal tem sido alvo de diversas avaliações quanto às propriedades biológicas de seu óleo essencial. Alguns dos constituintes já identificados nesse óleo são cineol, borneol, α e β -pineno, cânfora, azuleno, nerolidol, cariofileno, eucaliptol e terpineol (LORENZI; MATOS, 2002; TEIXEIRA et al., 2003; SALVAGNINI et al., 2006).

Tem-se observado desde 1997 um crescente interesse pela medicina alternativa e fitoterapia, especialmente no uso de princípios ativos extraídos das plantas medicinais com propriedades antimicrobianas (PARK et al., 1997). No Brasil, o Ministério da Saúde já disponibilizou a utilização de alguns medicamentos fitoterápicos pelo SUS (Sistema Único de Saúde) e *A. millefolium* L. é uma das espécies de interesse por gerar produtos bioativos (BRASIL, 2009).

Com base nesses fatores, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante, crescimento, síntese de pigmentos fotossintéticos e metabólitos secundários em *A. millefolium* L. (mil-folhas) sob influência de fatores abióticos (intensidade luminosa, qualidade de luz, períodos de coleta e fertilização nitrogenada).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, Ministério da Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS)**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf. 2009.

CANDAN, F.; UNLU, M.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A.; AKPULAT, H. A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 215-220, 2003.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMELENA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 06-08, 2004.

FARN DEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. In: BERGERSEN, F. J. (ed). **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**, p. 279-286, 1980.

FOYER, C. H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K. J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 696-717, 1994.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G. C.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

JORGE, L. I. F.; PREGNOLATTO, B. P.; CHICOUREL, E. L. ZAMARIOLLI, L. A.; GRACIANO, R. A. S. Anatomy and evaluation of the antimicrobial activity in vitro of yarrow *Achillea millefolium* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 449-458, 1999.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2004. 531 p.

LEE, D. W.; OBERBAUER, S. F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S. K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **Journal of Botany**, v. 87, n. 4, p. 447-455, 2000.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Antibacterial activity of hydroalcoholic extract leaves of jambolan (*Syzygium cumini* L. Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; JUNIOR, C. M. J.; MOREIRA, R. R. D.; CARLOS, I. Z. Effect of the essential oil of *Achillea millefolium* L. in the production of hydrogen peroxide and tumor necrosis factor in murine macrophages. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. São Paulo: Nova Odessa, 2002. 428 p.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Revista Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 129-438, 2002.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2 ed. London: Academic Press, 1995. 862 p.

NOBEL, P. S. **Physicochemical and environmental plant physiology**. San Diego: Academic Press, 1991. 635 p.

NOLDIN, V. F. Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynara scolymus* L. (Artichoke) cultivated in Brazil. **Revista Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J. L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Archives of Biology and Technology**, v. 40, p. 97-106, 1997.

SHAPIRA, M. Y.; RAPHAELOVICH, Y.; GILAD, L.; DUMB, A. J.; INGBER, A. Treatment of atopic dermatitis with herbal combination of Eleutherococcus, *Achillea millefolium* and *Lamium album* has no advantage over placebo: A double blind, placebo-controlled, randomized trial. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 4, p. 691-693, 2005.

SALVAGNINI, L. E.; MIGLIATO, K. F.; ISAAC, V. L. B.; CORREA, M. A.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. Evaluation of efficacy of preservatives associated with *Achillea millefolium* L. extract against *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 75-77, 2006.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. 1102 p.

STANCATO, G. C.; MAZZAFERA, P.; BUCKERIDGE, M. S. Carbon assimilation and partitioning in epiphyte orchid *Cattleya forbesii* Lindl. x *Laelia tenebrosa* Rolfe under extrem levels of irradiance. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 2, p. 229-235, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assessment of two medicinal plants *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in vitro and in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 551-555. 2003.

VALIO, I. F. M. Effects of shading and removal of plant parts on growth of *Trema micrantha* seedlings. **Tree Physiology**, v. 21, n. 1, p. 65-70, 2001.

VILELA, A. E.; RAVETTA, D. A. The effect of radiation on seedling growth and physiology in four species of *Prosopis* L. (Mimosaceae). **Journal of Arid Environments**, v. 44, n. 4, p. 415-423, 2000.

Atividade antimicrobiana *in vitro* e rendimento do óleo essencial de *Achillea millefolium* L.

RESUMO: A importância da espécie medicinal *A. millefolium* L. (mil-folhas) é devido às suas atividades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antitumorais e antioxidantes. Objetivou-se neste trabalho avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* e o rendimento do óleo essencial de *A. millefolium* L. cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e concentrações de nitrogênio. As plantas foram cultivadas sob três concentrações de nitrogênio (0, 75 e 150 kg ureia ha⁻¹) e submetidas a dois níveis de sombreamento 0% (luz plena) e 70% (sombreamento 70%). Adotou-se o delineamento experimental de blocos casualizados com quatro repetições em um fatorial 3x2 (concentrações de nitrogênio x níveis de sombreamento). Pode-se verificar com os resultados que ocorreu um alto controle de qualidade do material vegetal, garantindo a segurança de extração do óleo essencial. O rendimento do óleo extraído de flores foi estimulado pela concentração nitrogenada intermediária e o extraído de tecidos foliares foi favorecido sob luz plena, sendo maior nas estruturas reprodutivas. A atividade antimicrobiana do óleo foi confirmada frente aos microrganismos, sendo as cepas fúngicas inibidas pela menor concentração. Os resultados obtidos demonstram que a utilização do óleo essencial de *A. millefolium* L., devido às propriedades antimicrobianas, pode apresentar grande potencialidade de exploração pela indústria farmacêutica.

Palavras-chave: mil-folhas, óleo essencial, concentrações de nitrogênio, níveis de sombreamento.

ABSTRACT: Antimicrobial activity *in vitro* and essential oil yield of *Achillea millefolium* L.. The importance of medicinal species *A. millefolium* L. (yarrow) is due to its antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antitumoral and antioxidant activities. The objective of this study was to evaluate *in vitro* antimicrobial activity and essential oil yield of *A. millefolium* L. grown under different levels of shading and nitrogen levels. Plants were cultivated under three nitrogen levels (0, 75 and 150 kg urea ha⁻¹) and subjected to two levels of shading 0% (full light) and 70% (70% shading). The experimental design was delineated in randomized blocks with four replicates in a factorial 3x2 (nitrogen levels x levels of shading). Results demonstrated a high quality control of plant material, ensuring the security of essential oil extraction. Oil yield extracted from flowers was stimulated by medium nitrogen level and full light increased the oil yield extracted from leaves. The highest essential oil yield was observed in reproductive structures. Antimicrobial activity of oil was confirmed against microorganisms species. Yeast strains were inhibited by the lowest concentration. Results showed that essential oil from *A. millefolium* L. can be potentially used by pharmaceutical industry due to its antimicrobial properties.

Key words: yarrow, essential oil, nitrogen levels, levels of shading.

INTRODUÇÃO

De acordo com Kinghorn (2001) a utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança.

A extração do óleo essencial de plantas medicinais deve ser realizada em estruturas vegetais com um alto controle de qualidade na pós-colheita e o processo de secagem é crucial para preservar adequadamente os princípios ativos, objetivando levar o material vegetal a baixos teores de umidade, permitindo a conservação e manutenção de sua integridade física e química. No caso de plantas produtoras de óleo, a secagem deve ser criteriosa em razão da volatilidade dos óleos essenciais (Simões et al., 2004).

A obtenção de produtividade diferenciada no teor de óleo essencial pode ser corroborada por meio do estudo da interferência de fatores abióticos, como a disponibilidade de nutrientes e intensidade luminosa. Entre os nutrientes, o nitrogênio merece destaque pela grande influência no crescimento e desenvolvimento das plantas (Simões et al., 2004; Wamser & Mundstock, 2007).

A adubação nitrogenada é utilizada quando o solo apresenta baixa capacidade em fornecer a quantidade de nitrogênio exigida pela cultura. No entanto, somente uma parte do nitrogênio suplementado através da adubação é utilizada pela planta. A eficiência da adubação depende de características do vegetal, como taxa de absorção e eficiência de utilização do nutriente (Wamser & Mundstock, 2007). Essa eficiência quanto à resposta das plantas ao nitrogênio é influenciada também pelos fatores abióticos, como a luminosidade.

A luz é primordial para o crescimento dos vegetais, não só por fornecer energia para a fotossíntese, mas também por gerar sinais que regulam seu desenvolvimento. Dessa forma, modificações nos níveis de luminosidade, aos quais uma espécie está adaptada, podem condicionar diferentes respostas fisiológicas em suas características bioquímicas, anatômicas e de crescimento (Atroch et al., 2001; Lima et al., 2011) e, entre essas, destaca-se a assimilação do nitrogênio. O

suprimento adequado de nitrogênio estimula o crescimento foliar, por aumentar a divisão celular, e a fotossíntese, devido à maior quantidade de componentes das reações fotoquímicas e daqueles responsáveis pela assimilação de CO₂ (Lawlor, 2002).

Estudos com espécies medicinais têm evidenciado uma plasticidade fisiológica em função dos fatores abióticos (Letchano & Gosselin, 1996). Fatores como fotoperíodo, temperatura e intensidade luminosa podem determinar nas espécies a época ideal de colheita e o local de cultivo em que poderá se obter maiores quantidades de princípios ativos no óleo essencial e com isso influenciar nas suas propriedades farmacológicas.

A espécie medicinal *Achillea millefolium* L. (mil-folhas), da família Asteraceae, é uma planta herbácea, perene, rizomatosa, de 30-50 cm de altura, possui folhas compostas e flores reunidas em capítulos densamente corimbosos (Candan et al., 2003; Lorenzi & Matos, 2008). É de clima temperado quente a subtropical, tolerando condições climáticas extremas como o sol, geada, seca, frio e não se adapta a regiões com excesso de precipitações. A multiplicação se dá por estacas de rizoma e por divisão da touceira, garantindo um desenvolvimento homogêneo (Lorenzi & Matos, 2008).

Esta espécie é nativa da Europa, América do Norte, Sul da Austrália e Ásia e suas propriedades medicinais são atribuídas às atividades antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antitumoral, dentre outras, avaliadas a partir do óleo essencial e do extrato metanólico obtidos de flores, folhas e raízes (Candan et al., 2003; Lopes et al., 2003; Rosa et al., 2008).

As investigações sobre as ações desta planta tiveram início sobre as atividades biológicas e farmacológicas atribuídas ao óleo essencial. Pesquisas

demonstraram que o óleo apresenta ação fungistática principalmente contra *Candida albicans* e ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Kedzia et al., 1990). Candan et al. (2003) demonstraram a atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Candida albicans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Acinetobacter lwoffii* e *Candida krusei*, além da atividade antioxidante.

O óleo essencial desta espécie é composto pelos monoterpenos (30-80%), sesquiterpenos (8-62%) e em menor quantidade por outras substâncias (1-3%), como álcoois, ésteres, aldeídos e carotenoides (Hofmann et al., 1992). Os principais constituintes do óleo essencial são sabineno, β -pineno, cânfora, borneol, 1,8-cineol, α -terpineol, óxido de bisabolol, camazuleno, farnesol, cariofileno, linalool e eugenol (Hofmann et al., 1992; Candan et al., 2003).

Tem-se observado desde 1997 um crescente interesse pela medicina alternativa e fitoterapia, especialmente no uso de princípios ativos extraídos das plantas medicinais com propriedades antimicrobianas (Park et al., 1997). No Brasil, o Ministério da Saúde já disponibilizou a utilização de alguns medicamentos fitoterápicos pelo SUS (Sistema Único de Saúde) e *A. millefolium* L. é uma das espécies de interesse por gerar produtos bioativos (Brasil, 2009).

Ainda são escassas as informações sobre a influência da disponibilidade de luz e de nitrogênio sobre a produção de plantas medicinais. A compreensão das respostas dos vegetais a esses fatores abióticos pode contribuir para a adequação de condições de cultivo que proporcionem uma elevada síntese de princípios ativos com atividade biológica.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* e o rendimento do óleo essencial extraído de folhas e flores de *A. millefolium* L. cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e concentrações de nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODO

A espécie foi identificada taxonomicamente e as exsicatas foram catalogadas no herbário PEL, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas sob o número 24.600.

O cultivo de *A. millefolium* L. e a condução dos experimentos foram realizados nas áreas experimentais do Campus Pelotas - Visconde da Graça (CAVG) do Instituto Federal Sul-rio-grandense, Pelotas, RS.

As mudas, obtidas por divisão de touceiras, foram cultivadas em estufa e, então, transferidas para a área experimental. A propagação foi realizada a partir de uma planta matriz, o que possibilita identificar melhor os efeitos das alterações do ambiente promovidas pelos tratamentos. As mudas obtidas, quando atingiram quatro meses de idade, foram transferidas para o campo experimental e irrigadas através de um sistema de gotejamento.

O solo onde o experimento foi instalado é classificado como planossolo, que se caracteriza por apresentar um horizonte B textural e condições de encharcamento, pela dificuldade de drenagem natural (Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004). Os teores de fósforo e potássio do solo foram corrigidos com superfosfato triplo e cloreto de potássio nas proporções de 35 kg ha⁻¹ e 15 kg ha⁻¹, respectivamente, tendo como base as necessidades nutricionais da espécie medicinal *Calendula officinalis* L., a qual pertence à mesma família de mil-folhas. Esse procedimento foi adotado devido à inexistência de recomendação de adubação para *A. millefolium* L.

As plantas foram cultivadas sob três concentrações de nitrogênio (0, 75 e 150 kg ureia ha⁻¹) durante cinco meses. Ao atingirem o estágio de desenvolvimento

reprodutivo, caracterizado pela floração plena, foram submetidas a dois níveis de sombreamento: 0% (luz plena) e 70% (sombreamento 70%), utilizando malha preta da marca ChromatiNet, tendo permanecido sombreadas por oito semanas, quando então foi realizada a coleta.

Os experimentos foram conduzidos sob um delineamento experimental em blocos inteiramente casualizados, em um fatorial 3x2 (concentrações de nitrogênio e níveis de sombreamento), com quatro repetições e a unidade experimental consistiu de dez plantas espaçadas em 40 cm.

As folhas e flores das plantas separadamente foram submetidas à pré-secagem em local ventilado, a temperatura ambiente, com ausência de luz direta, por 10 dias e após foram secas em estufa de circulação forçada de ar modelo MA035 (Marconi) a 30°C por 24 horas. Os materiais desidratados foram armazenados em pequenos lotes em sacos de papel pardo e acondicionados em uma sala desumidificada com temperatura de 20°C. As folhas e flores secas foram submetidas à moagem em moinho de rotor modelo Pulverisette 14 (Fritsch, Alemanha) com granulometria de 0,5 mm à velocidade de 8000 rpm.

Os testes de pureza incluíram as determinações do teor de umidade (parâmetro utilizado como indicativo das condições de armazenamento da matéria-prima) e teor de cinzas totais (determinação da quantidade de impurezas inorgânicas não voláteis como materiais estranhos, areia e terra).

O teor de umidade foi determinado de acordo com o método descrito na Farmacopeia Brasileira (2000). As amostras de 3 g de folhas e flores secas e moídas separadamente tiveram suas massas aferidas em balança analítica, utilizando cápsulas com tampa de alumínio, previamente dessecadas em estufa a 100°C por 15 minutos e em dessecador por 45 minutos. Após a aferição das

massas, as amostras foram colocadas em estufa à temperatura de 105°C por 5 horas. Depois de arrefecidas à temperatura ambiente em dessecador, foram submetidas a uma nova pesagem até a obtenção do peso constante. A porcentagem do teor de umidade foi obtida pela equação: $P(\%) = (P_1 - P_2) / P_a \times 100$ em que P_1 representa o peso da cápsula com tampa contendo a amostra antes da dessecação, P_2 o peso da cápsula com tampa contendo a amostra após a dessecação e P_a o peso da amostra.

A determinação do teor de cinzas totais foi obtida seguindo a técnica descrita na Farmacopeia Brasileira (2000). Para isso, foi pesado 1 g de folhas e flores secas e moídas separadamente em cadinhos de porcelana previamente lavados, calcinados, arrefecidos e pesados. Após a distribuição das amostras nos cadinhos foram incineradas a temperatura de 600°C em mufla modelo Q318M (Quimis) por 4 horas. Depois de arrefecidas à temperatura ambiente em dessecador por 30 minutos, foram submetidas a uma nova pesagem em balança analítica. A porcentagem do teor de cinzas totais foi obtida pela equação: $P(\%) = (P_1 - P_2) / P_a \times 100$ em que P_1 representa o peso do cadinho contendo as cinzas, P_2 o peso do cadinho e P_a o peso da amostra.

A extração do óleo essencial foi realizada em amostras de 70 g de folhas e flores secas e moídas separadamente, através da técnica de arraste a vapor em aparelho de Clevenger, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2000). O material vegetal foi inserido em balão volumétrico, ao qual foi acrescentado 1500 mL de água ultra pura (Milli-Q). O tempo de refluxo foi de 4 horas, contados a partir do início da fervura. Após o período de extração, o hidrolato, obtido da hidrodestilação, foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação, utilizando três porções de 5 mL de diclorometano. As frações orgânicas foram reunidas e desidratadas com

3 g de sulfato de sódio anidro por 15 minutos em agitação. O sal foi removido por filtração com lã de vidro e o solvente evaporado à temperatura ambiente em capela de exaustão de gases por 48 horas, obtendo-se o óleo desidratado. O rendimento em porcentual do óleo essencial foi calculado com base na massa seca livre de umidade (Santos et al., 2004).

O óleo essencial extraído de folhas e flores foi testado frente as cepas microbianas de coleção (American Type Culture Collection - ATCC) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e *Candida albicans* ATCC 18804, além de cepas isoladas *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*.

Para confirmar a pureza dos inóculos foi realizada coloração de Gram em todas as cepas. A concentração inibitória mínima (CIM) determinou a menor concentração capaz de inibir o crescimento celular sendo visualizada através da técnica de microdiluição, utilizando placas de 96 cavidades e meio de cultura caldo BHI acrescido de 1% de Tween 80 (agente emulsificante) (Nascimento et al., 2007).

As diluições do óleo essencial foram realizadas em meio de cultura, obtendo-se as concentrações 100; 50; 25 e 12,5 mg mL⁻¹, na qual foram adicionadas em cada cavidade 90 µL de amostra. A concentração final de cada inóculo foi de 1,5x10⁵ UFC mL⁻¹, padronizada pela escala 0,5 de MacFarland (1,5x10⁸ UFC mL⁻¹), sendo inoculado 10 µL de inóculo em cada cavidade.

Em relação aos controles, o meio de cultivo sem inóculo foi usado como controle negativo, o meio e inóculo como controle positivo de viabilidade celular e o meio com cada diluição do óleo essencial sem inóculo para descartar a possibilidade

de contaminação. Foram realizadas três repetições para cada amostra e as placas foram incubadas por 24h a 37°C.

As leituras foram obtidas com a adição de 20 µL do Cloreto de 2,3,5 Trifenil Tetrazólio a 0,5% em cada cavidade das placas, para após serem incubadas a 37°C por 30 minutos. Esse sal reage com o FADH₂ (flavina adenina dinucleotídeo forma reduzida) disponível no meio formando cristais de formazan, na qual a mudança na coloração para vermelho indica atividade celular (Deswal & Chand, 1997).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro. A análise estatística foi realizada com o programa estatístico SAS (Sas System, 2002).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Em relação ao teor de umidade em tecidos foliares e reprodutivos de *A. millefolium* L. pode-se observar que todas as amostras analisadas se mostraram satisfatórias quanto ao teor de umidade, na qual as amostras de folhas apresentaram uma média de 9,49% e de flores 7,99%, sendo valores inferiores a 12%, considerado limite para o teor de umidade ideal em plantas da família Asteraceae, conforme a Farmacopeia Brasileira (2000). Esses valores indicam que o processo de secagem dessas estruturas vegetais foi eficiente para a conservação do material vegetal e preservação dos compostos bioativos.

Os teores de cinzas totais em tecidos foliares e reprodutivos de *A. millefolium* L. se mostraram adequados ao preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2000), pois as amostras de folhas apresentaram uma média de 12,90% e de flores 8,24%, sendo estes menores que 15%, considerado valor máximo em plantas da família

Asteraceae, indicando que a quantidade de impurezas inorgânicas não voláteis analisadas estavam dentro das especificações exigidas.

Analisando os testes de pureza, verificados pelos teores de umidade e cinzas totais, as amostras de folhas e flores de *A. millefolium* L. apresentaram um controle de qualidade adequado, garantido assim a qualidade de extração do óleo essencial.

Foi constatado por análise visual que o óleo essencial extraído de folhas e flores de *A. millefolium* L. é um líquido com alta viscosidade e com intensa coloração azul devido à presença de azuleno, camazuleno e proazuleno (Júnior et al., 1994).

As concentrações nitrogenadas e os níveis de sobreamento afetaram de forma significativa, respectivamente, o rendimento do óleo essencial extraído de flores e folhas de *A. millefolium* L., não ocorrendo interação entre os fatores (Anexo - Tabela A). O rendimento do óleo essencial extraído de folhas não foi influenciado significativamente pelas concentrações de nitrogênio, enquanto que o extraído de flores foi incrementado pela concentração de 75 Kg ureia ha⁻¹ (Tabela 1).

TABELA 1. Rendimento do óleo essencial (%) extraído de flores de *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio (0, 75 e 150 kg ureia ha⁻¹)

Concentrações de nitrogênio (kg ureia ha ⁻¹)	Rendimento do óleo essencial (%)
0	0,5014 b
75	0,6333 a
150	0,5292 b*

(*) Médias não seguidas da mesma letra na coluna diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Similarmente, Hornok (1983) avaliando a influência da nutrição mineral no rendimento e composição do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), *Coriandrum sativum* L. (coentro) e *Mentha piperita* L. (menta) relatou que a aplicação de 100 kg ha⁻¹ de fertilizante nitrogenado aumentou o conteúdo total de óleo essencial. Da mesma forma, Singh (1999) avaliou diferentes concentrações de

nitrogênio (0, 25, 50 e 75 Kg ha⁻¹) na produção do óleo essencial de *Pogostemon patchouli* P. (pachuli), observando maior produção do óleo com a aplicação de 50 Kg ha⁻¹ de nitrogênio.

Padrão de resposta semelhante foi encontrado por Maia (1998) estudando o desenvolvimento de *Mentha arvensis* L. (menta), na qual evidenciou que houve diferença no rendimento do óleo essencial, quando as plantas foram cultivadas com altas concentrações de nitrogênio.

Dessa forma, o nitrogênio tem ações variáveis, afetando de diferentes maneiras os teores de óleos essenciais nas plantas medicinais, havendo respostas distintas conforme a espécie vegetal, condições ambientais e tratos culturais (Paulus et al., 2004).

O rendimento do óleo essencial de *A. millefolium* L. foi influenciado significativamente pelos níveis de sombreamento, independentemente das diferentes concentrações nitrogenadas (Anexo - Tabela A). O óleo essencial extraído de tecidos foliares foi estimulado de maneira significativa pela luz plena (Tabela 2), enquanto que o extraído de flores não mostrou diferença entre os diferentes níveis de sombreamento.

TABELA 2. Rendimento do óleo essencial (%) extraído de folhas de *Achillea millefolium* L. submetida a dois níveis de sombreamento (sem sombreamento - SS e com sombreamento 70% - CS)

Níveis de sombreamento	Rendimento do óleo essencial (%)
SS	0,2353 a
CS	0,1887 b*

(*) Médias não seguidas da mesma letra na coluna diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em relação à intensidade de luz sobre o rendimento de óleo essencial, resultados semelhantes foram encontrados com erva-cidreira (*Lippia alba* M.), em que plantas submetidas a um nível maior de irradiância tiveram elevação no teor de

óleo essencial (Ventrela & Ming, 2000). A alta intensidade luminosa também aumentou o rendimento de óleo essencial extraído da parte aérea de carqueja (*Baccharis trimera* L.) (Silva et al., 2006) e de tecidos foliares das plantas de alfazema-do-Brasil (*Aloysia gratissima* G.) (Pinto et al., 2007).

Pode-se observar, em relação aos valores das médias isoladas, que o rendimento do óleo essencial extraído de flores foi mais elevado do que o extraído de folhas, indicando serem as flores o sítio principal de produção e armazenamento de princípios ativos em *A. millefolium* L., na qual Simões et al. (2004) verificaram que os óleos voláteis podem estar armazenados em diversos órgãos da planta como flores (laranjeira e bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto e louro), caules (canela), rizomas (gengibre), frutos (anis, funcho e erva-doce) e sementes (noz-moscada), o que influencia o rendimento do óleo extraído de diferentes partes do vegetal.

Resultados obtidos com *A. millefolium* L., em trabalho conduzido por Júnior et al. (1994), demonstraram que o rendimento do óleo essencial variou de acordo com a parte do vegetal da qual se fez a extração, mostrando que os caules produziram 0,18 mL g⁻¹ de óleo por massa seca, as folhas 0,41 mL g⁻¹ e as flores 1,67 mL g⁻¹, confirmando com os resultados obtidos nesse trabalho.

A Tabela 3 apresenta o comportamento das cepas bacterianas e fúngicas testadas através da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial extraído de folhas de *A. millefolium* L.

