



IVAN CALDEIRA ALMEIDA ALVARENGA

**LÂMINAS DE IRRIGAÇÃO E OMISSÃO DE
NUTRIENTES NO CULTIVO *IN VIVO* E LUZ E
TDZ NA MICROPROPAGAÇÃO E
CONSTITUENTES VOLÁTEIS DE *Achillea
millefolium* L.**

LAVRAS - MG

2013

IVAN CALDEIRA ALMEIDA ALVARENGA

**LÂMINAS DE IRRIGAÇÃO E OMISSÃO DE NUTRIENTES NO
CULTIVO *IN VIVO* E LUZ E TDZ NA MICROPROPAGAÇÃO E
CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE *Achillea millefolium* L.**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Jose Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Alvarenga, Ivan Caldeira Almeida.

Lâminas de irrigação e omissão de nutrientes no cultivo *in vivo* e luz e TDZ na micropropagação e constituintes voláteis de *Achillea millefolium* L. / Ivan Caldeira Almeida Alvarenga. – Lavras : UFLA, 2013.

135 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Milfolhas. 3. Irrigação. 4. Nutrição mineral. 5. Cultura de tecidos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.88355

IVAN CALDEIRA ALMEIDA ALVARENGA

**LÂMINAS DE IRRIGAÇÃO E OMISSÃO DE NUTRIENTES NO
CULTIVO *IN VIVO* E LUZ E TDZ NA MICROPROPAGAÇÃO E
CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE *Achillea millefolium* L.**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 19 de agosto de 2013.

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci	UFLA
Dr. Adenilson Henrique Gonçalves	UFLA
Dr. Felipe Campos Figueiredo	IFSMG-Campus Muzambinho
Dr. Ricardo Monteiro Correa	IFMG-Campus Bambuí

PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

LAVRAS - MG
2013

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar e fortalecer nos momentos de dificuldade;

Ao comitê de orientação: Prof. José Eduardo e a Profa. Suzan Bertolucci pelo conhecimento adquirido e confiança no trabalho realizado;

Aos colegas do laboratório de cultura de tecidos e plantas medicinais, principalmente a Sâmia, que me ajudou em todas as partes do projeto;

Aos funcionários Luiz, Dico, Paulo, Léia e Evaldo pela amizade;

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos;

A Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura (DAG).

A minha companheira Fernanda Pacheco pela amizade e paciência;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho;

RESUMO GERAL

As plantas medicinais são importantes fontes de moléculas bioativas e é crescente o interesse em se aperfeiçoar o sistema de cultivo, de modo a se obter respostas produtivas adequadas e viáveis. Para a produção das plantas medicinais, é necessário conhecer como os fatores de cultivo (irrigação, adubação, luz) influenciam no crescimento e na produção dos compostos de interesse. A *Achillea millefolium* L. é uma importante planta medicinal, distribuída por vários países, com propriedades antiinflamatórias, analgésicas, estrogênicas e calmantes cientificamente comprovadas. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar as respostas de crescimento e da produção de compostos voláteis *in vivo* da espécie sob diferentes lâminas de irrigação e elemento faltante, além da influência da intensidade e qualidade de luz e do regulador de crescimento TDZ no cultivo e multiplicação *in vitro*. Em todos os trabalhos foram avaliados o crescimento e a fração volátil. Para as lâminas de irrigação foram aplicadas 55, 110, 220, 440 e 880 mm de água ao longo de 110 dias de cultivo, sendo observado que a lâmina estimada de 606 mm proporcionou o melhor crescimento, havendo diferenças significativas na composição da fração volátil. Para o elemento faltante, foram omitidos os macros (N, P, K, Ca, Mg, S) e os micronutrientes (Fe, B, Zn, Mn, Mo e Cu), sob cultivo em solução nutritiva, por um período de cultivo de 55 dias. Foi observado que o Ca foi o elemento mais limitante para o crescimento e que a omissão de P proporcionou o maior teor de óleo essencial. No cultivo *in vitro* foram avaliadas diferentes intensidades de luz (13,14; 27,79; 35,05; 47,03 e 69,00 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$) e diferentes espectros de luz (azul, vermelho, verde, branca) através de LED (*Light Emitting Diode*) e lâmpada fluorescente branca fria. Os resultados observados indicaram que a o espectro da cor azul ou intensidade de 27,79 $\mu\text{mol. m}^2. \text{s}^{-1}$ e proporcionaram melhores taxas de sobrevivência, enraizamento e produção de matéria seca total. Com relação ao regulador TDZ, foram testadas as concentrações de 0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg.L^{-1} , onde foi observado que a concentração de 0,25 mg.L^{-1} se mostrou mais adequada para a multiplicação *in vitro*. Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas identificaram em todos os experimentos os constituintes sabineno, 1,8cineol, borneol, β -cariofileno e β -cubebeno. Assim, o trabalho contribui com informações importantes sobre o cultivo *in vitro* e *in vivo* da espécie, bem como as alterações químicas ocorridas na fração volátil e no óleo essencial.

Palavras-chave: Milfolhas. Composição volátil. Plantas medicinais. Cultivo. *Headspace*-CG/EM.