As diferentes concentrações de nitrogênio e os níveis de sombreamento não afetaram a atividade inibitória do óleo extraído de tecidos foliares frente às cepas de microrganismos testadas, pois a atividade biológica desse óleo foi muito semelhante entre os tratamentos.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (mg mL^{-1}) do óleo essencial extraído de folhas de *Achillea millefolium* L. cultivada sob concentrações de nitrogênio (0, 75 e 150 kg ureia ha^{-1}) e submetida a níveis de sombreamento (sem sombreamento - SS e com sombreamento 70% - CS) para diferentes microrganismos

Microrganismos	Concentração inibitória mínima (mg mL^{-1})					
	0 Kg ureia ha^{-1}		75 Kg ureia ha^{-1}		150 Kg ureia ha^{-1}	
	SS	CS	SS	CS	SS	CS
Bactérias Gram-positivas						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12,5	12,5	12,5	25	12,5	12,5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Bacillus cereus</i>	12,5	12,5	12,5	25	12,5	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5	12,5	12,5	25	12,5	12,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12,5	25	12,5	25	12,5	12,5
Bactérias Gram-negativas						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	100	100	50	100	100	100
<i>Salmonella</i> sp.	100	100	100	100	100	50
<i>Enterobacter aerogenes</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Shigella flexneri</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Klebsiella</i> sp.	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i>	100	100	50	100	100	100
Fungos						
<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Candida albicans</i>	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5

A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$ foi considerada com atividade de inibição forte, a de 25 mg mL^{-1} moderada, a de 50 mg mL^{-1} fraca e a de 100 mg mL^{-1} muita fraca, sendo concentrações significativas. Os valores de CIM acima de 100 mg mL^{-1} foram considerados não significativos, ou seja, não apresentaram atividade de inibição, com base nos critérios de avaliação propostos por Alijannis et al. (2001); Sartoratto et al. (2004).

O óleo essencial, frente as cepas bacterianas *E. faecalis* ATCC 19433, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. aerogenes*, *S. flexneri* e *Klebsiella* sp., não mostrou atividade inibitória nas concentrações testadas frente a esses microrganismos.

Os valores de CIM do óleo essencial frente as cepas bacterianas *E. coli* ATCC 8739, *Salmonella* sp. e *E. coli* variaram de 50 a 100 mg mL^{-1} , evidenciando que a atividade de inibição desse óleo foi de fraca a muito fraca.

As cepas bacterianas *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus*, *S. aureus* e *S. epidermidis* mostraram-se sensíveis às concentrações testadas do óleo essencial, pois se verificou que os valores de CIM variaram de 12,5 a 25 mg mL⁻¹, mostrando uma atividade inibitória classificada como forte a moderada.

As cepas fúngicas de *C. albicans* ATCC 18804 e *C. albicans* foram inibidas pela menor concentração do óleo essencial testada (12,5 mg mL⁻¹), desenvolvendo-se apenas no controle de viabilidade celular, evidenciando uma atividade forte.

O comportamento das cepas bacterianas e fúngicas testadas através da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial extraído de flores de *A. millefolium* L. está representado na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (mg mL⁻¹) do óleo essencial extraído de flores de *Achillea millefolium* L. cultivada sob concentrações de nitrogênio (0, 75 e 150 kg ureia ha⁻¹) e submetida a níveis de sombreamento (sem sombreamento - SS e com sombreamento 70% - CS) para diferentes microrganismos

Microrganismos	Concentração inibitória mínima (mg mL ⁻¹)					
	0 Kg ureia ha ⁻¹		75 Kg ureia ha ⁻¹		150 Kg ureia ha ⁻¹	
	SS	CS	SS	CS	SS	CS
Bactérias Gram-positivas						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	12,5	25	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Bacillus cereus</i>	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12,5	12,5	25	12,5	25	25
Bactérias Gram-negativas						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	50	100	50	50	50	50
<i>Salmonella</i> sp.	100	50	50	50	100	50
<i>Enterobacter aerogenes</i>	100	50	100	50	100	100
<i>Shigella flexneri</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Klebsiella</i> sp.	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Escherichia coli</i>	50	100	50	50	50	50
Fungos						
<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Candida albicans</i>	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5

Os tratamentos, concentrações de nitrogênio e níveis de sombreamento, não influenciaram a atividade inibitória do óleo extraído de flores frente às cepas

testadas, porque os dados revelam que a atividade biológica desse óleo foi muito similar entre esses tratamentos.

As concentrações inibitórias mínimas do óleo essencial frente às cepas bacterianas *E. coli* ATCC 8739, *Salmonella* sp., *E. aerogenes* e *E. coli* variaram de 50 a 100 mg mL⁻¹, mostrando uma atividade de inibição fraca a muito fraca e, frente a cepas bacterianas *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. flexneri* e *Klebsiella* sp., o óleo não mostrou atividade inibitória nas concentrações testadas.

No entanto, as cepas bacterianas *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 19433, *S. aureus* e *S. epidermidis* mostraram-se sensíveis às concentrações testadas, porque os valores de CIM variaram de 12,5 a 25 mg mL⁻¹, mostrando uma atividade inibitória classificada como forte a moderada.

A espécie *B. cereus* e as cepas fúngicas de *C. albicans* ATCC 18804 e *C. albicans* foram inibidas pela menor concentração testada 12,5 mg mL⁻¹, comprovando uma atividade de inibição forte.

Pode-se verificar que as cepas *E. faecalis* ATCC 19433 e *E. aerogenes* não foram inibidas pelo óleo extraído de folhas, mas, pelo óleo extraído de flores, a inibição foi comprovada, indicando que alguns compostos ativos presentes somente nas flores possam ter ação específica frente a essas espécies de microrganismos.

As diferenças na atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído de folhas e flores de *A. millefolium* L. podem ser justificadas devido à variabilidade na composição química, sendo composta por monoterpenos, sesquiterpenos e compostos fenólicos (Hofmann et al., 1992) como sabineno, β -pineno, cânfora, borneol, 1,8-cineol, α -terpineol, óxido de bisabolol, camazuleno, farnesol, cariofileno, linalool e eugenol (Candan et al., 2003; Hofmann et al., 1992).

Os resultados demonstram que o efeito inibidor do óleo essencial de *A. millefolium* L. sobre o crescimento bacteriano foi altamente eficiente para bactérias Gram-positivas, em relação às bactérias Gram-negativas, especialmente para o óleo obtido de flores. O composto químico β -pineno encontrado no óleo essencial extraído das flores de *A. millefolium* L. (Gudaityte & Venskutonis, 2007) é um efetivo inibidor do crescimento de cepas bacterianas Gram-positivas (Leite et al., 2007), o que pode explicar os resultados obtidos.

As espécies bacterianas Gram-negativas são as mais resistentes à ação dos óleos essenciais, em relação às Gram-positivas, devido à composição de sua bicamada lipídica formada de peptidoglicano (Souza et al., 2006). Essa barreira seria a responsável por restringir a difusão de compostos hidrofóbicos, evitando a ação direta do óleo e de seus componentes bioativos (Oussalah et al., 2007).

Conforme relatam Koyama et al. (1997), muitas substâncias dos óleos essenciais, as quais são diferentes qualitativamente e quantitativamente em cada óleo, possuem uma habilidade específica para romper ou penetrar na estrutura bacteriana. Para se conhecer o modo de atuação dos óleos seria necessário avaliar separadamente cada princípio ativo do óleo essencial e a combinação para averiguar se eles têm ação bactericida ou bacteriostática, sozinhos ou sincronizados.

CONCLUSÃO

O rendimento do óleo essencial extraído de flores é estimulado pela aplicação de nitrogênio, sendo esta resposta dependente da concentração e a luz plena favorece o rendimento do óleo extraído de tecidos foliares.

As flores apresentam um maior rendimento de óleo essencial, quando comparado com os tecidos foliares.

O óleo essencial de *A. millefolium* L. possui elevada atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas Gram-positivas e cepas fúngicas, sendo inibidas pela menor concentração, considerada eficiente para avaliação de efeitos inibitórios do óleo sobre o crescimento de microrganismos.

Os resultados de atividade antimicrobiana obtidos demonstram que o óleo essencial extraído de folhas e flores de *A. millefolium* L., poderá ser de grande interesse pela indústria farmacêutica para geração de produtos bioativos, atuando principalmente contra as bactérias Gram-positivas.

REFERÊNCIA

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.9, p.4168-4170, 2001.

ATROCH, E.M.A.C. et al. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas de *Bauhinia forficata* submetidas a diferentes condições de sombreamento. **Revista de Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.4, p.853-862, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS)**. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf. 2009.

- CANDAN, F. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.87, p.215-220, 2003.
- DESWAL, D.P.; CHAND, U. Standartization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellate* T.) seeds. **Seed Science and Technology**, v.25, n.1, p.409-17, 1997.
- Farmacopeia Brasileira**. 4.ed. São Paulo: Editora Atheneu, parte II, segundo fascículo, 2000. 243p.
- GUDAITYTE, O.; VENSKUTONIS, P.R. Chemotypes de *Achillea millefolium* transferred from 14 different locations in Lithuania to the controlled environment. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, p.582-592, 2007.
- HOFMANN, L. et al. Essential oil composition of three polyploids in the *Achillea millefolium* complex. **Phytochemistry**, v.31, n.2, p.537-542, 1992.
- HORNOK L. Influence of nutrition on the yield and content of active compounds in some essential oil plants. **Acta Horticulturae**, v.132, p.239-247, 1983.
- JÚNIOR, C.C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162p.
- KEDZIA, B. et al. Effect of yarrow essential oil and its components on pathogenic microorganisms. **Herba Polonica**, v.36, n.3, p.117-125, 1990.
- KINGHORN, A.D. Pharmacognosy in the 21 century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, p.135-148, 2001.
- KOYAMA, S. et al. A new substance (yoshixol) with interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanase traditional tree (kiso hinoki) *Chamaecyparis obtusa*. **General Pharmacology**, v.28, p.797-804, 1997.

LAWLOR, D.W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.370, p.773-787, 2002.

LEITE, A.M. et al. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, n.1, p.121-126, 2007.

LETSCHANO, W.; GOSSELIN, A. Transpiration essential oil gland, epicuticular wax and morphology of *Thymus vulgaris* are influenced by light intensity and water supply. **Journal Horticultural Science**, v.71, n.1, p.123-134, 1996.

LIMA, M.C. et al. Crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos em *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e doses de nitrogênio. **Ciência Rural**, v.41, n.1, p.45-50, 2011.

LOPES, F.C.M. et al. Avaliação da atividade imunológica de *Achillea millefolium* L. (mil-folhas). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.2, p.11-13, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MAIA, N.B. Efeito da nutrição mineral na qualidade do óleo essencial da menta (*Mentha arvensis* L.) cultivada em solução nutritiva. In: JÚNIOR, C.C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. (Eds.). **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agronômica**. Botucatu: UNESP, p.81-95, 1998.

NASCIMENTO, P.F.C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial de métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*. **Food Control**, v.18, p.414-420, 2007.

PAULUS, D. et al. Rendimento de biomassa e óleo essencial de menta japonesa (*Mentha arvensis* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.1, p.34-42, 2004.

PARK, Y.K. et al. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Archives of Biology and Technology**, v.40, p.97-106, 1997.

PINTO, J.E.B.P. et al. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-Brasil em função de níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, v.25, p.210-214, 2007.

ROSA, M.B. et al. Estudo espectrofotométrico da atividade fotoprotetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. capitata, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (JACQ.) cass e *Sonchus oleraceus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.5, n.1, p.101-110, 2008.

SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIREDO, F.J.C.; NETO, O.G.R. Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Comunicado técnico - EMBRAPA**, v.99, 2004. ISSN 1517-2244.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2004.

SAS LEARNING EDITION. Program SAS - **Getting started with the SAS learning edition**. Cary, North Carolina, 2002. 200p.

- SILVA, F.G. et al. Influence of radiation level on plant growth, yield, and quality of essential oil in carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.52-57, 2006.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004. 1102p.
- SINGH, M. Effect of irrigation and nitrogen levels on herbage and oil yield of patchouli (*Pogostemon patchouli*) on alfisols. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science**, v.21, p.689-691, 1999.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. **Manual de adubação e de calagem para os estados do RS e de SC**. Porto Alegre, 2004. 400p.
- SOUZA, E.L. et al. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.527-532, 2006.
- VENTRELLA, M.C.; MING, L.C. Produção de matéria seca e óleo essencial em folhas de erva-cidreira sob diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. **Horticultura Brasileira**, v.18, p.972-974, 2000.
- WAMSER, A.F.; MUNDSTOCK, C.M. Adubação nitrogenada em estádios fenológicos em cevada cultivar MN 698. **Revista Ciência Rural**, v.37, p.942-948, 2007.

**EFEITO DA QUALIDADE DE LUZ SOBRE O CRESCIMENTO E SÍNTESE DE
PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS EM *Achillea millefolium* L.**

RESUMO: A planta *A. millefolium* L., conhecida como mil-folhas, é uma espécie medicinal herbácea, rizomatosa e perene. O efeito da qualidade de luz sobre o crescimento dessa planta ainda é pouco conhecido. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de *A. millefolium* L., cultivada sob diferentes condições de luminosidade e períodos de coleta, quanto às características de crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos. As plantas foram cultivadas sob condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha azul, vermelha e preta) e submetidas a períodos de coleta (oito semanas de sombreamento, duas e quatro semanas após sombreamento). O aumento da massa seca das folhas e flores foi favorecido nas plantas cultivadas sob luz plena. A redução da intensidade luminosa com malha vermelha causou menor decréscimo da massa seca de folhas em relação às demais malhas. Os teores de clorofila *a* e *b* foram maiores nas plantas cultivadas sob a malha azul, o conteúdo de clorofila total foi menor nas plantas sob luz plena e em plantas com duas semanas após o sombreamento ocorreu um incremento de clorofila *a*, *b* e total. Sendo assim, a qualidade luminosa e intensidade de luz interferem no crescimento de *A. millefolium* L. e as modificações na biossíntese de pigmentos fotossintetizantes geradas em função dos tratamentos, sugerem que essa espécie apresenta capacidade de se adaptar a uma ampla variação de condições de luminosidade.

Palavras-chave: clorofila, massa seca, mil-folhas, luminosidade.

**EFFECT LIGHT QUALITY ON GROWTH AND PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS
PRODUCTION IN *Achillea millefolium* L.**

ABSTRACT: *A. millefolium* L., known as yarrow, is medicinal plant herbaceous, rhizomatous and perennial. The effect of light quality on growth of yarrow still is little known. The objective of this work was to evaluate the growth and photosynthetic pigments production in *A. millefolium* L. grown under different light conditions and collection periods. Plants were cultivated under light conditions (full light and blue, red and black shade net) and collection periods (eight weeks of shading, two and four weeks after shading). Increases in dry weight of leaves and flowers were stimulated under full light. Reduction of light intensity by red net caused less decrease in leaves dry weight than other shading treatments. Chlorophyll *a* and *b* levels were higher in plants cultivated under blue net and content of total chlorophyll was lower in plants exposed to full light. Chlorophyll *a*, *b* and total accumulated in leaves two weeks after plants return from shading treatment. Thus light quality and light intensity interfere in growth of *A. millefolium* L. and changes in photosynthetic pigments production generated by treatments, suggesting that species has ability to adapt to wide range of light conditions.

Key words: chlorophyll, dry weight, yarrow, light.

1 INTRODUÇÃO

A espécie medicinal *A. millefolium* L. (mil-folhas), pertencente à família Asteraceae, é uma planta herbácea, perene, rizomatosa, de 30-50 cm de altura, apresenta folhas compostas e flores dimorfas reunidas em capítulos densamente corimbosos (CANDAN et al., 2003;

LORENZI; MATOS, 2008). É de clima temperado quente a subtropical, tolerando condições climáticas extremas como o sol, geada, seca, frio e não se adapta a regiões com excesso de precipitações. A multiplicação se dá por estacas de rizomas e por divisão da touceira, o que garante um desenvolvimento homogêneo (LORENZI; MATOS, 2008).

Esta planta é nativa da Europa, América do Norte, Sul da Austrália e Ásia e suas propriedades medicinais são atribuídas às atividades antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, dentre outras, estudadas a partir de óleo essencial e do extrato metanólico obtidos de flores, folhas e raízes (CANDAN et al., 2003; LOPES et al., 2003; ROSA et al., 2008).

A luz é um fator abiótico de fundamental importância para as plantas, atuando na regulação de seu crescimento e desenvolvimento. As respostas morfofisiológicas dos vegetais não dependem apenas da presença, atenuação ou ausência da luz, mas da variação em qualidade luminosa (TAIZ; ZEIGER, 2013). A radiação solar não é para as plantas somente uma fonte de energia (efeito fotoenergético), mas um estímulo que aciona o condicionamento do desenvolvimento (efeito fotocibernético) e, às vezes, funciona como um fator estressante (efeito fotodestrutivo) (LARCHER, 2004).

Segundo Larcher (2004), a radiação é percebida pelo sistema fitocromo, o qual ativa genes específicos que conduzem o desenvolvimento e a diferenciação. O fitocromo é um pigmento proteico que absorve luz mais fortemente nas regiões do vermelho (650-680 nm), vermelho-distante (710-740 nm) e azul (460-490 nm).

Estudos de crescimento de plantas têm sido realizados na busca pelo conhecimento da ecofisiologia de diversas espécies submetidas a diferentes condições de luminosidade, seja pelo controle da radiação incidente, por meio do emprego de lâmpadas de distintos comprimentos de ondas ou pelo uso de malhas redutoras da radiação (SHAHAK et al., 2004).

Neste contexto, as malhas redutoras da radiação ou malhas coloridas representam um novo conceito agrotecnológico, que objetiva combinar a proteção física, juntamente com a filtragem diferencial da radiação solar, promovendo respostas fisiológicas desejáveis, reguladas pela luz (SHAHAK et al., 2004). Pode-se estabelecer distintas condições de cultivo para as plantas pela manipulação da intensidade e qualidade espectral através da utilização de malhas. De modo diferente das casas de vegetação, essas malhas exercem uma menor interferência sobre o microclima da planta, pois são capazes de modificar tanto a quantidade como a qualidade da radiação solar transmitida, melhorando o rendimento dos cultivos (OREN-SHAMIR et al., 2001).

De acordo com Larcher (2004), a malha vermelha tem a finalidade de alterar o espectro da luz, reduzindo as ondas azuis, verdes e amarelas e acrescentando as ondas na faixa espectral do vermelho e vermelho-distante. A malha azul muda o espectro da luz, reduzindo as ondas na faixa do vermelho e vermelho-distante e acrescentando as ondas azuis. Dessa forma, a malha azul transmite maior energia que a malha vermelha. Já a malha preta é considerada neutra, ou seja, apenas reduz a irradiância e não altera o espectro de luz.

Plantas que experimentam mudanças nas condições de luz são capazes de em maior ou menor grau aclimatar-se à nova condição. Essa aclimação ocorre no sentido de maximizar o ganho total de carbono que pode ocorrer através de mudanças nas propriedades de assimilação pelas folhas, por meio de ajustes fisiológicos e alterações nas características foliares relacionadas à fotossíntese ou ainda a mudanças no padrão de alocação de biomassa em favor da parte vegetativa mais afetada pela mudança de luz (LEE et al., 2000).

Conforme Grime e Mackey (2002) essa adaptação é o reflexo do desenvolvimento de mudanças em características funcionais e estruturais dos vegetais associada aos fatores abióticos a que estão expostos, resultando na plasticidade fenotípica. Assim, pode-se definir

essa plasticidade como sendo a habilidade que um genótipo tem de expressar diferentes fenótipos em resposta a distintos ambientes.

Para inferir a contribuição de diferentes processos fisiológicos nos vegetais, a análise de crescimento ainda é o meio mais simples e preciso, sendo útil no estudo de variações entre plantas sob diferentes condições de luminosidade (CONCEIÇÃO et al., 2005).

As alterações na disponibilidade de radiação solar em um ambiente podem influenciar também a quantidade de clorofila total, assim como a fração de clorofila *a* em relação à clorofila *b*, sendo importante a determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos quando se quer fazer inferência à ação da luminosidade sobre os caracteres fisiológicos em plantas. As respostas apresentadas pelas plantas à variação na disponibilidade de luz costumam envolver, ainda, alterações nas características das folhas relacionadas ao teor de clorofila (STANCATO et al., 2002).

Ainda são incipientes as informações sobre a influência de diferentes condições de luminosidade sobre o crescimento e produção de plantas medicinais brasileiras. A compreensão das respostas das plantas a esse fator pode contribuir para a adequação de condições de cultivo que proporcionem elevada produção de fitomassa.

Com base nesses fatores, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de *A. millefolium* L., cultivada sob diferentes condições de luminosidade e períodos de coleta, quanto às características de crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A espécie foi identificada taxonomicamente e as exsiccatas foram catalogadas no herbário PEL, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas sob o número 24.600.

O cultivo de *A. millefolium* L. e a condução dos experimentos foram realizados nas áreas experimentais do Campus Pelotas - Visconde da Graça (CAVG) do Instituto Federal Sul-rio-grandense, Pelotas, RS.

As mudas, obtidas por divisão de touceiras, foram cultivadas em estufa e, então, transferidas para a área experimental. A propagação foi realizada a partir de uma planta matriz, o que possibilita identificar melhor os efeitos das alterações do ambiente promovidas pelos tratamentos. A base da área experimental foi preparada utilizando plástico preto para cobertura de solo, com a finalidade de reduzir o número de plantas invasoras. As mudas obtidas, quando atingiram quatro meses de idade, foram transferidas para o campo experimental e irrigadas através de um sistema de gotejamento.

O solo onde o experimento foi instalado é classificado como planossolo, que se caracteriza por apresentar um horizonte B textural e condições de encharcamento, pela dificuldade de drenagem natural (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, 2004). Os teores de fósforo e potássio do solo foram corrigidos com superfosfato triplo e cloreto de potássio na proporção de 35 kg ha⁻¹ e 15 kg ha⁻¹, respectivamente, tendo como base as necessidades nutricionais da espécie medicinal *Calendula officinalis* L., a qual pertence à mesma família de mil-folhas. Esse procedimento foi adotado devido à inexistência de recomendação de adubação para *A. millefolium* L.

As plantas foram cultivadas sob diferentes condições de luminosidade: luz plena e sombreamento obtido com malha azul, vermelha e preta. As malhas da marca ChromatiNet foram fornecidas pela empresa Polysack Plastic Industries[®].

As plantas sombreadas e as submetidas à luz plena permaneceram nestas condições por oito semanas, quando foi realizada a primeira coleta (metade do número de plantas e amostras de tecidos foliares) e as malhas de sombreamento foram removidas. Após duas semanas de readaptação ao ambiente natural, amostras de folhas foram coletadas,

caracterizando a segunda coleta. A outra metade do número de plantas e novas amostras de folhas foram coletadas com quatro semanas de readaptação, finalizando a terceira coleta.

Os experimentos foram conduzidos sob um delineamento experimental em blocos inteiramente casualizados, em um fatorial 4x3 (condições de luminosidade e períodos de coleta) (para análises de pigmentos fotossintéticos) e 4x2 (condições de luminosidade e períodos de coleta) (para análise de massa seca), com quatro repetições e a unidade experimental consistiu de cinco plantas.

Para medição do fluxo de radiação fotossinteticamente ativa foi instalado um radiômetro marca LICOR, modelo LI-185B, sobre uma base de alumínio, equipada com três parafusos niveladores e nível de bolha. O sensor foi posicionado no centro do bloco com o tratamento de luz plena, de forma a medir o fluxo de radiação incidente. Após, o sensor foi posicionado abaixo das malhas azul, vermelha e preta para aferir o fluxo de radiação transmitida. Os dados da radiação pontual, registrados em unidade de medida instantânea (Watts m^{-2}), foram obtidos em um dia de sol sem nuvens às 14 horas, na qual foram convertidos em porcentagem de atenuação.

O fluxo de radiação pontual transmitida foi aferido nas malhas coloridas, a qual foi verificada nas malhas vermelha, azul e preta uma intensidade de 200, 160 e 80 watts m^{-2} , respectivamente, o que corresponde a uma atenuação de 58%, 66% e 83% respectivamente.

As relações de redução da luminosidade proporcionada pela coloração de cada malha, com base na coleta de dados instantâneos de radiação, mostra que o percentual de redução da transmitância proporcionada pela malha vermelha é menor do que nas malhas azul e preta.

O crescimento das plantas foi determinado pelo acúmulo de massa seca das folhas e flores e os resultados foram expressos em g planta^{-1} . As plantas foram submetidas à pré-secagem em local ventilado, em temperatura ambiente, e após foram secas em estufa de circulação forçada de ar modelo MA035 (Marconi) a 35°C até atingirem peso constante. O

material desidratado foi armazenado em sacos de papel pardo para posterior pesagem, em balança semi-analítica.

A extração e quantificação dos pigmentos fotossintetizantes foram realizadas com base em Wellburn (1994). Foram coletadas aleatoriamente três folhas jovens expandidas de cada parcela e acondicionadas em banho de gelo, em caixa de isopor. As folhas foram cortadas em pequenos segmentos, desprezando-se a nervura central. Para cada extração, foi utilizado 0,06 g de amostra em tubos, contendo 7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) neutralizado com carbonato de cálcio 5% (m/v). Os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 1 hora e, após, resfriados no escuro até atingirem temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas as leituras de absorbâncias dos extratos em espectrofotômetro a 665 nm, 649 nm e 480 nm. A partir das leituras espectrofotométricas, foram calculados os teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides totais, segundo equações específicas para cada pigmento (WELLBURN, 1994) e os resultados foram expressos em mg g⁻¹ MF.

Os dados resultantes das coletas foram submetidos às análises de variância (médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro) e de correlação de Pearson (coeficiente de correlação linear simples ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste t). A análise estatística foi realizada com o programa estatístico SAS (SAS SYSTEM, 2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes condições de luminosidade influenciaram significativamente o acúmulo de massa seca de *A. millefolium* L., não ocorrendo interação entre esse fator e os períodos de coleta para as características de crescimento avaliadas (Anexo - Tabela B).

As plantas que produziram maior quantidade de massa seca de folhas e flores foram àquelas cultivadas sob luz plena. Os menores valores de massa seca das folhas foram observados nas plantas sombreadas pelas malhas azul e preta, que não diferiram entre si. Já a massa seca das flores reduziu significativamente nas plantas sombreadas, não diferindo entre os tratamentos com as malhas azul, vermelha e preta (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Massa seca (g planta^{-1}) dos tecidos foliares de *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha azul, vermelha e preta) e submetida a períodos de coletas (oito semanas de sombreamento - 8SS e quatro semanas após o sombreamento - 4SAS)

Table 1 - Dry weight (g plant^{-1}) of leaf tissues of *Achillea millefolium* L. grown under different light conditions (full light and blue, red and black shade net) and collection periods (eight weeks shadowing - 8SS and four weeks after shading - 4SAS)

Condições de luminosidade				Períodos de coletas	
Luz plena	Malha azul	Malha vermelha	Malha preta	8SS	4SAS
73,74 a*	41,28 c	58,16 b	39,64 c	49,11 b	57,30 a

(*) Médias não seguidas da mesma letra na linha diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 2 - Massa seca (g planta^{-1}) das flores de *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha azul, vermelha e preta) e submetida a períodos de coletas (oito semanas de sombreamento - 8SS e quatro semanas após o sombreamento - 4SAS)

Table 2 - Dry weight (g plant^{-1}) of flowers of *Achillea millefolium* L. grown under different light conditions (full light and blue, red and black shade net) and collection periods (eight weeks shadowing - 8SS and four weeks after shading - 4SAS)

Condições de luminosidade				Períodos de coletas	
Luz plena	Malha azul	Malha vermelha	Malha preta	8SS	4SAS
18,28 a*	6,66 b	10,90 b	9,40 b	8,24 b	14,38 a

(*) Médias não seguidas da mesma letra na linha diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Similarmente, em *Baccharis trimera* L., também pertencente à família Asteraceae, o aumento da intensidade luminosa induziu uma alta produção de biomassa (SILVA et al., 2006).

O menor efeito inibitório da atenuação da luminosidade pela malha vermelha sobre o acúmulo de massa seca foliar em *A. millefolium* L. sugere que a luz na região do vermelho foi mais eficientemente aproveitada pelas plantas em relação à azul e preta (Tabela 1).

O fitocromo é um pigmento proteico que tem um importante papel no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo regulado pela luz. Quando as moléculas de fitocromo na forma Pr são expostas a luz vermelha, a maior parte absorve e é convertida à forma Pfr (forma fisiologicamente ativa do fitocromo) (TAIZ; ZEIGER, 2013), o que vai de encontro com os dados observados por Almeida e Mundstock (2001) que verificaram uma melhoria da qualidade da luz obtida pela adição de luz vermelha, o que proporcionou maior acúmulo de massa seca em plantas de trigo.

Os resultados apresentados nas tabelas 1 e 2 mostram que a qualidade de luz interfere no desenvolvimento das plantas de *A. millefolium* L. De acordo com Shahak (2008) a malha preta reduz a quantidade de luminosidade que chega às plantas, mas não afeta a qualidade de luz, bem como não modifica a composição espectral.

Conforme Chang et al. (2008) a redução na irradiância leva à redução na taxa de fotossíntese e de crescimento, o que comprova os resultados observados em *A. millefolium* L., cultivada sob diferentes condições de luminosidade.

Os períodos de exposição aos tratamentos influenciaram de maneira distinta o acúmulo de massa seca das folhas e flores de *A. millefolium* L. Nas plantas coletadas após quatro semanas de readaptação ao sombreamento foi observada maior quantidade de massa seca tanto de folhas como de flores, em relação às plantas coletadas após oito semanas de sombreamento (Tabelas 1 e 2).

Em relação às estruturas vegetais, analisando separadamente, observou-se maior quantidade de massa seca de folhas, quando comparada com a massa seca de flores (Tabelas 1 e 2).

Esses resultados mostram que as plantas necessitam de luz plena para incrementar a produção de biomassa, na qual foi necessário um período de aclimação após serem submetidas a diferentes condições de luminosidade. Os dados sugerem que os efeitos inibitórios do sombreamento sobre o incremento de massa seca são plenamente revertidos em plantas de *A. millefolium* L. para a qualidade espectral e intensidade de luz avaliada.

Os teores foliares de pigmentos fotossintéticos das plantas de *A. millefolium* L. foram influenciados pelas diferentes condições de luminosidade e pelos períodos de coleta, não ocorrendo interação entre esses fatores (Anexo - Tabela C).

As folhas das plantas cultivadas sob a malha azul apresentaram o maior teor de clorofila *a*, *b* e total, diferindo estatisticamente das outras condições de luminosidade (Tabela 3). A clorofila *a* absorve intensamente luz na região do azul e do vermelho, na qual está o espectro de ação para a fotossíntese, o que poderia explicar o comportamento da espécie à malha azul (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Resultado semelhante foi observado em plantas de *Mikania glomerata* S., da família Asteraceae, na qual a malha azul 50% incrementou a concentração de clorofila *a* e *b* nos tecidos foliares (SOUZA et al., 2010).

Uma maior proporção relativa de clorofila *b* em plantas com baixa luminosidade possibilita a captação de energia de outros comprimentos de onda e transfere para uma molécula específica de clorofila *a*, que efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese. Essa característica é adaptativa da planta, de modo a se tornar mais eficiente em condições ambientais de reduzida intensidade de luz (SCALON et al., 2002).

Tabela 3 - Teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides totais (mg g⁻¹ MF) em folhas de *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha azul, vermelha e preta)

Table 3 - Concentration of chlorophyll *a*, *b*, total and total carotenoids (mg g⁻¹ MF) in leaves of *Achillea millefolium* L. grown under different light conditions (full light and blue, red and black shade net)

Condições de luminosidade	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	Carotenoides totais
Luz plena	1,09 c	0,39 c	1,48 c	0,22 a
Malha azul	1,43 a*	0,56 a	1,99 a	0,24 a
Malha vermelha	1,20 b	0,46 b	1,66 b	0,22 a
Malha preta	1,31 b	0,50 b	1,81 b	0,23 a

(*) Médias não seguidas da mesma letra na coluna diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A luz azul influencia na biossíntese de clorofilas e outros pigmentos através da regulação da expressão de determinados genes (TSUNOYAMA et al., 2001; TAIZ; ZEIGER, 2013). Isto pode explicar os resultados encontrados, onde maiores teores de clorofila *a* e *b* foram observados nas plantas tratadas com malha azul. As folhas das plantas submetidas à malha azul apresentavam-se visualmente mais verdes e brilhantes.

Embora a utilização de malhas no cultivo de *A. millefolium* L. tenha estimulado significativamente a produção das clorofilas *a* e *b*, o efeito das malhas vermelha e preta foi menos intenso e equivalente, demonstrando o maior estímulo estar diretamente relacionado à luz azul, pois esta afeta a biossíntese de clorofilas.

O teor foliar de clorofila total em *A. millefolium* L. foi estimulado de maneira significativa sob a malha azul, possivelmente para incrementar a capacidade de absorção de luz, diferindo estatisticamente das outras condições de luz, o que sugere ser uma resposta adaptativa das plantas à baixa intensidade luminosa (Tabela 3).

Similarmente, um menor teor de clorofila total foi observado em plantas de *Mikania glomerata* S., da família Asteraceae, cultivadas à luz plena, comparadas com plantas submetidas à presença de malhas redutoras de radiação (SOUZA et al., 2010).

Em baixos níveis de intensidade luminosa, a taxa fotossintética varia em proporção direta com o aumento da radiação incidente na superfície foliar. No entanto, a partir do ponto de saturação de luz, conforme aumenta a intensidade luminosa, a taxa fotossintética aumenta lentamente. Em condições de alta irradiância, o excesso pode ser responsável por dirigir uma série de reações, que podem conduzir à fotoinibição, na qual é uma condição de extremo estresse em que se verifica uma diminuição do rendimento da fotossíntese, acompanhado das alterações nas atividades do fotossistema II (HIDEG; MURATA, 1997).

Quanto aos teores de carotenoides totais, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabelas 3 e 4). Como a coloração da malha não influenciou os teores foliares de carotenoides totais sugere-se que o sombreamento manteve as temperaturas no dossel das plantas de forma mais adequada à síntese de pigmentos do que à sua degradação.

Tabela 4 - Teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides totais (mg g⁻¹ MF) em folhas de *Achillea millefolium* L. submetida a períodos de coleta (oito semanas de sombreamento - 8SS, duas e quatro semanas após o sombreamento - 2SAS e 4SAS)

Table 4 - Concentration of chlorophyll *a*, *b*, total and total carotenoids (mg g⁻¹ MF) in leaves of *Achillea millefolium* L. subjected collection periods (eight weeks shadowing - 8SS, two and four weeks after shading - 2SAS and 4SAS)

Períodos de coleta	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	Carotenoides totais
8SS	1,20 b	0,43 b	1,63 b	0,24 a
2SAS	1,36 a*	0,54 a	1,90 a	0,21 a
4SAS	1,19 b	0,46 b	1,65 b	0,23 a

(*) Médias não seguidas da mesma letra na coluna diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Da mesma forma, Henrique et al. (2011) observaram que o acúmulo de carotenoides totais não foi influenciado pelas diferentes malhas redutoras de radiação em *Coffea arabica* L. da família Rubiaceae.

As alterações analisadas na biossíntese de pigmentos fotossintetizantes geradas pelas variações espectrais proporcionam uma adaptação e vantagem à *A. millefolium* L., a fim de melhorar e auxiliar seu desempenho fotossintético. Observa-se que os teores de clorofila *a*, *b* e total apresentaram correlação positiva elevada, indicando que foram influenciados de forma semelhante pelos tratamentos. Além disso, mostra que existe uma relação direta entre os dois pigmentos na contribuição ao teor de clorofila total como resposta adaptativa de *A. millefolium* L. às diferentes condições de luz. O mesmo foi observado em relação ao teor de carotenoides totais, mas o coeficiente de correlação positiva foi menor, indicando que o teor de clorofilas está relacionado ao de carotenoides totais (Tabela 5).

Ainda pode-se verificar que o acúmulo da massa seca de flores correlacionou-se positivamente ao observado em folhas, sugerindo que a partição de assimilados entre os dois órgãos vegetais foi influenciada similarmente pelas condições de luminosidade avaliadas (Tabela 5).

Os diferentes períodos de exposição aos tratamentos influenciaram significativamente o acúmulo de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides totais em tecidos foliares de *A. millefolium* L. (Anexo - Tabela C). O mesmo foi observado por Stancato et al. (2002), na qual alterações na disponibilidade de radiação solar em um ambiente podem influenciar a quantidade de clorofila total, assim como a fração de clorofila *a* em relação à clorofila *b*.

Após o sombreamento das plantas por duas semanas, o teor foliar de clorofila *a*, *b* e total foi estimulado de forma significativa e o mesmo não ocorreu com o conteúdo foliar de carotenoides totais, pois não sofreu influência durante os períodos de coleta (Tabela 4).

Esses resultados demonstram que embora a utilização de malhas tenha estimulado a produção foliar de clorofila *a*, *b* e total como resposta das plantas de *A. millefolium* L. à baixa intensidade luminosa, o aumento da síntese desses pigmentos com a readaptação das plantas à luz plena pode ser resultante do impacto da intensidade luminosa sob a retomada do crescimento, resposta comum a todos os tratamentos e não influenciada pela variação da luz nos diferentes espectros empregados. Este efeito mostrou-se transitório e possivelmente associado ao desenvolvimento das plantas, quando observado a redução dos teores desses pigmentos no período correspondente a quatro semanas após sombreamento (Tabela 4).

Tabela 5 - Coeficiente de correlação de Pearson entre pigmentos fotossintetizantes e massa seca de *Achillea millefolium* L.

Table 5 - Pearson correlation coefficient between photosynthetic pigments and dry mass of *Achillea millefolium* L.

Correlação	Coefficiente de correlação linear simples (r)*
Clorofila <i>a</i> /clorofila <i>b</i>	+ 0,82
Clorofila <i>a</i> /clorofila total	+ 0,97
Clorofila <i>a</i> /carotenoides totais	+ 0,35
Clorofila <i>b</i> /clorofila total	+ 0,93
Clorofila total/carotenoides totais	+ 0,34
Clorofila <i>a</i> /massa seca folhas	+ 0,47
Massa seca folhas/massa seca flores	+ 0,63

(*) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

Ainda pode-se observar que a variação no teor de clorofila *a* correlacionou-se positivamente com a massa seca de folhas, demonstrando que as variações nas concentrações desse pigmento fotossintético podem explicar o acúmulo de massa seca nesses órgãos vegetais frente às condições de luminosidade avaliadas (Tabela 5), sugerindo que o aumento da concentração desse pigmento proporcionaria uma melhor captação de luz, favorecendo a

produção de energia necessária para a fixação de CO₂ durante a fotossíntese e consequentemente maior acúmulo de massa seca.

4 CONCLUSÕES

A qualidade de luz e os períodos de coleta influenciam no crescimento e na síntese de pigmentos fotossintéticos em *A. millefolium* L. A redução da luminosidade reduz a massa seca foliar e de flores e estimula o acúmulo de clorofila *a*, *b* e total. O acúmulo de massa seca foliar é menor na presença da malha azul o que estimula o acúmulo de clorofila *a*, *b* e total em maior intensidade do que a malha vermelha, não refletindo porém em maior acúmulo de massa seca.

Os efeitos inibitórios da redução da intensidade luminosa ou mudança do seu espectro pela incidência predominante de luz na região do vermelho ou azul sobre o acúmulo de massa seca ou produção de pigmentos fotossintéticos são plenamente reversíveis quando as plantas retornam à condição de luz plena.

As modificações na biossíntese de pigmentos fotossintetizantes geradas pelas mudanças na intensidade luminosa e qualidade de luz proporcionam uma adaptação e vantagem à *A. millefolium* L., a fim de auxiliar no seu desempenho fotossintético, apresentando com isso uma grande plasticidade adaptativa à variação de luz ambiental.

5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. L.; MUNDSTOCK, C. M. Oat tillering affected by light quality in plants under competition. **Ciência Rural**, v. 31, p. 393-400, 2001.

- CANDAN, F.; UNLU, M.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A.; AKPULAT, H. A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 215-220, 2003.
- CHANG, X.; ALDERSON, P. G.; WRIGHT, C. J. Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, p. 216-223, 2008.
- CONCEIÇÃO, M. K.; LOPES, N. F.; FORTES, G. R. L. Análise de crescimento de plantas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) LAM) cultivares abóbora e da costa. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, p. 273-278, 2005.
- GRIME, J. P.; MACKEY, J. M. L. The role of plasticity in resource capture by plants. **Evolutionary Ecology**, v. 16, p. 299-307, 2002.
- HENRIQUE, P. C.; ALVES, J. D.; DEUNER, S.; GOULART, P. F. P.; LIVRAMENTO, D. E. Aspectos fisiológicos do desenvolvimento de mudas de café cultivadas sob telas de diferentes colorações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 458-465, 2011.
- HIDEG, E.; MURATA, N. The irreversible photoinhibition of the photosystem II complex in leaves of *Vicia faba* under strong light. **Plant Science**, v. 130, p. 151-158, 1997.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2004. 531 p.
- LEE, D. W.; OBERBAUER, S. F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M.; MOHAMAD, H.; YAP, S. K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **Journal of Botany**, v. 87, p. 447-455, 2000.
- LOPES, F. C. M.; PLACERES, M. P.; MOREIRA, R. R. D.; SANTOS, L. E. Avaliação da atividade imunológica de *Achillea millefolium* L. (mil-folhas). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 11-13, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. 2 ed., São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

OREN-SHAMIR, M.; GUSSAKOVSKY, E. E.; SHPIEGEL, E.; NISSIM-LEVI, A.; RATNER, K.; OVADIA, R.; GILLER, Y. E.; SHAHAK, Y. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, p. 353-361, 2001.

ROSA, M. B.; OLIVEIRA, T. G.; CARVALHO, C. A.; CARVALHO, L. M.; PERES, R. L. Estudo espectrofotométrico da atividade fotoprotetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. capitata, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (JACQ.) cass e *Sonchus oleraceus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, p. 101-110, 2008.

SAS LEARNING EDITION. **Program SAS Getting started with the SAS learning edition**. Cary: North Carolina, 2002. 200 p.

SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; RIGONI, M. R.; VERALDO, F. Crescimento inicial de mudas de espécies florestais nativas sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, v. 26, p. 1-5, 2002.

SHAHAK, Y.; GUSSAKOVSKY, E. E.; GAL, E.; GANELEVIN, R. Colornets: Crop protection and light-quality manipulation in one technology. **Acta Horticulturae**, v. 659, p. 143-151, 2004.

SHAHAK, Y. Photo-selective netting for improved performance of horticultural crops. A review of ornamental and vegetable studies carried out in Israel. **Acta Horticulture**, v. 770, p. 161-168, 2008.

SILVA, F. G.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; NASCIMENTO, E. A.; NELSON, D. L.; SALES, J. F.; MOL, D. J. S. Influence of radiation level on plant growth, yield and quality of essential oil in carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 52-57, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. **Manual de adubação e de calagem para os estados do RS e de SC.** Porto Alegre. 2004. 400 p.

SOUZA, G. S.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.; PINTO, J. E. B. P. Características biométricas e fisiológicas de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, p. 330-335, 2010.

STANCATO, G. C.; MAZZAFERA, P.; BUCKERIDGE, M. S. Carbon assimilation and partitioning in epiphyte orchid *Cattleya forbesii* Lindl. x *Laelia tenebrosa* Rolfe under extrem levels of irradiance. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 229-235, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 5 ed., Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TSUNOYAMA, Y.; MORIKAWA, K.; SHIINA, T.; TOYOSHIMA, Y. Blue light specific and differential expression of plastid sigma factor, Sig5 in *Arabidopsis thaliana*, FEBS lett. **Plant Physiology**, v. 516, p. 225-228, 2001.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 307-313, 1994.

**Atividade antioxidante de *Achillea millefolium* L. submetida a diferentes condições de
luminosidade**

Antioxidant activity *Achillea millefolium* L. under different light conditions

Resumo

A qualidade e intensidade de luz podem influenciar a síntese de compostos secundários com importantes atividades biológicas em plantas medicinais, influenciando, no entanto, a adaptabilidade do vegetal às variações de luminosidade. A espécie *A. millefolium* L., conhecida como mil-folhas, apresenta uma grande importância medicinal devido a sua atividade antioxidante. Neste trabalho foi avaliado o estresse oxidativo e a resposta do sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático de *A. millefolium* L., frente ao cultivo sob diferentes condições de luz. As plantas foram submetidas às diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha azul, vermelha e preta) durante oito semanas e após retornaram a luz plena durante duas e quatro semanas. A baixa luminosidade estimulou a enzima superóxido dismutase e o teor de peróxido de hidrogênio. A peroxidação lipídica foi reduzida na presença das malhas azul e vermelha e a baixa intensidade luminosa, gerada pelas malhas preta e azul, reduziu o acúmulo de ascorbato. O conteúdo de deidroascorbato aumentou durante a aclimação das plantas à luz plena e a atividade antioxidante foi mais acentuada em extratos de flores. Os resultados mostram que a variação da qualidade e intensidade de luz, principalmente durante o processo de aclimação, causam estresse oxidativo em *A. millefolium* L., gerando respostas diferenciadas entre os tratamentos.

Palavras-chave: mil-folhas, enzimas antioxidantes, estresse oxidativo, qualidade de luz.

Abstract

Light quality and intensity can influence synthesis of secondary compounds that display important biological activities in medicinal plants. Nevertheless, plant adaptability is influenced by light conditions. Antioxidant activity is one of the most important activities of *A. millefolium* L. species (yarrow). This work was to evaluated oxidative stress and response enzymatic and non-enzymatic defense system of *A. millefolium* L., grown under different light conditions. Plants were grown under different light conditions (full light and blue, red and black shade net) for eight weeks and after returned to full light condition for two and four weeks. Low light condition stimulated superoxide dismutase enzyme and hydroden peroxide level. Lipid peroxidation decreased under blue and red net. Low light intensity generated by black and blue nets reduced ascorbate accumulation.

Dehydroascorbate content increased during plant acclimation to full light and antioxidant activity was more accentuated in flowers extracts. Results show that light quality and intensity, mainly during acclimation process, cause oxidative stress in *A. millefolium* L., generating differentiated responses among light treatments.

Key words: yarrow, antioxidant enzymes, oxidative stress, light quality.

INTRODUÇÃO

A luz, dentre os fatores abióticos, é um recurso fundamental para o desenvolvimento das plantas, pois diversas respostas morfofisiológicas não dependem apenas da presença, atenuação ou ausência da luz, mas da variação de sua qualidade espectral (Taiz e Zeiger, 2013).

As malhas redutoras da radiação ou malhas coloridas combinam a proteção física, juntamente com a filtragem diferencial da radiação solar, promovendo distintas respostas fisiológicas reguladas pela luz (Shahak *et al.*, 2004). Pode-se estabelecer diferentes condições de cultivo para as plantas pela manipulação da intensidade e qualidade espectral através da utilização de malhas (Oren-Shamir *et al.*, 2001).

Para Larcher (2004), a malha vermelha altera o espectro da luz, reduzindo as ondas azuis, verdes e amarelas e acrescenta as ondas na faixa espectral do vermelho e vermelho-distante. A malha azul muda o espectro da luz, reduzindo as ondas na faixa do vermelho e vermelho-distante e acrescenta as ondas azuis. Dessa forma, a malha azul transmite maior energia que a malha vermelha e a malha preta é considerada neutra, pois reduz a irradiância e não altera o espectro de luz.

Plantas que experimentam mudanças nas condições de luz são capazes de em maior ou menor grau aclimatar-se à nova condição. Esta aclimação ocorre no sentido de aumentar o ganho total de carbono que pode ocorrer através de mudanças nas propriedades de assimilação pelas folhas, por meio de ajustes fisiológicos e alterações nas suas características relacionadas à fotossíntese (Lee *et al.*, 2000). De acordo com Grime e Mackey (2002), essa adaptação é o reflexo do desenvolvimento de mudanças em características funcionais e estruturais dos vegetais, associada aos fatores abióticos a que estão expostos, resultando na plasticidade fenotípica.

As plantas, durante o ciclo de vida, estão expostas a diversas situações desfavoráveis, que se traduzem por desequilíbrios ou estresses. Neste contexto, um estresse representa uma alteração das condições adequadas de crescimento e desenvolvimento de um vegetal, o que gera respostas a diferentes níveis, que passam por alterações fisiológicas, bioquímicas, moleculares e na expressão de genes (Buchanan *et al.*, 2001).

O estresse oxidativo é um fator chave no estresse abiótico e biótico que ocorre quando, ao nível celular, gera um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a defesa antioxidante, o que originará alterações drásticas na fisiologia celular (Foyer e Noctor, 2005).

Conforme Apel e Hirt (2004), as espécies reativas de oxigênio são formas de oxigênio atmosférico (O_2) parcialmente reduzidas que resultam do metabolismo aeróbio. São subprodutos que resultam da inversão de um elétron do O_2 para formar o oxigênio singlete (1O_2) ou da transferência de um, dois ou três elétrons para O_2 formar, respectivamente, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxilo (HO^{\bullet}).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham uma função fisiológica importante nas plantas, pois, em quantidades muito reduzidas, atuam como moléculas sinalizadoras para a regulação do desenvolvimento, crescimento e ciclo celular. Contudo, um aumento elevado da quantidade e acúmulo dessas espécies pode provocar a ativação de respostas de estresses e mecanismos de defesa por parte da planta (Mittler *et al.*, 2004; Moller *et al.*, 2007). Deste modo, a quantidade e tipos de ROS podem ser utilizados pelo vegetal para monitorar o seu nível de estresse intracelular, possibilitando a adaptação da planta a situações adversas (Mittler, 2002).

As principais consequências do estresse oxidativo são a peroxidação dos lipídeos de membrana, oxidação proteica, inibição enzimática e danos ao nível do DNA e RNA, provocando senescência, funcionamento inadequado da fotossíntese e necrose das folhas (Scandalios, 2002).

A regulação entre a produção e degradação de espécies reativas de oxigênio é efetuada através de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Dat *et al.*, 2004).

Os mecanismos enzimáticos incluem as enzimas capazes de remover, neutralizar ou eliminar os radicais livres. Os parâmetros que determinam a contribuição das diferentes enzimas na eliminação do efeito nocivo são a afinidade pelo substrato, taxa de reação e concentração da enzima, nos diversos compartimentos celulares (Mittler *et al.*, 2004). Entre os principais mecanismos antioxidantes enzimáticos, destaca-se a importância da Catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APX), Superóxido dismutase (SOD) e Glutathione redutase (GR) (Scandalios, 2002; Mittler, 2002).

A catalase é uma enzima que se encontra nos peroxissomas, onde promove a decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 , a uma taxa extremamente elevada. Entre as enzimas que degradam o H_2O_2 , a catalase é a única que consegue catalisar este substrato sem consumir equivalentes redutores, constituindo, assim, um mecanismo eficiente de remoção de H_2O_2 (Scandalios, 2005; Gechev e Breusegem, 2006).

A ascorbato peroxidase caracteriza-se por possuir uma elevada especificidade pelo ascorbato, sendo a enzima responsável pela eliminação do poder tóxico do H_2O_2 , produzindo dehidroascorbato e H_2O , no cloroplasto e citosol das células vegetais (Asada, 1999).

A superóxido dismutase é responsável pela dismutação do radical superóxido em O_2 e H_2O_2 , que é posteriormente eliminado pela catalase ou através da ascorbato peroxidase. Esta enzima encontra-se presente em todos os compartimentos celulares, ou seja, mitocôndrias, cloroplastos, glioxissomas, peroxissomas, apoplasto e citosol (Scandalios, 2005; Gechev e Breusegem, 2006).

A glutationa redutase é uma enzima que catalisa a redução dependente de NADPH da glutationa oxidada para a forma reduzida. Apesar de ser sintetizada no citosol, pode ser direcionada tanto para o cloroplasto quanto para a mitocôndria. Essa enzima mantém um balanço redox nos compartimentos celulares, atuando na eliminação do H₂O₂ citosólico. Além disso, sua maior importância no sistema antioxidante está na habilidade em regenerar outros antioxidantes, como o ácido ascórbico (Blokhina *et al.*, 2003).

Além do sistema de defesa antioxidante enzimático, as defesas antioxidantes não enzimáticas são de fundamental importância para as células vegetais, sendo essencialmente compostas de concentrações relativamente altas de ascorbato, glutationa, α -tocoferol e compostos fenólicos, que são eficientes consumidores de oxirradicais e são capazes de interagir não enzimaticamente com as espécies reativas de oxigênio (Davey *et al.*, 2000).

A espécie medicinal *Achillea millefolium* L. (mil-folhas), pertencente à família Asteraceae, é nativa da Europa, América do Norte, Sul da Austrália e Ásia e possui como propriedades medicinais as atividades antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica e antitumoral (Candan *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2003).

As características botânicas dessa planta são herbácea, perene, rizomatosa, de 30-50 cm de altura, folhas compostas e flores reunidas em capítulos corimbosos (Candan *et al.*, 2003; Lorenzi e Matos, 2008). É de clima temperado quente a subtropical, tolerando condições climáticas extremas como o sol, geada, seca, frio e não se adapta a regiões com excesso de precipitações. A multiplicação se dá por estacas de rizoma e por divisão de touceira, garantindo um desenvolvimento homogêneo (Lorenzi e Matos, 2008).

Devido a sua importância medicinal, investigações a respeito do comportamento fisiológico desta espécie e suas respostas às condições do ambiente tornam-se necessárias ao aperfeiçoamento dos métodos de cultivo. Dessa forma, o estudo da ação de componentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos é uma ferramenta extremamente importante para o melhor entendimento de respostas fisiológicas de *A. millefolium* L. frente a condições de estresse abiótico.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar o estresse oxidativo e resposta do sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático de *A. millefolium* L., submetida a diferentes condições de luz e períodos de coleta.

MATERIAIS E MÉTODOS

A espécie foi identificada taxonomicamente e as exsicatas foram catalogadas no herbário PEL, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas sob o número 24.600.

O cultivo de *A. millefolium* L. e a condução dos experimentos foram realizados nas áreas experimentais do Campus Pelotas - Visconde da Graça (CAVG) do Instituto Federal Sul-rio-grandense, Pelotas, RS.

As mudas, obtidas por divisão de touceiras, foram cultivadas em estufa e, então, transferidas para a área experimental. A propagação foi realizada a partir de uma planta matriz, o que possibilita identificar melhor os efeitos das alterações do ambiente promovidas pelos tratamentos. A base da área experimental foi preparada utilizando plástico preto para cobertura de solo, com a finalidade de reduzir o número de plantas invasoras. As mudas obtidas, quando atingiram quatro meses de idade, foram transferidas para o campo experimental e irrigadas através de um sistema de gotejamento.

O solo onde o experimento foi instalado é classificado como planossolo, que se caracteriza por apresentar um horizonte B textural e condições de encharcamento, pela dificuldade de drenagem natural (Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004). Os teores de fósforo e potássio do solo foram corrigidos com superfosfato triplo e cloreto de potássio na proporção de 35 kg ha⁻¹ e 15 kg ha⁻¹, respectivamente, tendo como base as necessidades nutricionais da espécie medicinal *Calendula officinalis* L., a qual pertence à mesma família de mil-folhas. Esse procedimento foi adotado devido à inexistência de recomendação de adubação para *A. millefolium* L.

As plantas foram cultivadas sob diferentes condições de luminosidade: luz plena e sombreamento obtido com malha azul, vermelha e preta. As malhas da marca ChromatiNet foram fornecidas pela empresa Polysack Plastic Industries[®].

As plantas sombreadas e as submetidas à luz plena permaneceram nestas condições por oito semanas, quando foi realizada a primeira coleta (metade do número de plantas e amostras de tecidos foliares) e as malhas de sombreamento foram removidas. Após duas semanas de readaptação ao ambiente natural, amostras de folhas foram coletadas, caracterizando a segunda coleta. A outra metade do número de plantas e novas amostras de tecidos foliares foram coletadas com quatro semanas de readaptação, finalizando a terceira coleta.

Os experimentos foram conduzidos sob um delineamento experimental em blocos inteiramente casualizados, em um fatorial 4x3 (condições de luminosidade e períodos de coleta) (para análises enzimáticas e não enzimáticas) e 4x2 (condições de luminosidade e períodos de coleta) (para atividade antioxidante), com quatro repetições e a unidade experimental consistiu de cinco plantas.

Foram determinadas as atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) e glutathiona redutase (GR, EC 1.6.4.2), teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), concentração de ascorbato (Asc) e dehidroascorbato (DHA) e atividade antioxidante (método DPPH) de extratos obtidos com diferentes solventes extratores.

O extrato enzimático para a dosagem da atividade das enzimas antioxidantes foi obtido por maceração de 500 mg de massa fresca de folhas, em N₂ líquido com 50% de polivinilpolipirrolidona

(PVPP) seguido de homogeneização em 1,8 mL de meio de extração (tampão fosfato de potássio 100 mM com pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 20 mM). Após centrifugação a 13.000 g por 20 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade das enzimas e para a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976).

A atividade da CAT foi determinada de acordo com Azevedo *et al.* (1998), com modificações. O extrato enzimático foi adicionado ao meio de reação (tampão fosfato de potássio 100 mM com pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM). A atividade da enzima foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante um período de 90 segundos, a 30°C e calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 39,4 mol⁻¹ L cm⁻¹. Os resultados foram expressos em μmol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da APX foi mensurada segundo Nakano e Asada (1981), verificando a taxa de oxidação do ascorbato (ASA) a 290 nm. O meio de reação incubado a 30°C foi composto de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM, H₂O₂ 0,1 mM e extrato enzimático. O decréscimo na absorbância foi monitorado por um período de 90 segundos e a atividade da enzima foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 2,8 mol⁻¹ L cm⁻¹. Os resultados foram expressos em μmol ASA min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis e Ries, 1997) em meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM, NBT 75 μM e riboflavina 2 μM. Os tubos com o meio de reação e o extrato enzimático foram submetidos a iluminação com lâmpada fluorescente de 15 W por 10 minutos. Para o controle, o meio de reação sem o extrato foi iluminado e, como branco foi utilizado um tubo com meio de reação e o extrato, mas mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm, sendo uma unidade da SOD correspondente à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

A atividade da GR foi determinada utilizando o método descrito por Cakmak *et al.* (1993), monitorando a taxa de oxidação do NADPH pelo decréscimo na absorbância, a 340 nm, durante 1 minuto. O meio de reação foi incubado a 30°C, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), glutatona oxidada 1 mM, NADPH 0,075 mM e extrato enzimático. A atividade da enzima foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 6,2 mol⁻¹ L cm⁻¹ e os resultados foram expressos em μmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Os extratos para a determinação do teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e TBARS foram obtidos em amostras de 500 mg de massa fresca de folhas, maceradas em N₂ líquido e 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 g, durante 20 minutos, a 4°C e os sobrenadantes obtidos transferidos para microtubos de 2 mL.

A quantificação de H₂O₂ foi realizada de acordo com Velikova *et al.* (2000), com algumas alterações. Em tubos de ensaio contendo 0,7 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1 mL de iodeto de potássio 1 M, foram adicionados 0,3 mL do sobrenadante seguido da incubação por

10 minutos a 30°C. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 390 nm e a concentração de H₂O₂ foi expressa em µmol de H₂O₂ g⁻¹ MF.

Os danos celulares avaliados por meio da peroxidação lipídica foram determinados por meio da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e acúmulo de malondialdeído (MDA) (Cakmak e Horst, 1991). Em tubos contendo 0,3 mL do sobrenadante foram adicionados 1,7 mL do meio de reação composto por 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (p/v) de TCA, sendo posteriormente incubado a 90°C, por 20 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo por 10 minutos e após, centrifugada a 13.000 g durante 5 minutos, a 4°C, com o intuito de separar os resíduos formados durante o aquecimento. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm e a quantidade do complexo MDA-TBA foi expressa em nmol MDA g⁻¹ de MF.

As dosagens de ascorbato (Asc) e dehidroascorbato (DHA) foram determinadas conforme descrito por Arakawa *et al.* (1981), com modificações. Foram macerados 500 mg de tecido foliar com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v) e o homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g, por 15 minutos, a 4°C. O ascorbato total (Asc + DHA) foi determinado após a redução do DHA pelo dithiothreitol (DTT). Foram adicionados 100 µL do sobrenadante ao meio de reação: 125 µL de DTT 0,06% (p/v) e 125 µL de fosfato de sódio 0,2 M pH 7,8. Após incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, foram adicionados 125 µL de *N*-ethylmaleimide 0,24% (p/v) e o pH de cada tubo aferido e ajustado entre 1 e 2, pela adição de TCA 20% (p/v). Em seguida, adicionaram-se 125 µL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 4% (v/v), 250 µL de bathophenantrolina 0,5% (p/v) e 125 µL de FeCl₃ 0,03% (p/v), homogeneizando a mistura vigorosamente e incubando, a 30°C, por 90 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 534 nm. O ascorbato foi determinado conforme descrito acima, substituindo-se o DTT por etanol absoluto em igual volume. Os valores DHA foram obtidos pela diferença entre os valores de ascorbato total e ascorbato e os resultados foram expressos em µmol g⁻¹ MF.

A atividade antioxidante foi analisada a partir do método DPPH (Brand-Williams *et al.* 1995) que é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm. Foram preparados os extratos clorofórmico, etanólico, metanólico e de acetato de etila a 100 µg mL⁻¹, utilizando massa seca moída de folhas e flores. Os extratos permaneceram em repouso por 3 horas à temperatura ambiente e posteriormente foram filtrados com papel filtro. Para cada extrato, foi preparado uma solução de DPPH 60 µM, utilizando o solvente extrator específico. As determinações foram realizadas em ambiente escuro adicionando, em tubos de ensaio, 3,9 mL da solução de DPPH e 0,1 mL dos extratos. O decréscimo da absorvância foi acompanhado em espectrofotômetro em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30 e 45 minutos), sendo válido o valor da absorvância no tempo em que a reação se estabilizou. Para avaliação da atividade captadora de radical livre foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH em relação à amostra

controle (extrator + DPPH 60 μ M), pela equação: % inibição do DPPH = $[(A_0 - A_1) / A_0 \times 100]$, na qual: A_0 = absorvância do controle e A_1 = absorvância da amostra (Molyneux, 2004).

Os dados resultantes das coletas foram submetidos à análise de variância (médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro) e de correlação de Pearson (coeficiente de correlação linear simples ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste t). A análise estatística foi realizada com o programa estatístico SAS (Sas System, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes condições de luminosidade não influenciaram significativamente a atividade da enzima catalase em tecidos foliares de *A. millefolium* L. (Figura 1A), mas os períodos de coleta afetaram de forma significativa (Figura 1B), não sendo observada interação entre esses fatores (Anexo - Tabela D).

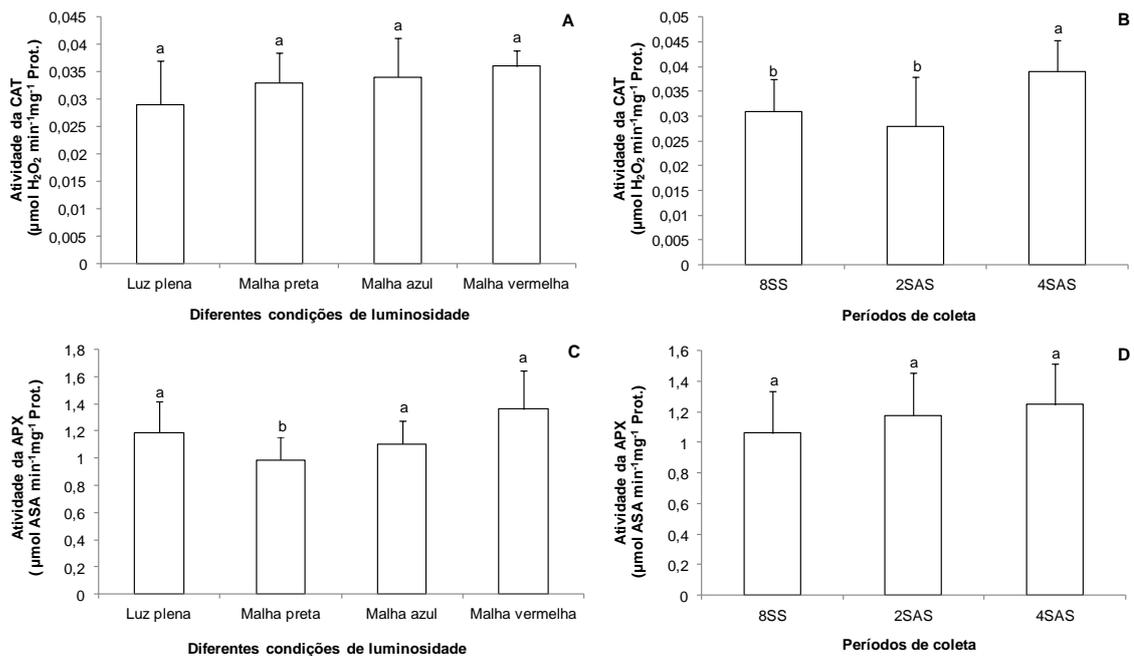


Figura 1. Atividade das enzimas catalase (CAT) (A) (B) e ascorbato peroxidase (APX) (C) (D) em folhas de *Achillea millefolium* L. submetida a diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha preta, azul e vermelha) e períodos de coleta (oito semanas de sombreamento - 8SS, duas e quatro semanas após o sombreamento - 2SAS e 4SAS). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média de quatro repetições.

Resultado similar foi encontrado em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.), na qual foi observado que a atividade da catalase não apresentou diferença significativa entre os espectros de luz vermelho, azul, verde e branco (Causin *et al.*, 2006).

Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que a catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio no peroxissoma da célula vegetal, impedindo o acúmulo dessa substância tóxica e evitando danos celulares (Salvador e Henriques, 2004), na qual essa conversão não é afetada nem estimulada de maneira significativa nos espectros de luz testados. Em contrapartida, Jiang *et al.* (2005) verificaram em *Paspalum vaginatum* S. que a baixa intensidade de luz, causa decréscimo da atividade da catalase.

Segundo Cakmak e Horst (1991), a redução na atividade da catalase indica que, em plantas mantidas em condições de estresse, o peróxido de hidrogênio gerado é mais consumido em processos oxidativos, como na peroxidação lipídica, do que eliminado do metabolismo. Isso porque em células aeróbicas, os radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio reagem formando o radical hidroxila, que por sua vez atuam sobre os ácidos graxos poli-insaturados das membranas, ocasionando a peroxidação dessas moléculas.

A atividade da enzima catalase foi incrementada em plantas com quatro semanas após o sombreamento (Figura 1B). Similarmente, Burritt e Mackenzie (2003) relataram que a transferência das plantas de begônia (*Begonia erythrophylla* J.) da baixa intensidade luminosa para a alta intensidade luminosa, provocou um aumento rápido da atividade da catalase. Esta pesquisa indica que a aclimação fisiológica às condições variáveis de luz, estava intimamente associada com as mudanças nos mecanismos fotoprotetores.

Em plantas de orquídeas (*Phalaenopsis* sp.) a atividade da catalase em tecidos foliares foi incrementada na transferência das plantas de um ambiente de baixa luminosidade para alta (Ali *et al.*, 2005). Pode-se observar com esses resultados que o aumento da catalase, em virtude do processo de aclimação das plantas em ambiente com alta intensidade luminosa, gera um mecanismo de proteção contra a foto-oxidação.

A atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em folhas de *A. millefolium* L. foi influenciada de maneira significativa pela qualidade de luz (Figura 1C), mas não foi afetada significativamente pelos períodos de coleta (Figura 1D), não ocorrendo interação entre esses fatores (Anexo - Tabela D).

Pode-se analisar que os espectros de luz plena, azul e vermelha estimularam fortemente a atividade da ascorbato peroxidase, ao passo que a atenuação da intensidade da luz pela malha preta reduziu a ação dessa enzima (Figura 1C). Padrão de resposta semelhante foi encontrado em *Paspalum vaginatum* S., na qual o espectro de luz proporcionado pelo sombreamento com malha preta reduziu a atividade da ascorbato peroxidase, demonstrando que o estresse por redução da intensidade luminosa fotossinteticamente ativa não induz a atividade da APX (Jiang *et al.*, 2005).

Resultados similares foram verificados ainda em folhas das plantas medicinais noni (*Morinda citrifolia*) (Baque *et al.*, 2010) e eleutero (*Eleutherococcus senticosus*) (Shohael *et al.*, 2006), em relação ao espectro de luz azul, o qual estimulou fortemente a atividade da enzima ascorbato peroxidase.

Em aveia (*Avena sativa* L.) a intensidade de luz proporcionada pela malha preta reduziu a ação da enzima ascorbato peroxidase e as malhas azul e vermelho incrementaram a atividade dessa enzima (Mastropasqua *et al.*, 2012), na qual esse estímulo enzimático pode estar diretamente relacionado ao aumento do teor de ascorbato, em virtude da qualidade de luz.

Kubo *et al.* (1999) afirmaram que o estímulo da atividade da enzima ascorbato peroxidase é responsivo a diferentes estresses abióticos, como por exemplo, estresse por luz, apresentando nesse caso, um papel crucial na eliminação do H₂O₂ das células vegetais.

Em virtude da catalase estar ausente nos cloroplastos, a degradação do H₂O₂ nesta organela é feita pela ascorbato peroxidase, associada às membranas do tilacóide (Foyer e Noctor, 2005). Com isso, a alta atividade da ascorbato peroxidase, nos tecidos foliares, pode ser um indício de estresse oxidativo, afetando também os cloroplastos das plantas.

O processo de aclimação do vegetal ao novo ambiente suprido por luz solar, após passar por um estresse abiótico, envolve um complexo de ordem complementar, alterando estruturas e funções que permitem um ganho na eficiência de carbono (Burritt e Mackenzie 2003). A planta medicinal em estudo adquiriu plena recuperação da capacidade antioxidante nos períodos de aclimação estudados, visto que a APX manteve níveis de atividade equivalentes às plantas não sombreadas nos períodos de reposição à luz plena.

O estudo realizado com *A. millefolium* L. vai de encontro com o trabalho realizado por Gonzalez *et al.* (1998) que cita a capacidade antioxidante dos tecidos foliares dos vegetais pode ser modificada em longo prazo de aclimação à luz solar, conferindo dessa forma uma tolerância ao estresse oxidativo.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em folhas de *A. millefolium* L. foi influenciada pela interação significativa entre os fatores, condições de luminosidade e períodos de coleta (Anexo - Tabela D).

Pode-se verificar que a atividade da superóxido dismutase foi estimulada de forma significativa nas plantas sombreadas com malha preta, vermelha e azul, em relação às plantas mantidas sob luz plena. Este efeito foi mantido e intensificado quando as plantas retornaram às condições naturais de luz, duas semanas após sombreamento, porém após permanecerem quatro semanas nessa condição, a atividade retornou aos níveis do controle, sugerindo a recuperação plena das plantas ao estresse oxidativo imposto pelas mudanças nas variações de luminosidade (Figura 2A).

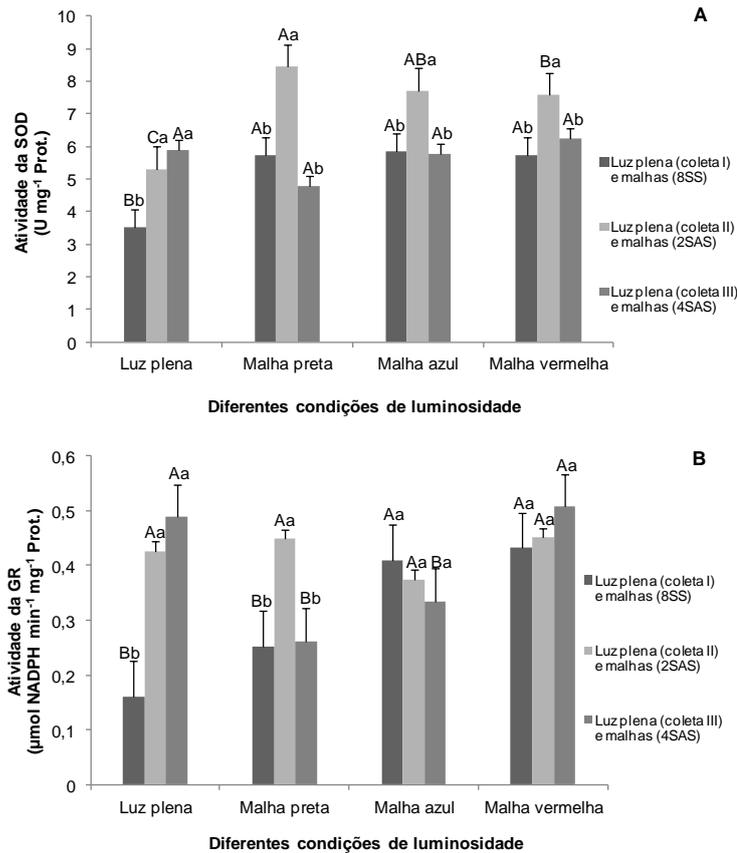


Figura 2. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (A) e glutathiona redutase (GR) (B) em folhas de *Achillea millefolium* L., submetida a diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha preta, azul e vermelha) e períodos de coleta (oito semanas de sombreamento - 8SS, duas e quatro semanas após o sombreamento - 2SAS e 4SAS). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam o mesmo período de coleta dentro das diferentes luminosidades e letras minúsculas comparam os diferentes períodos de coleta dentro de uma mesma condição luminosa, na qual letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média de quatro repetições.

Resultados similares foram verificados nas folhas das plantas medicinais noni (*Morinda citrifolia*) (Baque *et al.*, 2010) e eleutero (*Eleutherococcus senticosus*) (Shohaël *et al.*, 2006), na qual o espectro de luz vermelha estimulou fortemente a atividade da enzima superóxido dismutase.

O estresse por luminosidade resulta na produção de espécies reativas de oxigênio nas plantas, causando um estresse oxidativo (Kubo *et al.*, 1999) e nesse estudo pode-se verificar que as plantas de mil-folhas apresentaram uma capacidade de degradar o excesso de superóxido e de liberar a formação de H_2O_2 , mensurada através da ação da enzima superóxido dismutase, que se mostrou fortemente ativa nessas condições. Esta enzima, com alta atividade durante o tratamento por estresse por luz, pode desempenhar um papel extremamente importante na tolerância ao meio e na defesa contra o estresse abiótico (Kubo *et al.*, 1999).

A atividade da superóxido dismutase foi fortemente acentuada em plantas com duas semanas de readaptação ao ambiente natural, mostrando atividade significativamente maior que plantas mantidas sob luz plena (controle). Um aumento da atividade desta enzima, em plantas submetidas a diferentes espectros de luminosidade, em processo inicial de aclimação ao novo ambiente com alta intensidade de luz, gera um mecanismo de proteção contra a foto-oxidação (Ali *et al.*, 2005). Este efeito foi minimizado em plantas com quatro semanas de readaptação ao ambiente natural, visto que a atividade da SOD se equipaleu às plantas mantidas sob luz plena (controle).

A ação da superóxido dismutase na presença de luz plena (controle) foi incrementada de maneira significativa em plantas com duas e quatro semanas após o sombreamento, o que pode estar relacionado ao ajuste fisiológico da planta às variações climáticas (aumento da precipitação pluviométrica e redução da temperatura). Já nos espectros e intensidade de luz impostos pelas malhas preta, azul e vermelha, a atividade foi mais elevada na segunda semana após retorno das plantas às condições naturais de luminosidade do que durante o período de sombreamento, sugerindo a importância da SOD na adaptação da planta não somente ao estresse provocado pela deficiência de luz, mas também na prevenção dos danos foto-oxidativos.

Similarmente, Burritt e Mackenzie (2003) relataram que a transferência das plantas de begônia (*Begonia erythrophylla* J.) para a alta intensidade luminosa provocou um incremento rápido da ação da superóxido dismutase. Esses dados apontam que a aclimação fisiológica às condições diversas de luz, estava intimamente ligada com as modificações nos mecanismos fotoprotetores.

A enzima superóxido dismutase é considerada a primeira enzima a atuar no sistema antioxidante, realizando a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio. Na espécie medicinal *Bacopa monnieri* L. foi observado um incremento da atividade dessa enzima frente aos tratamentos estressores. Possivelmente devido ao aumento nos níveis de superóxido, promovendo um incremento na expressão do gene para biossíntese da superóxido dismutase (Sinha e Saxena, 2006).

A capacidade de manter a atividade da superóxido dismutase e ascorbato peroxidase em níveis elevados, sob condições de estresse abiótico, é essencial para que haja equilíbrio entre a formação e remoção de H_2O_2 do ambiente intracelular (Matés, 2000). Por outro lado, sob condições estressantes a formação de radicais livres pode exceder a capacidade de sua remoção, culminando assim, em estresse oxidativo (Benavides *et al.*, 2005).

O aumento no conteúdo de H_2O_2 , oriundo da dismutação dos radicais superóxidos pela ação da superóxido dismutase ou por outros processos como a fotorespiração, frente ao estresse abiótico, causa elevação, no tecido foliar dos vegetais, da atividade da ascorbato peroxidase, com o intuito de tentar manter baixo o conteúdo desta espécie reativa de oxigênio (Dey, *et al.*, 2007).

Em *A. millefolium* L. essa coordenação entre a atividade da SOD e APX parecem não seguir esse padrão, possivelmente em função dessa planta estar expressando o potencial máximo de síntese e atividade da APX frente às condições ambientais impostas à planta.

A ação da enzima glutatona redutase (GR) em tecidos foliares de *A. millefolium* L. foi influenciada pela interação significativa entre os fatores, condições de luminosidade e períodos de coleta (Anexo - Tabela D).

A atividade da GR foi estimulada de forma significativa pelas malhas vermelha e azul em plantas sombreadas por oito semanas, tendo efeito menor naquelas cultivadas sob a malha preta. Os resultados sugerem que a mudança na qualidade de luz foi mais importante do que a redução da intensidade sobre a atividade da GR (Figura 2B).

Resultados similares foram verificados nos tecidos foliares da planta medicinal eleutero (*Eleutherococcus senticosus*) (Shohael *et al.*, 2006), na qual as malhas vermelha e azul estimularam fortemente a atividade da enzima glutatona redutase ao passo que o sombreamento com a malha preta provocou decréscimo da atividade.

O incremento da ação da glutatona redutase sob luz vermelha é desencadeado pelo aumento na síntese de espécies reativas de oxigênio, evitando o estresse oxidativo. Essa enzima atuando na célula vegetal gera uma capacidade de suporte para as plantas, pois mantém os níveis de glutatona na forma reduzida (Shohael *et al.*, 2006).

A atividade da glutatona redutase foi fortemente acentuada sob todos os espectros testados, não diferindo estatisticamente, entre plantas com duas semanas de readaptação ao ambiente natural. No entanto, a readaptação das plantas sombreadas com malha preta provocou aumento significativo da atividade da GR. Similarmente, Burritt e Mackenzie (2003) relataram que a transferência das plantas de begônia (*Begonia erythrophylla* J.) para a alta intensidade luminosa, provocou um aumento da atividade da glutatona redutase, mostrando que a aclimação fisiológica às diferentes condições de luminosidade, estava extremamente ligada com as alterações nos mecanismos fotoprotetores.

Pode-se verificar que a atividade da GR foi influenciada pelos espectros de luz testados, pois mesmo após quatro semanas de retorno à condição natural de luz, as plantas provenientes do tratamento com malha vermelha apresentaram elevada atividade da enzima, semelhante às plantas não sombreadas, significativamente maiores do que aquelas provenientes do sombreamento com malhas preta e azul.

A ação da glutatona redutase na presença de luz plena foi incrementada de maneira significativa ao longo do experimento, o que pode estar relacionado ao ajuste fisiológico das plantas às variações climáticas (aumento da precipitação pluviométrica e redução da temperatura). Já em plantas sombreadas com malha preta, a atividade enzimática foi estimulada com o retorno das plantas à luz plena (duas semanas após sombreamento), decrescendo aos níveis iniciais na quarta semana de readaptação e naquelas submetidas às malhas azul e vermelha, a atividade não foi influenciada de forma significativa durante o processo de readaptação das plantas à condição de luminosidade natural.

Os efeitos exibidos em *A. millefolium* L. pela qualidade de luz indicou uma diferença marcante nas atividades das enzimas antioxidantes catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e

glutathiona redutase, na qual essa característica pode ser atribuída pelos diversos mecanismos de proteção aos danos oxidativos, causados pelo estresse desencadeado pelas mudanças na intensidade e qualidade de luz frente aos espectros testados. Dessa forma, essa variação na ação desses sistemas enzimáticos fornece uma evidência de que ocorreu nessa planta uma explosão oxidativa.

A correlação positiva observada entre a atividade das enzimas APX/GR e SOD/GR em *A. millefolium* L. reforça o papel cooperativo dessas enzimas em aliviar o estresse oxidativo desencadeado pelas diferentes condições de luminosidade (Tabela 1).

As diferentes condições de luminosidade e os períodos de coleta influenciaram de maneira significativa o teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas de *A. millefolium* L., não ocorrendo interação entre esses fatores (Anexo - Tabela D).

Pode-se analisar que a redução da intensidade luminosa pelas malhas preta, azul e vermelha estimulou de forma significativa o acúmulo de peróxido de hidrogênio em relação às plantas mantidas sob luz plena, não havendo diferença entre os efeitos dos espectros preto, azul e vermelho sobre essa variável (Figura 3A).

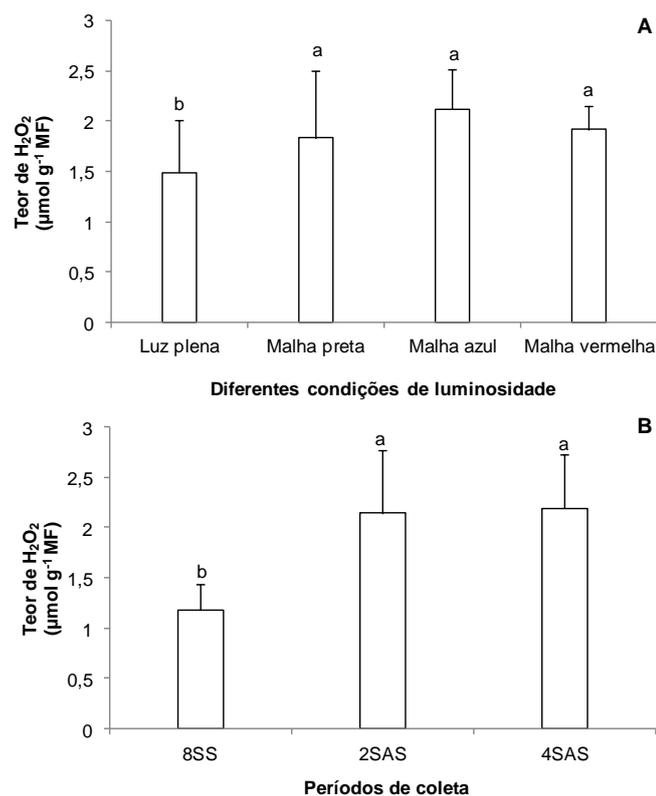


Figura 3. Teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em tecidos foliares de *Achillea millefolium* L., submetida a diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha preta, azul e vermelha) (A) e períodos de coleta (oito semanas de sombreamento - 8SS, duas e quatro semanas após o sombreamento - 2SAS e 4SAS) (B). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média de quatro repetições.

Resultados similares foram verificados nos tecidos foliares da planta medicinal eleutero (*Eleutherococcus senticosus*) (Shohael *et al.*, 2006), na qual o espectro de luz vermelha estimulou o teor de peróxido de hidrogênio.

A produção de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, é um evento precoce nas plantas em resposta ao estresse, atuando como um mensageiro secundário para sinalizar as reações de defesa. A formação desse peróxido é um fenômeno importante na transdução de sinal, induzida pelas condições de estresse, o que altera o conteúdo de agentes redox da célula (Low e Merida, 1996).

O teor de peróxido de hidrogênio foi estimulado em plantas com duas e quatro semanas de readaptação ao ambiente natural (Figura 3B). É provável que tenha ocorrido um grande acréscimo do teor de peróxido de hidrogênio nos tecidos foliares em um período anterior ao analisado, logo depois do retorno das plantas à condição de luz plena como resultado de danos foto-oxidativos, similarmente ao encontrado por Burritt e Mackenzie (2003) em plantas de begônia (*Begonia erythrophylla* J.) após transferência para ambiente com alta intensidade luminosa.

O fato desses efeitos não diferirem entre os tratamentos com luz, indicam uma readaptação das plantas frente ao estresse oxidativo e o incremento do teor de H₂O₂ nesses períodos de avaliação, semelhante às plantas não sombreadas, pode ser resultado da influência do meio, especialmente às variações climáticas (aumento da precipitação pluviométrica e redução da temperatura), associadas ao desenvolvimento da planta. A correlação positiva (+0,45) (Tabela 1) observada entre a atividade da SOD e o teor de H₂O₂ contribui para o aumento desse composto, uma vez que é produto da SOD e a enzima APX (Figura 1D) responsável pela sua degradação, não foi responsiva nesses tratamentos.

A peroxidação de lipídios, representada pelo teor de malondialdeído (MDA), em tecidos foliares de *A. millefolium* L. foi influenciada pela interação significativa entre os fatores, condições de luminosidade e períodos de coleta (Anexo - Tabela D).

O nível de peroxidação lipídica decresceu significativamente nas plantas cultivadas com as malhas azul e vermelho, em relação às plantas mantidas sob luz plena ou sombreadas com malha preta, não diferindo entre si, sugerindo que este efeito esteve relacionado à qualidade da luz recebida pelas plantas durante o cultivo, o que minimizou os efeitos oxidativos (Figura 4).

Resultados similares foram verificados nas folhas da planta medicinal noni (*Morinda citrifolia*) (Baque *et al.*, 2010), na qual o espectro de luz azul reduziu o nível de peroxidação lipídica. Já em plantas de orquídeas (*Phalaenopsis* sp.), o nível de peroxidação de lipídios em tecidos foliares foi incrementado na presença de alta intensidade de luz (Ali *et al.*, 2005).

A peroxidação lipídica não foi influenciada pelos espectros de luz, em plantas com duas e quatro semanas de readaptação à luz solar, na qual os acréscimos significativos para cada tratamento, ao longo dessas avaliações, pode ser resposta ao desenvolvimento da planta e as variações climáticas (aumento da precipitação pluviométrica e redução da temperatura). No entanto, o incremento do

conteúdo de malondialdeído em relação ao primeiro período de avaliação, foi maior nas plantas sombreadas, sugerindo um maior impacto oxidativo em relação às plantas sob luz plena (controle), o que pode estar associado ao aumento da intensidade luminosa na segunda e quarta semana após sombreamento. O pequeno aumento da catalase em relação ao aumento do teor de malondialdeído, frente ao período de aclimação, mostra a contribuição dessa enzima em aliviar o estresse oxidativo, justificando pela baixa correlação positiva (+0,34) (Tabela 1), frente aos tratamentos.

O malondialdeído, produto de decomposição de hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, é um biomarcador para medir o grau de estresse oxidativo, na qual o nível de peroxidação lipídica é uma consequência do aumento do teor de peróxido de hidrogênio (Scandalios, 2002). Complementando essa informação, foi observada uma correlação positiva entre o teor de peróxido de hidrogênio e de malondialdeído em plantas de *A. millefolium* L. sugerindo que a peroxidação lipídica observada deve-se em grande parte ao teor de peróxido de hidrogênio acumulado nos tecidos vegetais (Tabela 1).

No entanto, o peróxido de hidrogênio tem uma grande importância nos sistemas biológicos pela facilidade de difusão através da camada bilipídica da membrana celular (Scandalios, 2002). A reação desse radical com os lipídios é capaz de desencadear uma cascata de reações, culminando na peroxidação de lipídios. Alterações na estrutura e nas funções das membranas, resultante da peroxidação de lipídios, são também caracterizados sob diversos estresses e podem resultar em danos ao funcionamento celular (Mittler *et al.*, 2004).

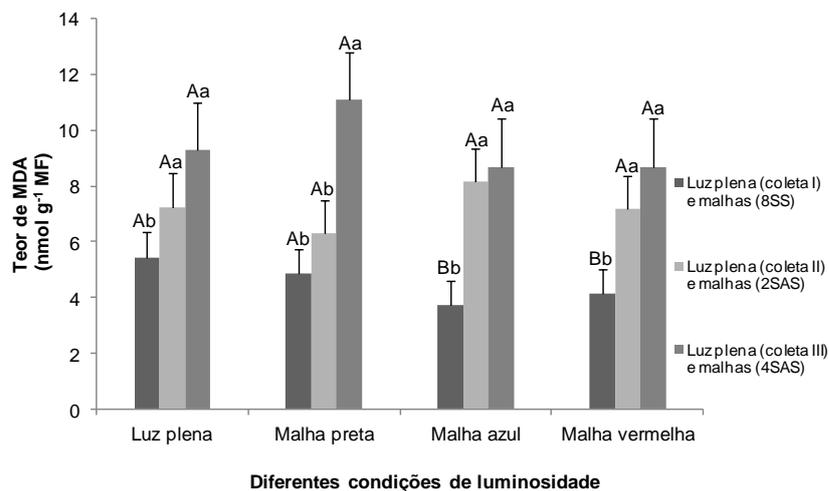


Figura 4. Peroxidação lipídica (MDA) em folhas de *Achillea millefolium* L., submetida a diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha preta, azul e vermelha) e períodos de coleta (oito semanas de sombreamento - 8SS, duas e quatro semanas após o sombreamento - 2SAS e 4SAS). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam o mesmo período de coleta dentro das diferentes luminosidades e letras minúsculas comparam os diferentes períodos de coleta dentro de uma mesma condição luminosa, na qual letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média de quatro repetições.

A concentração de ascorbato em folhas de *A. millefolium* L. foi influenciada pelas diferentes condições de luminosidade e períodos de coleta, com interação significativa entre esses fatores (Anexo - Tabela D).

A redução da intensidade luminosa pelas malhas preta e azul causaram redução significativa no acúmulo de ascorbato, ao passo que o sombreamento com malha vermelha não provocou alteração nesse metabólito em relação às plantas cultivadas sob luz plena. O mesmo efeito desses tratamentos foi observado nas plantas com duas semanas de readaptação ao ambiente natural (Figura 5). A redução do teor de ascorbato na presença de baixa intensidade luminosa pode ser devido à limitação de substrato e/ou do nível baixo da atividade da enzima responsável pela síntese de ascorbato (Mastropasqua *et al.*, 2012).

Similarmente, em plantas de aveia (*Avena sativa* L.), o espectro de luz azul reduziu o acúmulo de ascorbato, enquanto o espectro de luz vermelha promoveu um aumento no acúmulo deste composto, evidenciando que os receptores de luz vermelha e a excitação do fitocromo podem estar envolvidos no controle da produção de ascorbato (Mastropasqua *et al.*, 2012). Também em plantas de mostarda branca (*Sinapis Alba* L.), a luz vermelha incrementou o nível de ascorbato (Bienger e Schopfer, 1970).

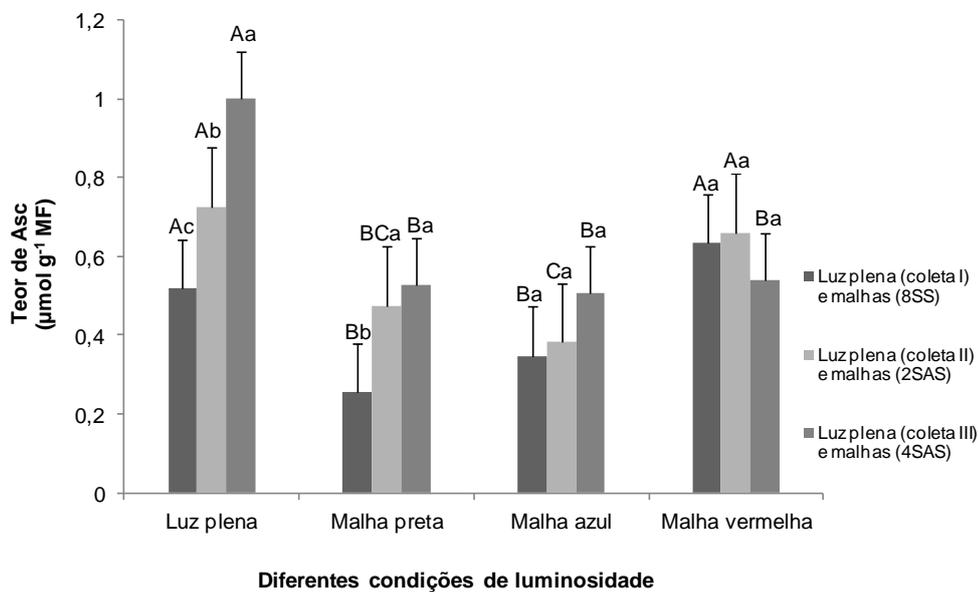


Figura 5. Concentração de ascorbato (Asc) em folhas de *Achillea millefolium* L., submetida a diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha preta, azul e vermelha) e períodos de coleta (oito semanas de sombreamento - 8SS, duas e quatro semanas após o sombreamento - 2 SAS e 4SAS). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam o mesmo período de coleta dentro das diferentes luminosidades e letras minúsculas comparam os diferentes períodos de coleta dentro de uma mesma condição luminosa, na qual letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média de quatro repetições.

Em plantas sombreadas com malha preta, houve aumento significativo do teor de ascorbato com a readaptação à luz natural, porém com menor intensidade em relação às plantas mantidas permanentemente sob luz plena. Em plantas submetidas às malhas azul e vermelha, a concentração de ascorbato não sofreu alteração significativa com o retorno das plantas à luz plena (Figura 5).

Esses resultados sugerem que a síntese de ascorbato por vias de percepção da qualidade de luz, constitui uma rede interativa que desencadeia um processo de transdução de sinal que controla essa produção (Mastropasqua *et al.*, 2012).

O mecanismo de síntese de ascorbato pode ser fotoinduzido mediante as diferentes intensidades de luz. O aumento da concentração de ascorbato nos vegetais na presença de luz pode ser devido a maior redução das taxas de produtos de oxidação, denominados de monodeidroascorbato e deidroascorbato (Smirnoff, 1996).

Os incrementos da enzima ascorbato peroxidase e do conteúdo de ascorbato podem ajudar sinergicamente na prevenção ao dano oxidativo celular, devido ao aumento da síntese de espécies reativas de oxigênio durante a presença de luz, tal como o peróxido de hidrogênio, que é continuamente gerado por diversas fontes do metabolismo vegetal (Mastropasqua *et al.*, 2012).

O ascorbato, componente do ciclo ascorbato glutationa, é considerado um dos principais antioxidantes solúveis e tem a função de eliminar o peróxido de hidrogênio em reação catalisada pela enzima ascorbato peroxidase, atividade correlacionada com o cálcio citosólico. Nesse ciclo, o ascorbato é oxidado pela ascorbato peroxidase em monodeidroascorbato que é espontaneamente transformado em ascorbato e deidroascorbato (Smirnoff, 1996). A correlação positiva observada entre o teor de ascorbato e a atividade da enzima APX pode explicar as variações desse metabólito entre os tratamentos (Tabela 1).

As condições de luminosidade e o período de retorno das plantas à condição de luz plena influenciaram de maneira significativa o teor de deidroascorbato em folhas de *A. millefolium* L., não sendo observada interação entre esses fatores (Anexo - Tabela D).

A redução da intensidade de luz pela malha preta não influenciou a concentração de deidroascorbato após oito semanas de sombreamento, apresentando menor efeito na presença das malhas azul e vermelho (Figura 6A).

Mastropasqua *et al.* (2012) estudando *Avena sativa* L. sob os espectros de luz azul, vermelha e branca observaram que não há influência significativa no acúmulo de deidroascorbato, resultado diferente ao encontrado com *A. millefolium* L., sugerindo que cada espécie vegetal responde de forma diferente ao estresse por luz.

O acúmulo de deidroascorbato foi estimulado em plantas com quatro semanas de readaptação ao ambiente natural (Figura 6B), na qual os danos foto-oxidativos causados pela re-exposição das plantas à luz plena, devem ter estimulado o consumo de ascorbato, visto que o teor de seu produto de

oxidação, deidroascorbato apresentou elevada correlação positiva (+0,69) com o teor de malondialdeído (Tabela 1).

O ascorbato, além de ser um antioxidante não enzimático, atua como cosubstrato da ascorbato peroxidase e, portanto, seu conteúdo intercelular pode ser alterado em função da atividade dessa enzima, gerando deidroascorbato (Asada, 1999) ou via redução direta de radicais livres gerados durante o período de estresse.

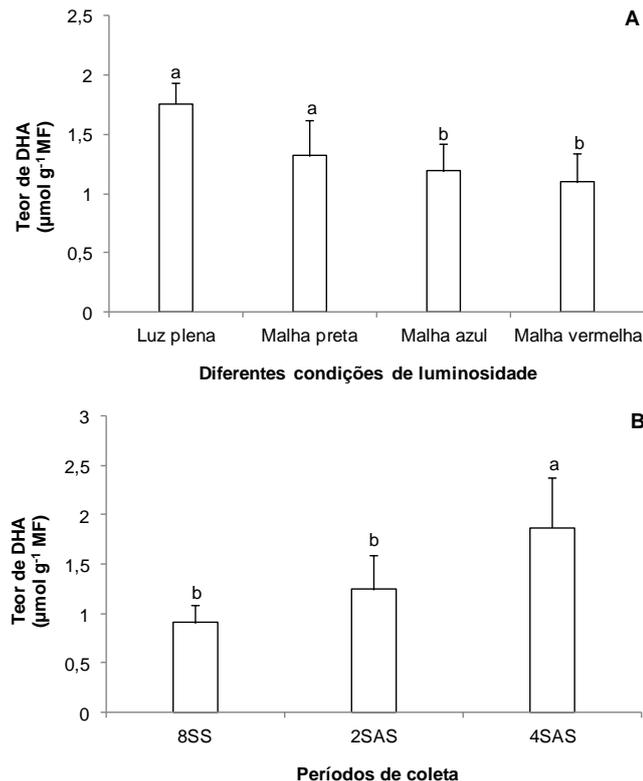


Figura 6. Concentração de deidroascorbato (DHA) em tecidos foliares de *Achillea millefolium* L., submetida a diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha preta, azul e vermelha) (A) e períodos de coleta (oito semanas de sombreamento - 8SS, duas e quatro semanas após o sombreamento - 2SAS e 4SAS) (B). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média de quatro repetições.

A atividade antioxidante, verificada através da capacidade dos extratos de folhas e flores de *A. millefolium* L. em sequestrar o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), em porcentagem de inibição, foi influenciada pela interação significativa entre os fatores condições de luminosidade e diferentes solventes extratores (Anexo - Tabela F).

A atividade inibitória do radical DPPH pelos extratos de acetato de etila e clorofórmico obtidos a partir de folhas não foi influenciada significativamente pelos espectros de luz testados. Em relação ao extrato etanólico, a atividade inibitória foi altamente estimulada pela malha vermelha, não havendo diferença entre as demais condições de luminosidade. Já a atividade inibitória do extrato

metanólico reduziu significativamente nas folhas de plantas submetidas aos tratamentos com malhas preta, azul e vermelha, não diferindo entre si em relação a luz plena (Figura 7A).

Na presença de luz plena, os extratos de folhas com maior atividade inibitória foram o etanólico e metanólico. Em plantas cultivadas com malha preta, as maiores atividades foram obtidas com estes extratos, não diferindo da atividade encontrada para o extrato clorofórmico. Já os espectros de luz azul e vermelha incrementaram no aumento significativo da atividade antioxidante do extrato etanólico (Figura 7A).

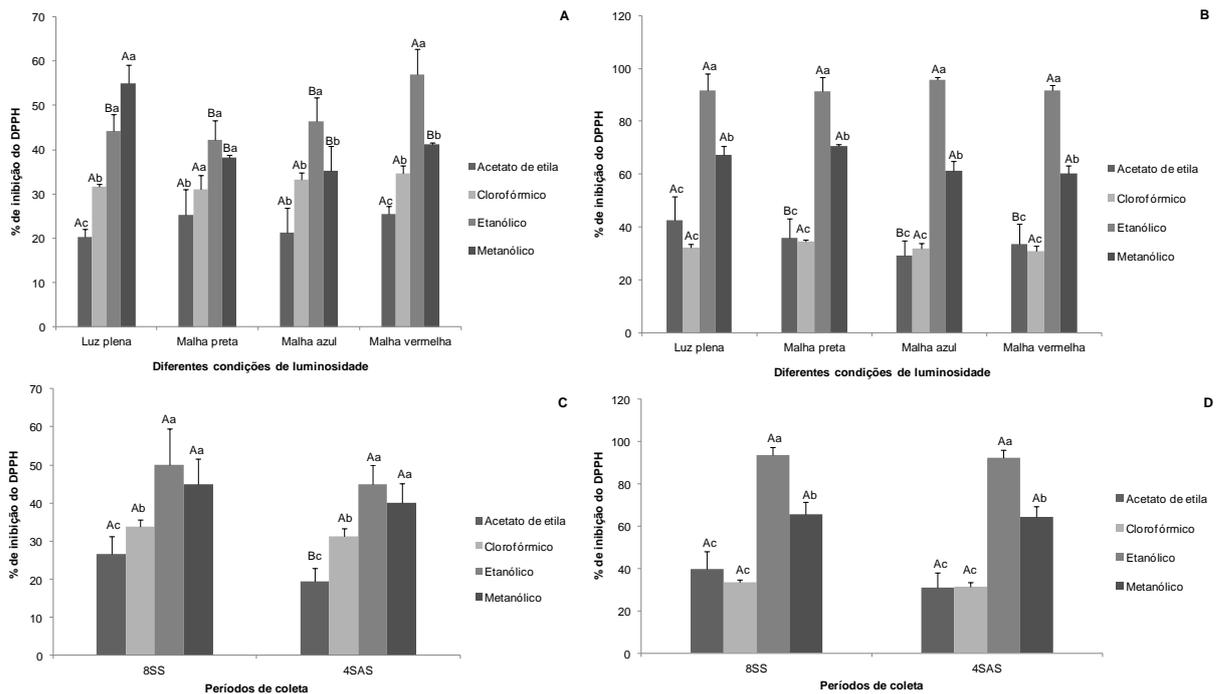


Figura 7. Porcentagem de inibição do radical DPPH pelos extratos de acetato de etila, clorofórmico, etanólico e metanólico de tecidos foliares (A e C) e de flores (B e D) de *Achillea millefolium* L., submetida a diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha preta, azul e vermelha) e períodos de coleta (oito semanas de sombreamento - 8SS e quatro semanas após sombreamento - 4SAS). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam tratamentos (condições de luminosidade ou períodos de coleta) para cada extrato e letras minúsculas comparam os extratos dentro de um mesmo tratamento, na qual letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média de quatro repetições.

Similarmente, pode-se verificar que o extrato etanólico de folhas secas da planta medicinal *Couepia grandiflora* Benth., conhecida como fruta-de-ema, mostrou-se ativo frente ao radical DPPH (Zuque *et al.*, 2004).

A alta atividade antioxidante dos extratos etanólico, estimulada pela malha vermelha, e metanólico, incrementada na presença de luz plena, pode ser devido a esses solventes apresentarem

grande afinidade pelos compostos fenólicos, como por exemplo, os fenóis e flavonoides, que fazem parte do sistema antioxidante não enzimático (Yilmaz e Toledo, 2006).

Em estudos utilizando diferentes solventes para extração de compostos com atividade antioxidante evidencia-se que o tipo de solvente afeta a composição fenólica e, conseqüentemente, a atividade antioxidante (Yilmaz e Toledo, 2006), mas é provável que a atividade antioxidante dos extratos seja resultado do sinergismo entre os compostos identificados, bem como com outros componentes que possam ser extraídos, como o ascorbato e carotenoides (Vasco *et al.*, 2008).

A atividade inibitória dos extratos de acetato de etila decresceu significativamente quando provenientes de flores de plantas sombreadas. Já a atividade antioxidante dos extratos clorofórmico, etanólico e metanólico não foi influenciada pelos espectros de luz testados (Figura 7B).

Os extratos de flores com maior atividade inibitória foram o etanólico seguido do metanólico, semelhante ao observado com os extratos de folhas da planta em estudo, porém independentemente da condição de luminosidade (Figura 7B).

Similarmente, pode-se verificar que o extrato etanólico de flores secas da planta medicinal *Calceolaria chelidonioides* Humb., conhecida como calceolária, mostrou-se ativo frente ao radical DPPH (Falcão *et al.*, 2006).

A porcentagem de inibição do radical DPPH em folhas e flores de *A. millefolium* L. foi influenciada pela interação significativa entre os fatores períodos de coleta e diferentes solventes extratores (Anexo - Tabela F).

A atividade inibitória dos extratos de folhas obtidos com diferentes solventes diferiu nas plantas com quatro semanas de readaptação às condições de luz plena, sugerindo que a mudança de condição influenciou na composição ou teor de compostos antioxidantes de natureza fenólica no período avaliado, não podendo ser excluída a possibilidade de um aumento transitório em período anterior, em resposta à possível proteção contra danos foto-oxidativos desses compostos (Figura 7C).

A atividade inibitória foi incrementada pelos extratos etanólico e metanólico obtidos de flores, não diferindo entre si em plantas sombreadas por oito semanas e em plantas com quatro semanas de readaptação ao ambiente natural. A atividade antioxidante do extrato de acetato de etila foi o menos eficiente nos extratos obtidos das plantas nas duas condições de tratamento, apresentando atividade significativamente inferior aos demais extratores (Figura 7D).

A atividade inibitória dos extratos de acetato de etila, clorofórmico, etanólico e metanólico obtidos de flores não foi estimulada pela mudança da intensidade luminosa durante o retorno das plantas à condição de luz plena, apresentando resultados semelhantes aos obtidos com os extratos provenientes de folhas, com exceção do extrato de acetato de etila. Em ambos períodos de coleta, durante e após o sombreamento, a atividade inibitória mais elevada foi obtida no extrato etanólico (Figura 7D).

No que se refere à atividade antioxidante, mensurada através da capacidade dos extratos foliares e de flores em sequestrar o radical DPPH, expressa em porcentagem de inibição, evidenciou-se que a qualidade de luz causa estresse oxidativo em *A. millefolium* L. (Figuras 7A e 7B).

Observando as médias de todas as variáveis, pode-se verificar que a atividade inibitória dos extratos acetato de etila, etanólico e metanólico foi maior em flores do que folhas de *A. millefolium* L., evidenciando que a atividade antioxidante é mais significativa em extratos de estruturas reprodutoras. Esses resultados apontam que os extratos de flores devem apresentar maior conteúdo de compostos fenólicos, que fazem parte do sistema antioxidante.

A correlação negativa entre a atividade de redução do DPPH do extrato de acetato de etila de folhas e teor de ascorbato (-0,43) ou de seu produto de oxidação, o deidroascorbato (-0,67) sugerem que o mecanismo antioxidante promovido pelo grupo de moléculas extraídas com esse solvente se relaciona com o teor de ácido ascórbico, mas atuam de forma independente, embora, em nível fisiológico possivelmente atuem sinergeticamente contra os danos oxidativos. O mesmo pode ser observado pela atividade de redução do DPPH do extrato clorofórmico ou etanólico e teor de deidroascorbato, que apresentaram correlações negativas de (-0,64) e de (-0,51), respectivamente (Tabela 1).

A correlação positiva, observada entre a atividade inibitória dos extratos foliares obtido com os solventes acetato de etila e clorofórmio (+0,68) e etanol e clorofórmio (+0,65), sugere que, embora a maior atividade antioxidante tenha sido detectada no extrato etanólico, é possível que pelo menos parte das moléculas com ação antioxidante sejam extraídas com solventes de polaridades distintas. O mesmo resultado pode ser atribuído ao obtido com flores, considerando a correlação positiva obtida entre a atividade inibitória dos extratos acetato de etila e clorofórmico (+0,51) e metanólico e clorofórmico, nesse caso um pouco mais elevada (+0,69), sugerindo que as moléculas com maior ação antioxidante sejam melhores extraídas em solventes com polaridade mais elevada (Tabela 1).

Tabela 1. Coeficiente de correlação de Pearson entre enzimas antioxidantes, atividade antioxidante, teores de peróxido de hidrogênio, malondialdeído, ascorbato e deidroascorbato

Correlação	Coeficiente de correlação linear simples (r)*
Ascorbato peroxidase/Glutationa redutase	+ 0,43
Superóxido dismutase/Glutationa redutase	+ 0,58
Peróxido de hidrogênio/Malondialdeído	+ 0,54
Ascorbato peroxidase/Ascorbato	+ 0,35
Catalase/Malondialdeído	+ 0,34
Superóxido dismutase/Peróxido de hidrogênio	+ 0,45
Malondialdeído/Deidroascorbato	+ 0,69
Extrato acetato de etila/Extrato clorofórmico (folhas)	+ 0,68
Extrato etanólico/Extrato clorofórmico (folhas)	+ 0,65
Extrato acetato de etila/Extrato clorofórmico (flores)	+ 0,51
Extrato metanólico/Extrato clorofórmico (flores)	+ 0,69
Ascorbato/Extrato acetato de etila (folhas)	- 0,43
Deidroascorbato/Extrato acetato de etila (folhas)	- 0,67
Deidroascorbato/Extrato clorofórmico (folhas)	- 0,65
Deidroascorbato/Extrato etanólico (folhas)	- 0,51

(*) Significativos ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

CONCLUSÕES

A qualidade de luz e os diferentes períodos de coleta influenciam o sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático em *A. millefolium* L.

O estresse por redução de luminosidade não induz a atividade da ascorbato peroxidase, mas a atividade da superóxido dismutase é estimulada pela baixa intensidade de luz, podendo desempenhar um papel importante na prevenção aos danos oxidativos.

A mudança na qualidade de luz é mais eficiente do que a redução da intensidade luminosa sobre a atividade da glutathione redutase.

A baixa intensidade de luz estimula o teor de peróxido de hidrogênio e o nível de peroxidação lipídica é reduzido na presença dos espectros de luz azul e vermelha, minimizando os efeitos oxidativos nas células.

A baixa intensidade luminosa, gerada pelas malhas preta e azul, diminui o acúmulo de ascorbato, podendo ser fotoinduzido por diferentes condições de luminosidade e o conteúdo de deidroascorbato é incrementado em processo de aclimação ao novo ambiente com luz solar.

A atividade de redução do DPPH é influenciada pelo solvente extrator, condições de luminosidade e períodos de coleta.

A atividade antioxidante é mais acentuada quando se utiliza extratos de flores, possivelmente devido a um maior conteúdo de compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS

- Ali MB, Hahn EJ, Paek KY. 2005. Effects of light intensities on antioxidant enzymes and malondialdehyde content during short-term acclimatization on micropropagated *Phalaenopsis* plantlet. **Environmental and Experimental Botany** 54:109-120.
- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology** 55:373-99.
- Arakawa N, Tsutsumi K, Sanceda NG, Kurata T, Inagaki C. 1981. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7 diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agricultural and Biological Chemistry** 45:1289-1290.
- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 50:601-639.
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ. 1998. Response from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in leaves and roots of wild type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum** 104:280-292.
- Baque MA, Hahn EJ, Paek KY. 2010. Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morinda citrifolia* as affected by auxin and light quality. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant** 46:71-80.
- Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML. 2005. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal Plant Physiology** 17:21-34.
- Bienger I, Schopfer P. 1970. Photomodulation by phytochrome of the rate of accumulation of ascorbic acid in mustard seedlings (*Sinapis alba* L.). **Planta** 93:152-159.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany** 91:179-194.
- BRADFORD MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72:48-254.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology** 28:25-30.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2001. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 3 ed. Maryland, USA: American Society of Plants Physiologists.

- Burritt DJ, Mackenzie S. 2003. Antioxidant metabolism during acclimation of *Begonia x erythrophylla* to high light levels. **Annals of Botany** 91:783-794.
- Cakmak I, Horst WJ. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum** 83(3):463-468.
- Cakmak I, Strbac D, Marschner H. 1993. Activities of hydrogen peroxide scavenging enzymes in germination wheat seeds. **Journal of Experimental Botany** 44 (26):127-132.
- Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A, Akpulat HA. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* afa. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology** 87(2):215-220.
- Causin HF, Jauregui RN, Barneix AJ. 2006. The effect of light spectral quality on leaf senescence and oxidative stress in wheat. **Plant Science** 171:24-33.
- Dat JF, Capelli N, Folzer H, Bourgeade P, Badot PM. 2004. Sensing and signaling during plant flooding. **Plant Physiology and Biochemistry** 42:273-282.
- Davey MW, Montagu MV, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D, Fletcher J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 80(7):825-860.
- Dey SK, Dey J, Patra S, Pothal D. 2007. Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. **Brazilian Journal Plant Physiology** 19:53-60.
- Falcão DQ, Costa ER, Alviano DS, Alviano CS, Kuster RM, Menezes FS. 2006. Antioxidant and antimicrobial activity from *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 16(1):73-76.
- Foyer CH, Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell** 17:1866-1875.
- Gechev TS, Breusegem FV. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays** 28:1091-1101.
- Giannopolitis CN, Ries SK. 1997. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiology** 59:309-314.
- Gonzalez A, Steffen KL, Lynch JP. 1998. Light and excess manganese: Implications for oxidative stress in common bean. **Plant Physiology** 118:493-504.
- Grime JP, Mackey JML. 2002. The role of plasticity in resource capture by plants. **Evolutionary Ecology** 16:299-307.
- Jiang Y, Carrow RN, Duncan RR. 2005. Physiological acclimation of seashore paspalum and bermudagrass to low light. **Scientia Horticulturae** 105:101-115.

- Kubo A, Aono M, Nakajima N, Saji H, Tanaka K, Kondo N. 1999. Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Research** 112:279-290.
- Larcher W. 2004. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos.
- Lee DW, Oberbauer SF, Johnson P, Krishnapilay B, Mansor M, Mohamad H, Yap SK. 2000. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **Journal of Botany** 87(4):447-455.
- Lopes FCM, Placeres MP, Moreira RRD, Santos LE. 2003. Avaliação da atividade imunológica de *Achillea millefolium* L. (mil-folhas). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 13(2):11-13.
- Lorenzi H, Matos FJA. 2008. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum.
- Low PS, Merida JR. 1996. The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. **Physiology Plant** 96:533-542.
- Mastropasqua L, Borraccino G, Bianco L, Paciolla C. 2012. Light qualities and dose influence ascorbate pool size in detached oat leaves. **Plant Science** 183:57-64.
- Matés JM. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology** 153:83-104.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** 7(9):405-410.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science** 9:490-498.
- Moller IM, Jensen PE, Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual review of plant biology** 58:459-481.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology** 26:211-219.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology** 22(5):867-880.
- Oren-Shamir M, Gussakovsky EE, Shpiegel E, Nissim-Levi A, Ratner K, Ovadia R, Giller YE, Shahak Y. 2001. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology** 76(3):353-361.
- Rosa MB, Oliveira TG, Carvalho CA, Carvalho LM, Peres RL. 2008. Estudo espectrofotométrico da atividade fotoprotetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea* var. capitata, *Cyperus rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale* (JACQ.) cass e *Sonchus oleraceus*. **Revista Eletrônica de Farmácia** 5(1):101-110.
- Salvador M, Henriques JAP. 2004. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: ULBRA.

- Sas Learning Edition. 2002. **Program SAS: Getting started with the SAS learning edition**. Cary, North Carolina.
- Scandalios JG. 2002. The rise of ROS. **Trends in Biochemical Science** 27(9):483-486.
- Scandalios JG. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian journal of medical and biological research** 38:995-1014.
- Shahak Y, Gussakovsky EE, Gal E, Ganelevin R. 2004. Colornets: Crop protection and light-quality manipulation in one technology. **Acta Horticulturae** 659:143-151.
- Shohael AM, Ali MB, Yu KW, Hahn EJ, Islam R, Paek KY. 2006. Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. **Process Biochemistry** 41:1179-1185.
- Sinha S, Saxena R. 2006. Effect of iron on lipid peroxidation, enzymatic and nonenzymatic antioxidants and bacoside content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere** 62:1340-1350.
- Smirnoff N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. **Annals of Botany** 78:661-669.
- Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2004. **Manual de adubação e de calagem para os estados do RS e de SC**. Porto Alegre.
- Taiz L, Zeiger E. 2013. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Vasco C, Ruales J, Kamal-Eldin A. 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry** 111:816-823.
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain treated bean plants. **Plant Science** 151:59-66.
- Zuque ALF, Watanabe ES, Ferreira AMT, Arruda ALA, Resende UM, Bueno NR, Castilho RO. 2004. Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de *Couepia grandiflora* Benth. (Chrysobalanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 14(2):129-136.
- Yilmaz Y, Toledo RT. 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry by products and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis** 19:41-48.

**SÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM *Achillea millefolium* L. SOB
INFLUÊNCIA DA QUALIDADE LUMINOSA**

SYNTHESIS OF SECONDARY METABOLITES IN *Achillea millefolium* L. UNDER INFLUENCE OF LIGHT QUALITY. *A. millefolium* L. is considered important medicinal plant with antibacterial, anti-inflammatory, antitumoral, antifungal and antioxidants properties. The objective of this work was to analyse the influence of light quality secondary metabolites synthesis in *A. millefolium* L. Plants were cultivated under light conditions (full light and blue, red and black shade net) and collection periods (eight weeks of shading, two and four weeks after shading). Synthesis of total phenols increased under full light and changes light conditions influenced the production of total flavonoids. Light quality affected the essential oil yield and it was higher in flowers than in leaves. Active compounds of essential oil were influenced by light quality. Farnesol was the major compound of the oil extracted from leaves and in flowers were farnesol and chamazulene. Therefore collection periods, varying light quality and intensity, influence production of total flavonoid and phenols, oil yield, composition and level essential oil terpenoids of *A. millefolium* L.

Key words: yarrow, light, essential oil.

INTRODUÇÃO

A elucidação dos metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e farmacologia. As plantas medicinais contêm inúmeros constituintes químicos ativos extraídos do óleo essencial e de seus extratos, na qual quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos, devido à presença de compostos de classes ou estruturas diversas contribuindo para a mesma atividade.²⁴

A espécie medicinal *A. millefolium* L. (mil-folhas), pertencente à família Asteraceae, é uma planta herbácea, perene, rizomatosa, de 30-50 cm de altura, possuindo folhas compostas e flores dimorfas, reunidas em capítulos densamente corimbosos. É de clima temperado quente a subtropical, tolerando condições climáticas extremas como o sol, geada, seca, frio e não se adapta a regiões com excesso de precipitações. A multiplicação se dá por estacas de rizomas e por divisão da touceira, o que garante um desenvolvimento homogêneo. ^{6,22}

Esta planta é nativa da Europa, América do Norte, Sul da Austrália e Ásia e suas propriedades medicinais são atribuídas às atividades antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antitumoral, dentre outras estudadas a partir de óleo essencial e de seus extratos obtidos de flores, folhas e raízes. ^{6,21,34}

O óleo essencial desta planta é composto pelos monoterpenos (30-80%), sesquiterpenos (8-62%) e em menor quantidade por outras substâncias (1-3%), como álcoois, ésteres, aldeídos e carotenoides. Os principais constituintes do óleo essencial são sabineno, β -pineno, cânfora, borneol, 1,8-cineol, α -terpineol, óxido de bisabolol, camazuleno, farnesol, cariofileno, linalool e eugenol. ^{6,14}

A cor azul deste óleo essencial é devido à presença do azuleno e compostos relacionados, como o camazuleno, e muitos estudos focam sobre os azulenos e proazulenos (lactonas sesquiterpênicas). A maior quantidade de proazuleno encontra-se nas inflorescências no início da floração e as folhas produzem uma grande quantidade desse composto no mesmo estágio, sendo menor do que nas flores. ²⁷

Tendo em vista a importância medicinal da planta *A. millefolium* L., investigações a respeito do comportamento fisiológico desta espécie e suas respostas às condições do ambiente tornam-se necessárias ao aperfeiçoamento dos métodos de cultivo. ²⁸

Dentre os fatores abióticos, a luz é um recurso fundamental para o desenvolvimento vegetal, pois muitas respostas morfofisiológicas não dependem apenas da presença, atenuação ou ausência da luz, mas da variação de sua qualidade espectral. ⁴³

As malhas redutoras da radiação ou malhas coloridas combinam a proteção física, juntamente com a filtragem diferencial da radiação solar, promovendo respostas fisiológicas reguladas pela luz. ³⁷

Pode-se estabelecer diferentes condições de cultivo para as plantas pela manipulação da intensidade e qualidade espectral através da utilização de malhas.³⁰

Plantas que experimentam mudanças nas condições de luz são capazes de em maior ou menor grau aclimatar-se à nova condição. Esta aclimatação ocorre no sentido de maximizar o ganho total de carbono que pode ocorrer através de mudanças nas propriedades de assimilação pelas folhas, por meio de ajustes fisiológicos e alterações nas características foliares relacionadas à fotossíntese ou ainda a mudanças no padrão de alocação de biomassa em favor da parte vegetativa mais afetada pela mudança de luz.¹⁹

Essa adaptação é o reflexo do desenvolvimento de mudanças em características funcionais e estruturais dos vegetais, associada aos fatores abióticos a que estão expostos, resultando na plasticidade fenotípica. Assim, pode-se definir a plasticidade fenotípica como sendo a habilidade que um genótipo tem de expressar diferentes fenótipos em resposta a distintos ambientes.¹¹

Diversos fatores influenciam no teor e composição do óleo essencial das plantas medicinais, como intensidade luminosa, fotoperíodo, temperatura, sazonalidade, ritmo circadiano, disponibilidade hídrica, nutrição do solo, estágio de desenvolvimento e partes do vegetal.^{9,20,33}

A intensidade de radiação solar afeta a produção de compostos secundários dos tipos fenólicos, como os flavonoides e fenois, pois protegem contra a fotodestruição ao absorver e/ou dissipar a energia solar, dificultando assim a danificação dos tecidos vegetais.⁴⁵ Além disso, a intensidade de luz é um fator que influencia a concentração e composição de outras classes de metabólitos secundários, como os terpenoides e alcaloides.¹⁰

A extração de metabólitos secundários em plantas medicinais deve ser realizada em estruturas vegetais com um alto controle de qualidade na pós-colheita e o processo de secagem é crucial para preservar adequadamente os princípios ativos, objetivando levar as plantas a baixos teores de umidade. Desse modo, esse processo permite a conservação do material vegetal, mantendo sua integridade física e química. No caso de plantas produtoras de óleo, a secagem deve ser criteriosa em razão da volatilidade dos óleos essenciais.⁴⁰

Dessa forma, o conhecimento da qualidade e quantidade de metabólitos secundários é uma ferramenta extremamente importante para o melhor entendimento de respostas fisiológicas de plantas medicinais às variações espectrais e intensidade luminosa.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta da espécie *A. millefolium* L. quanto à síntese de metabólitos secundários frente ao cultivo sob diferentes condições de luminosidade e períodos de coleta.

PARTE EXPERIMENTAL

A espécie foi identificada taxonomicamente e as exsicatas foram catalogadas no herbário PEL, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas sob o número 24.600.

O cultivo de *A. millefolium* L. (mil-folhas) e a condução dos experimentos foram realizados nas áreas experimentais do Campus Pelotas - Visconde da Graça (CAVG) do Instituto Federal Sul-riograndense, Pelotas, RS.

As mudas, obtidas por divisão de touceiras, foram cultivadas em estufa e, então, transferidas para a área experimental. A propagação foi realizada a partir de uma planta matriz, o que possibilita identificar melhor os efeitos das alterações do ambiente promovidas pelos tratamentos. A base da área experimental foi preparada utilizando plástico preto para cobertura de solo, com a finalidade de reduzir o número de plantas invasoras. As mudas obtidas, quando atingiram quatro meses de idade, foram transferidas para o campo experimental e irrigadas através de um sistema de gotejamento.

O solo onde o experimento foi instalado é classificado como planossolo, que se caracteriza por apresentar um horizonte B textural e condições de encharcamento, pela dificuldade de drenagem natural.⁴¹ Os teores de fósforo e potássio do solo foram corrigidos com superfosfato triplo e cloreto de potássio na proporção de 35 kg ha⁻¹ e 15 kg ha⁻¹, respectivamente, tendo como base as necessidades nutricionais da espécie medicinal *Calendula officinalis* L., a qual pertence à mesma família de mil-folhas. Esse procedimento foi adotado devido à inexistência de recomendação de adubação para *A. millefolium* L.

As plantas foram submetidas a diferentes condições de luminosidade: luz plena e sombreamento obtido com malha azul, vermelha e preta. As malhas da marca ChromatiNet foram fornecidas pela empresa Polysack Plastic Industries®.

As plantas sombreadas e as submetidas à luz plena permaneceram nestas condições por oito semanas, quando foi realizada a primeira coleta (metade do número de plantas e amostras de tecidos foliares) e as malhas de sombreamento foram removidas. Após duas semanas de readaptação ao ambiente natural, amostras de folhas foram coletadas, caracterizando a segunda coleta. A outra metade do número de plantas e novas amostras de tecidos foliares foram coletadas com quatro semanas de readaptação, finalizando a terceira coleta.

Os experimentos foram conduzidos sob um delineamento experimental em blocos inteiramente casualizados, em um fatorial 4x3 (condições de luminosidade e períodos de coleta) (para extração e quantificação de fenois totais) e 4x2 (condições de luminosidade e períodos de coleta) (para extração e quantificação de flavonoides totais e rendimento e composição química do óleo essencial), com quatro repetições e a unidade experimental consistiu de cinco plantas.

As folhas e flores das plantas separadamente foram submetidas à pré-secagem em local ventilado, em temperatura ambiente, com ausência de luz direta, por 10 dias e após foram secas em estufa de circulação forçada de ar modelo MA035 (Marconi) a 30°C por 24 horas. Os materiais desidratados foram armazenados em pequenos lotes em sacos de papel pardo e acondicionados em uma sala desumidificada com temperatura de 20°C. As folhas e flores secas foram submetidas à moagem em moinho de rotor modelo Pulverisette 14 (Fritsch, Alemanha) com granulometria de 0,5 mm à velocidade de 8000 rpm.

Os testes de pureza incluíram as determinações do teor de umidade (parâmetro utilizado como indicativo das condições de armazenamento da matéria-prima) e teor de cinzas totais (determinação da quantidade de impurezas inorgânicas não voláteis como materiais estranhos, areia e terra).

O teor de umidade foi determinado utilizando amostras de 3 g de folhas e flores secas e moídas separadamente que tiveram suas massas aferidas em balança analítica utilizando cápsulas com tampa de alumínio, previamente dessecadas em estufa a 100°C por 15 minutos e em dessecador por 45 minutos. Após a aferição das massas, as amostras foram colocadas em estufa à temperatura de 105°C

por 5 horas. Depois de arrefecidas à temperatura ambiente em dessecador, foram submetidas a uma nova pesagem até a obtenção do peso constante. A porcentagem do teor de umidade foi obtida pela equação: $P(\%) = (P_1 - P_2) / P_a \times 100$ em que P_1 representa o peso da cápsula com tampa contendo a amostra antes da dessecação, P_2 o peso da cápsula com tampa contendo a amostra após a dessecação e P_a o peso da amostra.⁸

A determinação do teor de cinzas totais foi obtida pesando 1 g de folhas e flores secas e moídas separadamente em cadinhos de porcelana previamente lavados, calcinados, arrefecidos e pesados. Após a distribuição das amostras nos cadinhos foram incineradas a temperatura de 600°C em mufla modelo Q318M (Quimis) por 4 horas. Depois de arrefecidas à temperatura ambiente em dessecador por 30 minutos, foram submetidas a nova pesagem em balança analítica. A porcentagem do teor de cinzas totais foi obtida pela equação: $P(\%) = (P_1 - P_2) / P_a \times 100$ em que P_1 representa o peso do cadinho contendo as cinzas, P_2 o peso do cadinho e P_a o peso da amostra.⁸

A extração de fenois totais foi realizada utilizando 1 g de tecido foliar fresco, o qual foi macerado em almofariz com N_2 líquido e homogeneizado com 10 mL de solução metanol/clorofórmio/água ultra pura (MCW), na proporção de 12:5:3 (v/v/v), respectivamente. O homogeneizado permaneceu em repouso por 24 horas à temperatura ambiente com ausência de luz. Posteriormente, esse homogeneizado foi centrifugado a 4.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. A cada 8 mL de sobrenadante obtido, foi acrescentado 2 mL de clorofórmio e 3 mL de água pura milliQ em tubos, os quais foram centrifugados novamente a 4.000 g por 10 minutos para obter o extrato aquoso. Esse foi coletado e concentrado por evaporação em banho-maria a 37°C por 24 horas, com a finalidade de eliminar o excesso de metanol e resíduos de clorofórmio.²

A quantificação de fenois totais foi realizada em alíquotas do extrato aquoso, na qual foram acrescentados 500 µL de reagente Folin-Ciocalteu 1 N e agitado em vórtex. Após 15 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 5 mL de reagente alcalino 0,1 N (solução de carbonato de sódio e hidróxido de sódio) e agitado em vórtex. Após 60 minutos em temperatura ambiente, as leituras das amostras e dos padrões de ácido fênico (0-200 µg) foram realizadas em espectrofotômetro a 760 nm e a quantificação foi expressa em $\mu\text{g g}^{-1}$ MF.¹⁵

A extração de flavonoides totais foi realizada em amostras de 0,25 g de folhas e flores secas e moídas, na qual foram maceradas com 10 mL de metanol 70%. Os extratos permaneceram em repouso por 24 horas à temperatura ambiente com ausência de luz e após esse período foram filtrados com papel filtro.²⁶

A quantificação de flavonoides totais foi obtida em extratos, nos quais foram acrescentados 6 mL de metanol 70% e 2 mL de cloreto de alumínio 5%. Após 10 minutos a temperatura ambiente, as leituras das amostras e dos padrões de quercetina (0-200 µg) foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm e a quantificação foi expressa em µg g⁻¹ MS.²⁵

A extração do óleo essencial foi realizada em amostras de 70 g de folhas e flores secas e moídas separadamente, através da técnica de arraste a vapor em aparelho de Clevenger.⁸ O material vegetal foi inserido em balão volumétrico, ao qual foi acrescentado 1500 mL de água ultra pura (Milli-Q). O tempo de refluxo foi de 4 horas, contados a partir do início da fervura. Após o período de extração, o hidrolato, obtido da hidrodestilação, foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação, utilizando três porções de 5 mL de diclorometano. As frações orgânicas foram reunidas e desidratadas com 3 g de sulfato de sódio anidro por 15 minutos em agitação. O sal foi removido por filtração com lã de vidro e o solvente evaporado à temperatura ambiente em capela de exaustão de gases por 48 horas, obtendo-se o óleo desidratado. O rendimento em porcentual do óleo essencial foi calculado com base na massa seca livre de umidade.³⁵

A análise quantitativa do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC-FID) (Shimadzu). Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura), sendo o nitrogênio o gás de arraste com fluxo de 1,2 mL/min e pressão de 80 KPa. A temperatura do injetor e detector foi mantida em 280°C, na qual a temperatura inicial foi de 40°C com uma rampa de temperatura de 10°C/min até 90°C, seguida por 5°C/min até 280°C. O óleo essencial foi diluído em hexano (5.000 ppm) e injetado manualmente no cromatógrafo, empregando um volume de injeção de 1,0 µL no modo split a uma razão de injeção de 1:50. Um cromatograma foi gerado para cada amostra e a quantificação de cada composto foi realizada por meio da comparação do índice de retenção e normalização da área de cada pico com os padrões cromatográficos.²⁹

Os dados resultantes das coletas foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro. A análise estatística foi realizada com o programa estatístico SAS.³⁶

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao teor de umidade em tecidos foliares e reprodutivos de *A. millefolium* L. pode-se observar que todas as amostras analisadas se mostraram satisfatórias quanto ao teor de umidade, na qual as amostras de folhas apresentaram uma média de 10,77% e de flores 10,49%, sendo valores inferiores a 12%, considerado limite para o teor de umidade ideal em plantas da família Asteraceae.⁸ Esses valores indicam que o processo de secagem dessas estruturas vegetais foi eficiente para a conservação do material vegetal e preservação dos compostos bioativos.

Os teores de cinzas totais em tecidos foliares e reprodutivos de *A. millefolium* L. se mostraram adequados, pois as amostras de folhas apresentaram uma média de 13,02% e de flores 9,19%, sendo estes menores que 15%, considerado valor máximo em plantas da família Asteraceae, indicando que a quantidade de impurezas inorgânicas não voláteis analisadas estavam dentro das especificações exigidas.⁸

Conforme os resultados dos testes de pureza, avaliados pelos teores de umidade e cinzas totais, as amostras de folhas e flores de *A. millefolium* L. apresentaram um alto controle de qualidade, garantido assim a qualidade de extração do óleo essencial.

O teor de fenois totais em tecidos foliares de *A. millefolium* L. foi influenciado pelas condições de luminosidade e períodos de coleta, sendo a interação significativa entre esses fatores (Anexo - Tabela D).

Pode-se verificar que o teor de fenois totais foi estimulado de forma significativa pela luz plena, enquanto que o sombreamento com as malhas preta, azul e vermelha promoveram uma redução na síntese desses compostos em todos os períodos de coleta avaliados (Figura 1).

Os compostos fenólicos são fotoprotetores e facilmente oxidáveis pela luz, ocasionando a formação de compostos isolados.⁴⁰ A maior concentração de fenois totais na espécie *A. millefolium* L. submetida à luz plena pode estar associada com o mecanismo adaptativo e de proteção da planta.

O teor de compostos fenólicos nas folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) diminuiu em plantas mantidas sombreadas.¹⁷ Os resultados deste trabalho indicam que os tecidos foliares de *A. millefolium* L. quando submetidos à baixa intensidade luminosa reduzem a formação de fenois totais, na qual a redução da luz promove uma alteração no conteúdo de compostos fenólicos.¹³

O sombreamento com malhas preta, azul e vermelha causou efeito inibitório na síntese de compostos fenólicos, sugerindo que a qualidade da luz, além da intensidade, podem atuar sinergisticamente sobre o metabolismo desta classe de compostos secundários. Em folhas de pepino (*Cucumis sativus* L. cv. Jinyan) e de eleutero (*Eleutherococcus senticosus*) foram verificadas que o espectro de luz azul reduziu o conteúdo de fenois totais.^{39,46}

A produção de fenois totais na presença de luz plena (controle) foi incrementada de maneira significativa em plantas com duas semanas após o sombreamento, o que demonstra a recuperação dos efeitos inibitórios da baixa intensidade de luz ou pode estar associado a uma resposta comum das plantas a variações climáticas (aumento da precipitação pluviométrica e redução da temperatura). Os teores desses compostos mantiveram-se quatro semanas após o sombreamento nas plantas previamente sombreadas com as malhas vermelha e preta, porém não atingindo os teores encontrados em plantas mantidas sob luz plena (Figura 1).

O processo de aclimação da planta ao novo ambiente com luz solar, após passar por um estresse abiótico, altera as estruturas e funções que permitem um aumento na eficiência de carbono,⁵ onde a espécie *A. millefolium* L. necessita de um curto período de aclimação ao novo meio para aumentar o teor de fenois totais. Esses resultados indicam que a aclimação fisiológica às condições variáveis de luminosidade está intimamente associada com as alterações nos mecanismos fotoprotetores, como é o caso dos compostos fenólicos.

O conteúdo de flavonoides totais em folhas e flores de *A. millefolium* L. foi influenciado pela interação significativa entre os fatores, condições de luminosidade e períodos de coleta (Anexo - Tabela E).

Observou-se que o teor desses compostos nos tecidos foliares reduziu de forma significativa em plantas sombreadas por oito semanas com as malhas preta, azul e vermelha (Figura 2A). Em eleutero (*Eleutherococcus senticosus*) foi observado que o espectro de luz azul também reduziu o conteúdo de flavonoides totais.³⁹

Após o retorno das plantas à luz plena, quatro semanas após o sombreamento, houve um aumento significativo no teor de flavonoides totais nas folhas das plantas previamente sombreadas com malha vermelha, atingindo concentrações superiores às plantas mantidas sob luz plena (Figura 2A), sugerindo que o espectro diferenciado de luz a que as plantas foram submetidas influencia na resposta quando novamente expostas à luz plena.

O conteúdo de flavonoides totais em flores foi significativamente superior nas plantas mantidas sob luz plena. A redução observada nas plantas sombreadas por oito semanas foi semelhante entre os tratamentos com diferentes condições de luminosidade (Figura 2B).

A síntese de flavonoides totais em flores, quatro semanas após o sombreamento, decresceu em todos os tratamentos com diferentes luminosidades, semelhante ao efeito também observado nas plantas mantidas sob luz plena (controle), atingindo valores equivalentes (Figura 2B), o que pode estar associado a uma resposta comum das plantas a variações climáticas (aumento da precipitação pluviométrica e redução da temperatura).

A luz é um fator importante que afeta a formação de produtos nos vegetais, incluindo os metabólitos primários e secundários. O efeito estimulador da luz na síntese de compostos secundários, como os flavonoides, tem sido demonstrado em plantas.¹⁸ Os flavonoides absorvem radiação na faixa do ultravioleta e do visível, apresentando um papel importante de defesa nas plantas frente a radiação UV da luz solar.³² Muitas pesquisas demonstraram que existe um incremento quantitativo desses compostos em órgãos expostos à luz solar, em comparação com aqueles que estão à sombra.³

Em relação aos valores das médias isoladas, pode-se confirmar que o conteúdo de flavonoides totais em plantas submetidas com as malhas preta e azul foi maior nas flores, enquanto que na presença de luz plena e malha vermelha foi mais elevado nas folhas. Em plantas sombreadas por oito semanas, a síntese desses compostos foi reduzida em flores de plantas que retornaram à luz plena, enquanto que em folhas a síntese foi estimulada (Figura 2).

Esses resultados indicam que dependendo da qualidade de luz e do período de coleta que a planta recebe, o acúmulo de flavonoides totais é diferenciado entre as estruturas fotossintéticas e reprodutoras de *A. millefolium* L., evidenciando que o sítio de armazenamento desses compostos secundários pode ser distinto, dependendo do estresse abiótico que o vegetal é submetido.

Os flavonoides encontrados nas folhas das plantas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, caules, raízes e frutos. O mesmo componente ainda pode ter concentrações e funções distintas dependendo do órgão vegetal em que se localiza.⁴⁰

O óleo essencial extraído de folhas e flores de *A. millefolium* L., analisado visualmente, caracterizou-se por ser um líquido com alta viscosidade e com intensa coloração azul. A coloração do óleo essencial de *A. millefolium* L. é azul devido a presença de azuleno, camazuleno e proazuleno.¹⁶

O rendimento do óleo essencial extraído de folhas e flores de *A. millefolium* L. foi influenciado pela interação significativa entre os fatores, condições de luminosidade e períodos de coleta (Anexo - Tabela E).

A produção de óleo essencial extraído de tecidos foliares foi estimulada significativamente pelo espectro de luz azul em plantas sombreadas por oito semanas (Figura 3A). Foi observado similarmente na planta medicinal conhecida popularmente por guaco (*Mikania glomerata* Sprengel), da família Asteraceae, que a malha azul (50% de sombreamento) estimulou o rendimento do óleo essencial extraído das folhas.⁴²

Esses resultados apontam que o espectro de luz azul pode promover a ativação das rotas do metabolismo secundário em *A. millefolium* L. Dentre as diversas enzimas fundamentais na biossíntese de moléculas presentes no óleo essencial, a fenilalanina amônia liase (PAL) tem sido considerada como reguladora na formação de muitos compostos fenólicos.⁴³ A atividade da PAL aumentou quando as plântulas de *Pisum sativum* L. foram submetidas à luz azul e o mesmo efeito foi verificado com *Cucumis sativus*.^{1,23}

Com a re-exposição das plantas à condição de luz plena houve um grande decréscimo do rendimento do óleo essencial extraído de folhas, sendo este efeito menor para as plantas previamente sombreadas com malha vermelha, quatro semanas após o sombreamento. Embora esse efeito tenha sido comum às plantas mantidas sob luz plena (controle) e possivelmente resultante da interação entre

mudanças fisiológicas das plantas em função do estágio de desenvolvimento, associado às variações do clima (aumento da precipitação pluviométrica e redução da temperatura), não se pode descartar o possível efeito positivo do sombreamento com malha vermelha na minimização deste efeito em relação aos demais tratamentos (Figura 3A).

O rendimento do óleo essencial extraído de flores foi incrementado de forma significativa pelo sombreamento com malha preta. Quatro semanas após o retorno das plantas à condição de luz plena, houve redução do rendimento do óleo de forma semelhante ao observado nas plantas não sombreadas, sendo este efeito menos intenso nas plantas oriundas do tratamento com malha vermelha, resultando em concentrações significativamente maiores em relação aos demais tratamentos, resultado equivalente ao encontrado para os tecidos foliares (Figura 3B).

As variações nos rendimentos do óleo essencial em função de alterações na intensidade e qualidade espectral da radiação solar evidenciam que o estabelecimento de condições luminosas específicas é fundamental para maximizar a produção de princípios ativos. As respostas celulares à luz são provavelmente indiretas, pois elas devem resultar de mudanças oriundas do equilíbrio dos fitormônios e metabólitos, que, por sua vez, podem ser causadas por mudanças na permeabilidade da membrana mediada pelo fitocromo e mudanças enzimáticas resultantes da atividade de genes.⁴⁴

Em relação aos valores das médias isoladas, evidenciou-se que o rendimento do óleo essencial foi 8,6 vezes mais elevado em estruturas reprodutivas, em relação às fotossintéticas, indicando serem as flores o sítio principal de produção e armazenamento de princípios ativos.

Em *A. millefolium* L., foi identificada uma variação no rendimento do óleo essencial de acordo com a parte do vegetal da qual se fez a extração, mostrando que os caules produziram 0,18 mL/g de óleo por massa seca, as folhas 0,41 mL/g e as flores 1,67 mL/g.¹⁶

A composição química do óleo essencial de folhas (Tabela 1) e flores (Tabela 2) de *A. millefolium* L. submetida a diferentes condições de luminosidade e períodos de coleta apresentou variações qualitativas e quantitativas.

Pode-se verificar que os 11 compostos identificados no óleo essencial de folhas são terpênicos, na qual os monoterpenos (10C) encontrados foram 1-8 cineol, γ -terpineno, borneol, mentol, terpineol e

acetato de bornil e os sesquiterpenos (15C) foram trans cariofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno, farnesol e camazuleno (Tabela 1).

Os compostos químicos 1,8 cineol, γ -terpineno, terpineol, acetato de bornil, óxido de cariofileno e borneol foram encontrados no óleo essencial extraído das partes aéreas de *A. millefolium* L. cultivada na Turquia. ⁶

Os compostos químicos majoritários do óleo essencial extraído dos tecidos foliares de plantas cultivadas sob luz plena foram farnesol (11,28%), trans cariofileno (5,41%), óxido de cariofileno (3,94%), borneol (2,44%) e camazuleno (2,37%). Esses compostos também foram os mais abundantes nas plantas sombreadas com malha preta, aumentando especialmente o farnesol (21,30%) seguido do trans cariofileno (9,47%), camazuleno (5,75%), óxido de cariofileno (4,66%) e borneol (3,87%). O composto γ -terpineno apesar de não ser majoritário, foi incrementado nessa condição de sombreamento (Tabela 1).

Em plantas sombreadas com malha azul, pode-se observar um expressivo aumento da proporção de camazuleno (9,23%) e farnesol (14,17%) em tecidos foliares, em relação às plantas cultivadas sob luz plena. Além desses compostos, trans cariofileno (2,94%), óxido de cariofileno (2,26%) e borneol (1,23%) foram também encontrados, porém em menor quantidade em relação ao encontrado no óleo essencial de plantas não sombreadas (Tabela 1).

Os principais componentes do óleo essencial extraído de folhas submetidas ao tratamento com malha vermelha por oito semanas foram farnesol (12,09%), camazuleno (4,29%), óxido de cariofileno (3,15%), trans cariofileno (2,80%) e borneol (1,15%). A proporção de camazuleno foi estimulada nesse tratamento quando comparado às plantas cultivadas sob plena luz (Tabela 1).

Estudos realizados com a espécie medicinal *Melissa officinalis* L. mostraram que o óleo essencial extraído das folhas dessa planta apresentou diferença na composição química, influenciada pela malha vermelha. ⁴

Outras variações entre os tratamentos foram observadas nas plantas sombreadas com as malhas preta e azul, em que foi detectada uma pequena proporção do composto químico mentol (Tabela 1).

Com base nos resultados obtidos com a composição terpênica do óleo essencial de folhas de *A. millefolium* L., constatou-se que o farnesol foi o composto majoritário em todos os tratamentos, porém estimulado pelo tratamento com o sombreamento, sobretudo com a malha preta. Essas informações indicam que essa planta, quando exposta a essas condições, sintetiza uma alta concentração de farnesol, composto que pode estar associado com uma das propriedades medicinais dessa espécie, que é atribuída à atividade antifúngica, pois esse composto está diretamente associado com a inibição micelial e com a indução de apoptose em *Candida albicans*.^{31,38}

Quatro semanas após o sombreamento, a composição do óleo essencial de folhas em relação aos compostos majoritários foi semelhante ao obtido em plantas cultivadas sob luz plena, destacando-se o farnesol, óxido de cariofileno, trans cariofileno e borneol. O composto químico óxido de cariofileno aumentou expressivamente nas plantas previamente sombreadas, especialmente naquelas provenientes do tratamento com malha preta. Nas plantas oriundas do tratamento com malha azul foi observado também um aumento de trans cariofileno, borneol, acetato de bornil e α -humuleno. O aumento da proporção de terpineol foi comum nas plantas previamente sombreadas com malhas vermelha e azul (Tabela 1).

Ainda, o retorno das plantas à condição de luz plena causou queda expressiva na proporção de farnesol, camazuleno e em menor proporção o 1,8-cineol em relação às plantas sombreadas, atingindo concentrações semelhantes ao verificado em plantas não sombreadas (Tabela 1). Esses resultados coletivamente sugerem que a variação na composição terpênica do óleo essencial de folhas de *A. millefolium* L. é influenciada pela intensidade e qualidade de luz que as plantas são submetidas, favorecendo ou inibindo seletivamente a biossíntese desses compostos.

Pode-se verificar que dos 16 compostos identificados no óleo essencial de flores, 15 deles são terpênicos, na qual os monoterpenos encontrados foram α -pineno, β -pineno, 1-8 cineol, γ -terpineno, α -terpineno, cânfora, borneol, mentol, terpineol e acetato de bornil e os sesquiterpenos foram trans cariofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno, farnesol e camazuleno. O único composto não terpênico identificado nesse óleo foi o composto fenólico eugenol (Tabela 2).

Os compostos químicos β -pineno, 1,8 cineol e camazuleno foram encontrados no óleo essencial extraído das flores de *A. millefolium* L.¹²

Os compostos químicos majoritários do óleo essencial extraído das flores em plantas cultivadas sob luz plena durante oito semanas foram farnesol (44,61%), camazuleno (22,29%), óxido de cariofileno (3,79%), trans cariofileno (3,60%) e borneol (2,43%). Já ao final do experimento, quatro semanas após o sombreamento foram camazuleno (30,84%), trans cariofileno (15,54%), borneol (11,34%), farnesol (9,91%) e óxido de cariofileno (9,02%) (Tabela 2).

Em relação ao efeito do tratamento com malha preta por oito semanas sobre a composição do óleo essencial de flores, pode-se verificar que os compostos químicos majoritários foram farnesol (35,44%), camazuleno (7,18%), trans cariofileno (4,30%), óxido de cariofileno (2,33%) e borneol (1,65%). No óleo oriundo de flores de plantas sombreadas com a malha azul foram principalmente o camazuleno (22,07%), seguido do trans cariofileno (10,09%), farnesol (6,45%) e em menor proporção cânfora (3,58%) e óxido de cariofileno (3,19%). Já em plantas sombreadas com malha vermelha a composição foi alterada para maior proporção de farnesol (38,50%), seguido de camazuleno (19,34%), trans cariofileno (5,95%), óxido de cariofileno (2,83%) e borneol (2,38%). Dentre os tratamentos, a proporção de farnesol aumentou em plantas sombreadas com malha vermelha e decresceu nas plantas cultivadas com malhas azul e preta, indicando um efeito direto na qualidade da luz sobre a biossíntese desse composto (Tabela 2).

Em relação aos compostos majoritários do óleo extraído de flores das plantas submetidas ao sombreamento com malha preta, quatro semanas de retorno à luz plena, foram o trans cariofileno (17,90%), camazuleno (15,61%), borneol (9,53%), farnesol (6,97%) e óxido de cariofileno (6,71%). Nas plantas previamente sombreadas com malha azul, a composição dos principais componentes do óleo modificou especialmente para a proporção de camazuleno (23,44%), seguido de proporções semelhantes de trans cariofileno (20,94%), borneol (10,57%), óxido de cariofileno (8,58%) e farnesol (5,04%). Já os compostos extraídos de flores de plantas submetidas à malha vermelha, quatro semanas após o sombreamento foram camazuleno (31,29%) em maior proporção em relação às demais condições de sombreamento, seguido de trans cariofileno (14,27%), farnesol (11,15%), borneol (6,94%) e óxido de cariofileno (6,48%) (Tabela 2).

Dentre as variações observadas nesses compostos, foi verificado que o aumento da proporção de trans cariofileno nas flores foi favorecido na presença de luz plena independente do tratamento de

sombreamento em que as plantas foram previamente expostas (Tabela 2). Esse efeito ocorreu mesmo nas plantas mantidas sob luz plena até o final do experimento, o que indica ser um efeito do estágio de desenvolvimento da planta associado às variações do meio (aumento da precipitação pluviométrica e redução da temperatura).

Os compostos α -pineno e β -pineno foram encontrados apenas nas flores das plantas novamente expostas à luz plena após o sombreamento, independentemente da coloração, sugerindo ser este um efeito mediado pela variação da intensidade da luz. Porém o composto 1,8 cineol aumentou nas plantas previamente sombreadas com malhas azul e vermelha (Tabela 2).

Dentre os principais componentes do óleo essencial de flores de *A. millefolium* L. detectados nos diferentes tratamentos, verificou-se que o composto químico farnesol foi o majoritário do óleo essencial extraído das flores das plantas mantidas à luz plena e sombreadas com malhas preta e vermelha por oito semanas. Porém com o retorno das plantas à condição de luz plena, quatro semanas após, o composto majoritário foi o camazuleno, mesmo nas plantas permanentemente mantidas sem sombreamento, indicando que dependendo do estágio de desenvolvimento da planta e condição abiótica envolvida, produz uma alta concentração de camazuleno. Este composto pode estar associado com uma das propriedades medicinais dessa espécie, a atividade anti-inflamatória, pois esse composto é considerado o responsável pelo bloqueio da enzima ciclo oxigenase na biossíntese da prostaglandinas.⁷

O fator abiótico, como o local de cultivo da subespécie *A. millefolium* ssp. *millefolium*, afeta a síntese de camazuleno, pois em alguns ambientes esse composto é majoritário no óleo essencial extraído de flores, enquanto que em outros locais esse composto não é encontrado no óleo dessa planta.²⁷

Em relação aos compostos químicos α -pineno e β -pineno encontrados no óleo extraído de flores com quatro semanas após o sombreamento, pode-se verificar que os tratamentos de sombreamento com malha preta, azul e vermelha estimularam a síntese desses, enquanto que na presença de luz plena, esses mesmos compostos não foram detectados (Tabela 2).

A síntese do composto químico α -terpineno, encontrado no óleo extraído de flores, foi estimulada pela luz plena, enquanto que em plantas sombreadas com as malhas preta e azul, esse

composto não foi detectado. Já a produção do composto químico cânfora foi estimulada pela malha azul, enquanto que na presença de luz plena ou atenuada pelas malhas vermelha e preta, esse composto não foi detectado (Tabela 2).

O composto mentol esteve presente no óleo extraído de flores em todos os tratamentos com plantas sombreadas e mantidas sob luz plena no mesmo período. No entanto, quatro semanas após a retirada das malhas, não foi detectado, mesmo nas plantas permanentemente mantidas sob luz plena, o que indica que a biossíntese desse composto independe dos tratamentos impostos. Da mesma forma, o composto acetato de bornil, somente foi detectado no óleo essencial de flores de plantas mantidas sob luz plena no período correspondente a quatro semanas após a retirada das malhas dos demais tratamentos, período em que o referido composto também foi detectado nesses grupos de plantas (Tabela 2).

Comparando a análise do óleo essencial de folhas e flores, os compostos químicos α -pineno, β -pineno, α -terpineno, cânfora e eugenol foram detectados somente nas flores de *A. millefolium* L., mostrando serem essas as estruturas vegetais com maior variedade de compostos identificados.

Com base na composição química do óleo essencial de *A. millefolium* L., os resultados indicaram que as diferentes condições de luminosidade geram variações qualitativas e quantitativas dos compostos gerados a partir do metabolismo secundário, evidenciando que dependendo do interesse pelo princípio ativo alvo, esse pode ser altamente estimulado por um determinado fator.

CONCLUSÕES

A luz plena estimula a síntese de fenóis totais, enquanto que, variações nas condições de luminosidade afetam a produção de flavonoides totais.

A qualidade de luz afeta o rendimento de óleo essencial, sendo esse rendimento mais elevado nas flores do que nas folhas.

A qualidade e quantidade de metabólitos secundários do óleo essencial são influenciadas pelas diferentes condições de luminosidade, sendo o farnesol o composto majoritário do óleo extraído dos tecidos foliares e em flores o farnesol e camazuleno.

Os períodos de coleta e as condições de luz afetam a produção de fenóis e flavonoides totais, rendimento e composição e concentração de terpenoides do óleo essencial de *A. millefolium* L.

REFERÊNCIAS

1. Attridge, T. H.; Smith, H. *Biochimica Biophysica Acta*. **1974**, *343*, 452.
2. Bieleski, R. L.; Turner, N. A. *Analytical Biochemistry*. **1966**, *17*, 278.
3. Bohm, B. A. *The Botanical Review*. **1987**, *53*, 197.
4. Brant, R. S.; Pinto, J. E. B. P.; Rosa, L. F.; Albuquerque, C. J. B.; Ferri, P. H.; Corrêa, R. M. *Revista Ciência Rural*. **2009**, *39*, 1401.
5. Burritt, D. J.; Mackenzie, S. *Annals of Botany*. **2003**, *91*, 783.
6. Candan, F.; Unlu, M.; Tepe, B.; Daferera, D.; Polissiou, M.; Sökmen, A.; Akpulat, H. A. *Journal of Ethnopharmacology*. **2003**, *87*, 215.
7. Dewick, P. M. *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*. 3 ed. Canada: John Wiley and Sons, 2009.
8. *Farmacopeia Brasileira*, 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, parte II, segundo fascículo, 2000.
9. Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. *Revista Química Nova*. **2007**, *30*, 374.
10. Grace, S. C.; Logan, B. A. *Philosophical Transactions Royal Society of London B*. **2000**, *355*, 1499.
11. Grime, J. P.; Mackey, J. M. L. *Evolutionary Ecology*. **2002**, *16*, 299.
12. Gudaityte, O.; Venskutonis, P. R. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2007**, *35*, 582.
13. Hansen, J.; Eriksen, E.N. *Physiologia Plantarum*. **1974**, *32*, 170.
14. Hofmann, L.; Fritz, D.; Nitz, S.; Kollmannsberger, H.; Drawert, F. *Phytochemistry*. **1992**, *31*, 537.
15. Jennings, A. C. *Analytical Biochemistry*. **1981**, *118*, 396.
16. Júnior, C. C.; Ming, L. C.; Scheffer, M. C. *Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas*. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994.
17. Júnior, J. G. C.; Bianchi, V. J.; Strelow, E. Z.; Bacarin, M. A.; Fachinello, J. C. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **1999**, *34*, 2219.

18. Krewzaler, F.; Hahlbrock, K. *Phytochemistry*. **1976**, *12*, 1149.
19. Lee, D. W.; Oberbauer, S. F.; Johnson, P.; Krishnapilay, B.; Mansor, M.; Mohamad, H.; Yap, S. K. *Journal of Botany*. **2000**, *87*, 447.
20. Lima, H. R. P., Kaplan, M. A. C.; Cruz, A. V. M. *Floresta e Ambiente*. **2003**, *10*, 71.
21. Lopes, F. C. M.; Placeres, M. P.; Moreira, R. R. D.; Santos, L. E. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2003**, *13*, 11.
22. Lorenzi, H.; Matos, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas*. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.
23. Loschke, D. C.; Hadwiger, L. A.; Schröder, J.; Hahlbrock, K. *Plant Physiology*. **1981**, *68*, 680.
24. Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Junior, V. F. V.; Grynberg, N. F.; Echevarria, A. *Revista Química Nova*. **2002**, *25*, 429.
25. Markham, K. R. *Techniques of flavonoid identification*. 1 ed. London: Academic Press, 1982.
26. Mendes, A. D. R.; Martins, E. R.; Fernandes, L. A.; Marques, C. C. L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. **2005**, *7*, 7.
27. Mockute, D.; Judzentiene, A. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2003**, *31*, 1033.
28. Morini, S.; Muleo, R. *Forestry Sciences*. **2003**, *75*, 3.
29. Neto, F. R. A.; Nunes, D. S. S. *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2003.
30. Oren-Shamir, M.; Gussakovsky, E. E.; Shpiegel, E.; Nissim-Levi, A.; Ratner, K.; Ovadia, R.; Giller, Yu. E.; Shahak, Y. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. **2001**, *76*, 353.
31. Ramage, G.; Saville, S. P., Wickes, B. L.; Ribot, J. L. L. *Applied and Environmental Microbiology*. **2002**, *68*, 5459.
32. Robards, K.; Prenzler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang P.; Glover, W. *Food Chemistry*. **1999**, *66*, 401.
33. Rohloff, J., Dragland, S., Mordal, R.; Iversen, T. H. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53*, 4143.
34. Rosa, M. B.; Oliveira, T. G.; Carvalho, C. A.; Carvalho, L. M.; Peres, R. L. *Revista Eletrônica de Farmácia*. **2008**, *5*, 101.

35. Santos, A. S.; Alves, S. M.; Figueiredo, F. J. C.; Neto, O. G. R. *Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório*. Comunicado técnico - EMBRAPA, v. 99, 2004. ISSN 1517-2244.
36. Sas Learning Edition. *Program SAS - Getting started with the SAS learning edition*. Cary, North Carolina, 2002.
37. Shahak, Y.; Gussakovsky, E. E.; Gal, E.; Ganelevin, R. *Acta Horticulturae*. **2004**, 659, 143.
38. Shirliff, M. E.; Krom, B. P.; Meijering, R. A. M.; Peters, B. M.; Zhu, J.; Scheper, M. A.; Harris, M. L.; Jabra-Rizk, M. A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2009**, 53, 2392.
39. Shohael, A. M.; Ali, M. B.; Yu, K. W.; Hahn, E. J.; Islam, R.; Paek, K. Y. *Process Biochemistry*. **2006**, 41, 1179.
40. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.
41. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. *Manual de adubação e de calagem para os estados do RS e de SC*. Porto Alegre, 2004.
42. Souza, G. S.; Castro, E. M.; Soares, A. M.; Pinto, J. E. B. P.; Resende, M. G.; Bertolucci, S. K. V. *Revista Biotemas*. **2011**, 24, 1.
43. Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
44. Tanaka, S.; Yamaura, T.; Shigemoto, R.; Tabata, M. *Phytochemistry*. **1989**, 28, 2955.
45. Tattini, M.; Galardi, C.; Pinelli, P.; Massai, R.; Remorini, D.; Agati, G. *New Phytologist*. **2004**, 163, 547.
46. Wang, H.; Jiang, Y. P.; Yu, H. J.; Xia, X. J.; Shi, K.; Hong, Z. Y. Yu, J. Q. *European Journal of Plant Pathology*. **2010**, 127, 125.

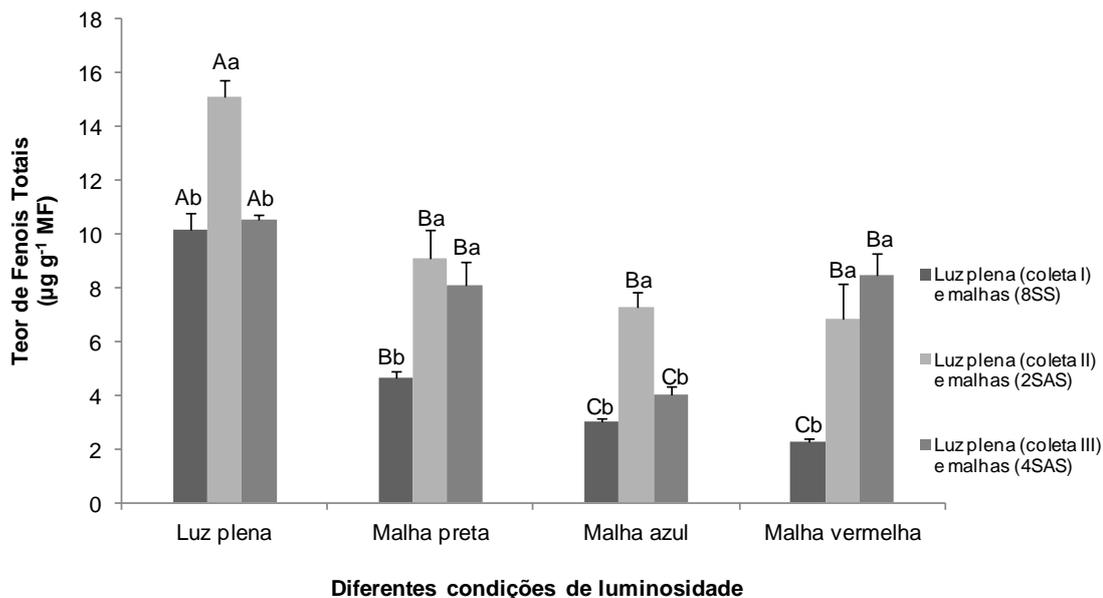


Figura 1. Teor de fenois totais em tecidos foliares de *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha preta, azul e vermelha) e submetida a períodos de coleta (oito semanas de sombreamento - 8SS, duas e quatro semanas após o sombreamento - 2SAS e 4SAS). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam o mesmo período de coleta dentro das diferentes luminosidades e letras minúsculas comparam os diferentes períodos de coleta dentro de uma mesma condição luminosa, na qual letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média de quatro repetições.

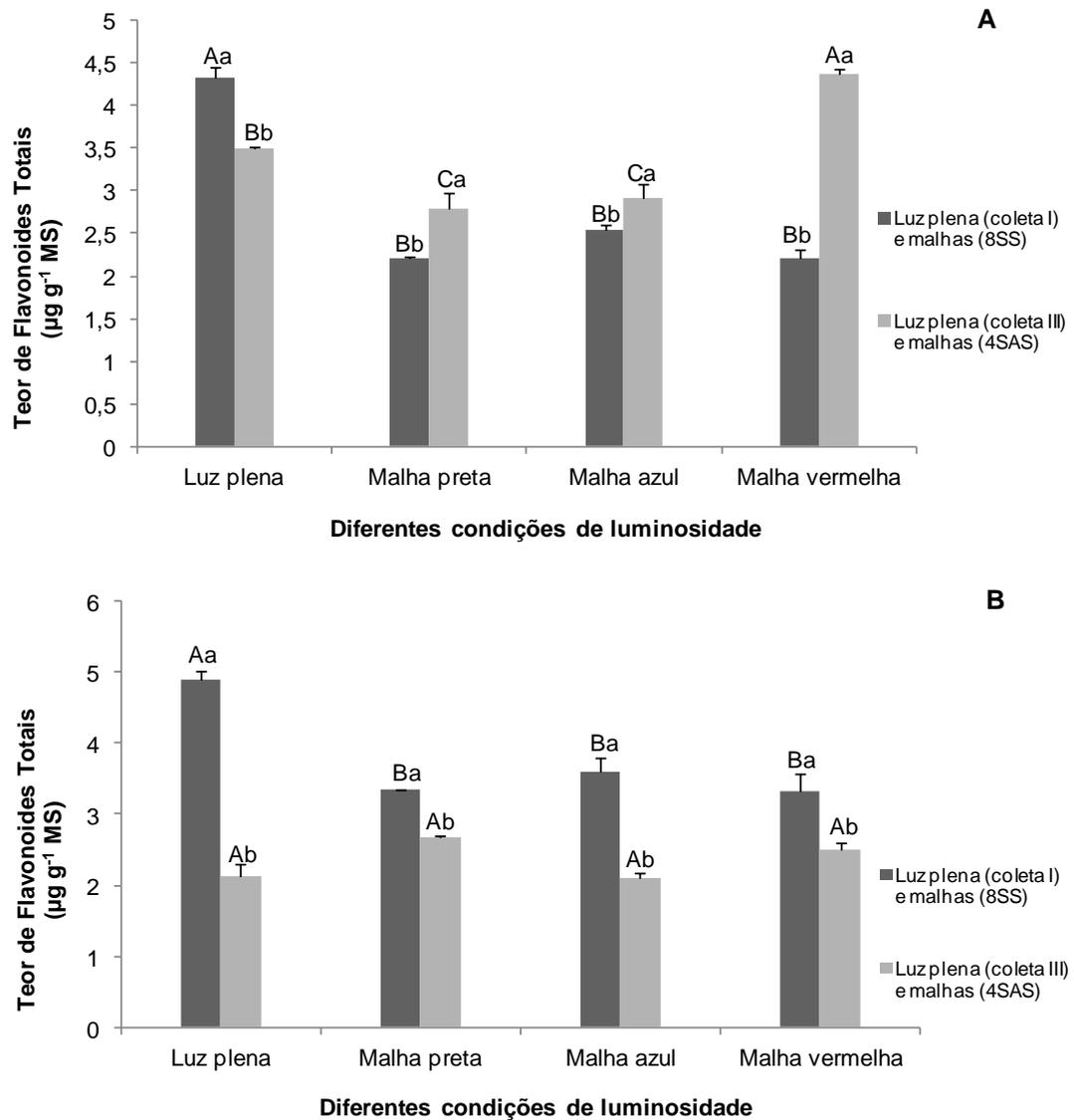


Figura 2. Teor de flavonoides totais em folhas (A) e flores (B) de *Achillea millefolium* L. submetida a diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha preta, azul e vermelha) e cultivada a períodos de coleta (oito semanas de sombreamento - 8SS e quatro semanas após o sombreamento - 4SAS). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam o mesmo período de coleta dentro das diferentes luminosidades e letras minúsculas comparam os diferentes períodos de coleta dentro de uma mesma condição luminosa, na qual letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média de quatro repetições.

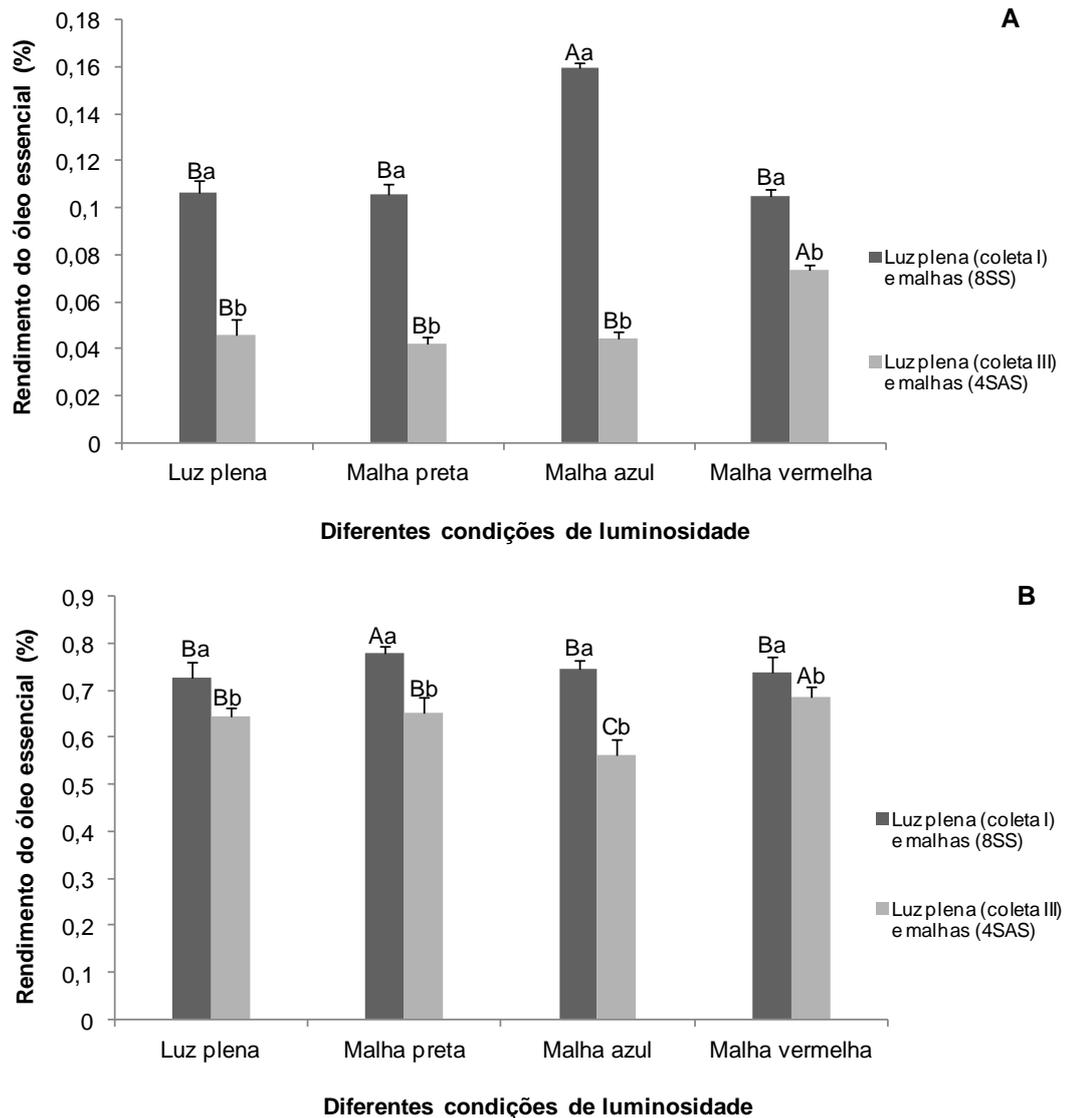


Figura 3. Rendimento do óleo essencial de folhas (A) e flores (B) de *Achillea millefolium* L. cultivada a diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha preta, azul e vermelha) e submetida a períodos de coleta (oito semanas de sombreamento - 8SS e quatro semanas após o sombreamento - 4SAS). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam o mesmo período de coleta dentro das diferentes luminosidades e letras minúsculas comparam os diferentes períodos de coleta dentro de uma mesma condição luminosa, na qual letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam o desvio padrão da média de quatro repetições.

Tabela 1. Composição química (%) do óleo essencial de folhas de *Achillea millefolium* L. cultivada a diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha preta, azul e vermelha) e submetida a períodos de coleta (oito semanas de sombreamento - 8SS e quatro semanas após o sombreamento - 4SAS).

Compostos*	RI**	Diferentes condições de luminosidade							
		Luz plena		Malha preta		Malha azul		Malha vermelha	
		Coleta I	Coleta III	8SS	4SAS	8SS	4SAS	8SS	4SAS
1-8 cineol	5,88	0,47	n.d.	0,72	0,09	0,16	0,09	0,15	n.d.
γ -terpineno	6,54	0,16	n.d.	0,40	n.d.	0,13	n.d.	0,12	n.d.
borneol	9,77	2,44	1,99	3,87	3,64	1,23	3,06	1,15	1,98
mentol	10,02	n.d.***	n.d.	0,006	n.d.	0,06	0,01	n.d.	n.d.
terpineol	10,61	0,41	0,35	0,60	0,42	0,16	0,36	0,17	0,32
acetato de bornil	13,70	0,21	0,13	0,33	0,46	0,08	0,27	0,09	0,13
trans cariofileno	17,62	5,41	3,37	9,47	9,36	2,94	5,23	2,80	3,38
α -humuleno	18,55	0,77	0,63	1,24	1,66	0,41	0,99	0,51	0,61
óxido de cariofileno	21,90	3,94	4,15	4,66	9,74	2,26	6,76	3,15	4,26
farnesol	24,67	11,28	4,30	21,30	3,83	14,17	5,26	12,09	3,45
camazuleno	30,56	2,37	0,95	5,75	1,16	9,23	0,62	4,29	1,04
Total		27,47	15,86	48,34	30,38	30,83	22,65	24,53	15,18

* Em ordem de eluição em coluna DB-5.

** RI = índice de retenção (em minutos).

*** n.d. = não detectado.

Tabela 2. Composição química (%) do óleo essencial de flores de *Achillea millefolium* L. cultivada a diferentes condições de luminosidade (luz plena e sombreamento com malha preta, azul e vermelha) e submetida a períodos de coleta (oito semanas de sombreamento - 8SS e quatro semanas após o sombreamento - 4SAS).

Compostos*	RI**	Diferentes condições de luminosidade							
		Luz plena		Malha preta		Malha azul		Malha vermelha	
		Coleta I	Coleta III	8SS	4SAS	8SS	4SAS	8SS	4SAS
α -pineno	4,11	n.d.	n.d.	n.d.	0,40	n.d.	0,30	n.d.	0,39
β -pineno	4,81	n.d.	n.d.	n.d.	0,29	n.d.	0,18	n.d.	0,26
α -terpineno	5,57	0,21	0,22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,53
1-8 cineol	5,88	1,06	1,39	0,38	3,19	1,21	2,79	0,82	3,14
γ -terpineno	6,54	0,52	0,72	0,28	1,22	0,43	1,09	0,45	1,09
cânfora	9,02	n.d.***	n.d.	n.d.	0,19	3,58	0,21	n.d.	n.d.
borneol	9,77	2,43	11,34	1,65	9,53	1,00	10,57	2,38	6,94
mentol	10,02	0,04	n.d.	0,01	n.d.	0,12	n.d.	0,05	n.d.
terpineol	10,61	0,73	2,91	0,42	2,29	0,74	2,35	0,62	1,49
acetato de bornil	13,70	n.d.	0,45	n.d.	0,51	n.d.	0,61	n.d.	0,39
eugenol	15,82	0,43	0,68	0,30	0,55	n.d.	0,43	0,46	0,33
trans cariofileno	17,62	3,60	15,54	4,30	17,90	10,09	20,94	5,95	14,27
α -humuleno	18,55	0,89	2,70	0,91	2,65	1,57	2,92	1,02	2,34
óxido de cariofileno	21,90	3,79	9,02	2,33	6,71	3,19	8,58	2,83	6,48
farnesol	24,67	44,61	9,91	35,44	6,97	6,45	5,04	38,50	11,15
camazuleno	30,56	22,29	30,84	7,18	15,61	22,07	23,44	19,34	31,29
Total		80,59	85,72	53,21	68,04	50,46	79,47	72,43	80,12

* Em ordem de eluição em coluna DB-5.

** RI = índice de retenção (em minutos).

*** n.d. = não detectado.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aquisição de uma produção diferenciada no teor de óleo essencial extraído de flores da espécie medicinal *A. millefolium* L. é avigorada pela aplicação de nitrogênio, sendo esta resposta dependente da concentração.

O óleo essencial extraído de folhas e flores de *A. millefolium* L., frente às atividades antibacteriana e antifúngica, apresenta grande potencialidade de exploração e investigação pela indústria farmacêutica para isolamento de princípios ativos de interesse.

As alterações na biossíntese de pigmentos fotossintetizantes geradas pelas mudanças na intensidade e qualidade luminosa geram uma adaptação e vantagem à *A. millefolium* L., a fim de auxiliar no seu desempenho fotossintético, apresentando uma alta plasticidade adaptativa à variação de luz no ambiente.

A qualidade de luz e o processo de aclimação à variação da intensidade luminosa são fatores abióticos que causam estresse oxidativo em *A. millefolium* L., gerando uma variedade de respostas em diferentes níveis e mecanismos de defesa por parte dessa espécie.

Os fatores abióticos, qualidade luminosa e períodos de coleta, geram variações qualitativas e quantitativas dos compostos químicos sintetizados a partir do metabolismo secundário de *A. millefolium* L., realçando que dependendo da relevância do metabólito bioativo alvo, esse pode ser altamente estimulado por um determinado fator ou condição.

ANEXOS

Tabela A. Análise de variância para as variáveis rendimento do óleo essencial extraído de folhas (ROF) e de flores (ROFL) de *Achillea millefolium* L. submetida a níveis de sombreamento e concentrações de nitrogênio

Fontes de Variação ^a	G.L.	Quadrados Médios	
		ROF	ROFL
BLOCO	3	0,0003	0,0008
NDS	1	0,0097*	0,0191
CDN	2	0,0028	0,0290*
NDS x CDN	2	0,0004	0,0003
C.V. (%)		17,34	19,21

(*) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

(^a) NDS = níveis de sombreamento; CDN = concentrações de nitrogênio.

Tabela B. Análise de variância para as variáveis massa seca das folhas (MSF) e massa seca das flores (MSFL) de *Achillea millefolium* L. submetida a períodos de coleta e diferentes condições de luminosidade

Fontes de Variação ^a	G.L.	Quadrados Médios	
		MSF	MSFL
BLOCO	3	115,94	0,57
PDC	1	536,93*	226,01*
CDL	3	2.059,45*	148,18*
PDC x CDL	3	23,31	25,44
C.V. (%)		16,41	25,33

(*) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

(^a) PDC = períodos de coleta; CDL = condições de luminosidade.

Tabela C. Análise de variância para as variáveis clorofila a (Clor_a), clorofila b (Clor_b), clorofila total (Clor_{tot}) e carotenoides (C_{ar}) em *Achillea millefolium* L. submetida a períodos de coleta e diferentes condições de luminosidade

Fontes de Variação ^a	G.L.	Quadrados Médios			
		Clor _a	Clor _b	Clor _{tot}	C _{ar}
BLOCO	3	0,0775	0,0011	0,2019	0,0030
PDC	2	0,1483*	0,0432*	0,3411*	0,0035
CDL	3	0,1912*	0,0483*	0,3720*	0,0013
PDC x CDL	6	0,0268	0,0018	0,0708	0,0014
C.V. (%)		9,98	8,75	12,81	10,69

(*) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

(^a) PDC = períodos de coleta; CDL = condições de luminosidade.

Tabela D. Análise de variância para as variáveis enzima catalase (CAT), enzima ascorbato peroxidase (APX), enzima superóxido dismutase (SOD), enzima glutatona redutase (GR), teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), teor de malondialdeído (MDA), concentração de ascorbato (ASC), concentração de deidroascorbato (DHA) e teor de fenois totais (FT) em *Achillea millefolium* L. submetida a períodos de coleta e diferentes condições de luminosidade

Fontes de Variação ^a	G.L.	Quadrados Médios								
		CAT	APX	SOD	GR	H ₂ O ₂	MDA	ASC	DHA	FT
BLOCO	3	0,000018	0,0809	0,1889	0,0002	0,9898	0,7511	0,0010	0,1775	0,5813
PDC	2	0,00034*	0,1072	9,3598*	0,0268*	5,2188*	72,1927*	0,0844*	1,9070*	63,1368*
CDL	3	0,000085	0,2235*	3,5132*	0,0217*	0,8254*	1,1598	0,1583*	0,5069*	89,9045*
PDC x CDL	6	0,000083	0,0685	1,7253*	0,0212*	0,4144	3,0861*	0,0316*	0,0826	7,2603*
C.V. (%)		23,24	20,68	14,73	24,72	26,41	15,97	20,13	19,98	19,23

(*) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

(^a) PDC = períodos de coleta; CDL = condições de luminosidade.

Tabela E. Análise de variância para as variáveis teor de flavonoides totais em folhas (FTF), teor de flavonoides totais em flores (FTFL), rendimento do óleo essencial de folhas (ROEF) e rendimento do óleo essencial de flores (ROEFL) em *Achillea millefolium* L. submetida a períodos de coleta e diferentes condições de luminosidade

Fontes de Variação ^a	G.L.	Quadrados Médios			
		FTF	FTFL	ROEF	ROEFL
BLOCO	3	0,0504	0,0425	0,0005	0,0009
PDC	1	1,3133*	8,2384*	0,0184*	0,0487*
CDL	3	1,6065*	0,3570*	0,0007*	0,0034*
PDC x CDL	3	1,5004*	0,8909*	0,0012*	0,0032*
C.V. (%)		21,69	17,39	12,30	4,51

(*) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

(^a) PDC = períodos de coleta; CDL = condições de luminosidade.

Tabela F. Análise de variância para as variáveis atividade antioxidante das folhas (AAF) e das flores (AAFL) de *Achillea millefolium* L. pelo método DPPH, submetida a diferentes condições de luminosidade, períodos de coleta e solventes extratores

Fontes de Variação ^a	G.L.	Quadrados Médios	
		AAF	AAFL
BLOCO	3	195,69	92,94
CDL	3	60,11	42,13
SE	3	935,51*	6.427,16*
PDC	1	195,69*	92,94
CDL x SE	9	65,43*	27,56*
PDC x SE	3	6,82*	26,33*
CDL x PDC	3	7,26	74,13
CDL x SE x PDC	9	20,57	23,95
C.V. (%)		16,11	10,03

(*) Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

(^a) CDL = condições de luminosidade; SE = solventes extratores; PDC = períodos de coleta.