GENERAL ABSTRACT

Medicinal plants are important sources of bioactive molecules and a growing interest in optimizing the cultivation system, in order to obtain productive responses appropriate and feasible. For the production of medicinal plants, it is necessary to know how the factors of cultivation (irrigation, fertilization, light) influence on the growth and production of the compounds of interest. The *Achillea millefolium* L. is an important medicinal plant, distributed in many countries, with anti-inflammatory properties, analgesic, soothing estrogenic and scientifically proven. The objective of the study was to evaluate growth responses and the production of volatile compounds *in vivo* species under different irrigation and missing element, beyond the influence of the intensity and quality of light and growth regulator TDZ in cultivation and multiplication *in vitro*. In all studies were evaluated growth and volatile fraction. For irrigation were applied 55, 110, 220, 440 and 880 mm of water over 110 days of cultivation, being observed that the blade estimated 606 mm provided the best growth, significant differences in the composition of the volatile fraction. For the missing element, are omitted macros (N, P, K, Ca, Mg, and S) and micronutrients (Fe, B, Zn, Mn, Mo and Cu), grown under nutrient solution for a period of cultivation 55 days. It was observed that Ca was the most limiting element for growth and that the omission of P provided the highest essential oil content. *In vitro* cultures were evaluated different light intensities (13.14; 27.79; 35.05; 47.03 and 69.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and different spectrums of light (blue, red, green, white) using LED (Light Emitting Diode) and cool white fluorescent lamps. The results observed showed that the spectrum of blue color or intensity of 27.79 $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ provided better survival rates, rooting and total dry matter production, better survival rates, rooting and total dry matter production. With regard to regulator TDZ were tested at concentrations of 0.0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, where it was observed that concentration of 0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was more suitable for *in vitro* propagation. Gas chromatography coupled to mass spectrometry identified in all experiments constituents sabinene, 1,8 cineole, borneol, β -caryophyllene and β -cubebene. Thus, the work contributes important information on the *in vitro* and *in vivo* of the species, as well as the chemical changes occurring in the volatile fraction and essential oil.

Keywords: Yarrow. Volatile composition. Medicinal plants. Cultivation. *Headspace*-GC/ME.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Ilustração botânica de *Achillea millefolium* L. Fonte: On line 1..... 16
- Figura 2 Compostos majoritários do óleo essencial de *A. millefolium* L. sabineno (A); 1,8 cineol (B); borneol (C); β -cariofileno (D); β -cubebeno (E); camazuleno (F). Fonte: (A, B, C, D, E):BARROS et al. 2009; (F): On line 2 17

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Aspecto geral das plantas de *Achillea millefolium* L. sobre omissão de macronutrientes. Lavras, 2013. Fonte: Arquivo pessoal..... 69
- Figura 2 Aspecto geral das plantas de *Achillea millefolium* L. sobre omissão de micronutrientes. Lavras, 2013. Fonte: Arquivo pessoal. 80

CAPÍTULO 4

- Figura 1 Plantas matrizes de *A. millefolium* cultivadas em areia sob sistema de fertirrigação. Lavras, 2013. Fonte: Arquivo pessoal..... 99
- Figura 2 A-Múltiplas brotações de *A. millefolium* L. cultivadas durante 30 dias em MS+ 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ. B-Explante utilizado para os experimentos..... 101
- Figura 3 Plântulas de *A. millefolium* L.cultivadas em meio MS por 45 dias, sob diferentes LEDs. A-Espectro vermelho, B- Espectro Azul, C- Espectro branco, D-Espectro verde, E-Lâmpada fluorescente branca. 107
- Figura 4 Plântulas de *A. millefolium* cultivadas em meio MS por 45 dias, sob diferentes intensidades de luz. Lavras, 2013 114
- Figura 5 Aspecto geral das plantas cultivadas por 45 em meio MS, adicionados ao regulador de crescimento Thidiazuron em diferentes concentrações. Lavras, 2013..... 122

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2

- Gráfico 1 Produção de *Achillea millefolium* L. cultivada com a aplicação de diferentes lâminas de irrigação. A-Massa seca da parte aérea (MSPA); B-Massa seca das raízes (MSR); C- Massa seca do caule (MSC); D-Massa seca total (MST). Lavras, 2013..... 46
- Gráfico 2 Variáveis de crescimento de *Achillea millefolium* L. cultivada com a aplicação de diferentes lâminas de irrigação. A-Diâmetro do caule; B- número de folhas; C- comprimento de raiz; D- Número de brotações. Lavras, 2013 47
- Gráfico 3 Concentrações de pigmentos fotossintéticos de *Achillea millefolium* L. cultivada com a aplicação de diferentes lâminas de irrigação. A- clorofila a; B- clorofila b; C-carotenoides; D- clorofila total. Lavras, 2013 48
- Gráfico 4 Compostos majoritários de *Achillea millefolium* L. cultivados sob diferentes lâminas de irrigação correspondentes aos mesmos constituintes químicos. Desvio padrão ($n = 2$)..... 53

CAPÍTULO 4

- Gráfico 1 Espectros de luz utilizados para o experimento. A- LED espectro azul, B- LED espectro vermelho, C- LED espectro verde, D- LED espectro branco, E-lâmpada fluorescente branca fria. Lavras 2013..... 102
- Gráfico 2 Caracterização das brotações de *A. millefolium* cultivadas em diferentes concentrações de TDZ..... 120

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Valores máximos estimados para as lâminas aplicadas e para a produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca das raízes (MSR), matéria seca do caule (MSC) e matéria seca total (MST). Lavras, 2013	45
Tabela 2	Valores mínimos estimados para a lâmina aplicada de 606,07 mm e para os teores de clorofila a, clorofila b, carotenóides e clorofila total. Lavras, 2013.....	49
Tabela 3	Constituintes voláteis de <i>Achillea millefolium</i> L. cultivados com a aplicação de diferentes lâminas de irrigação. Lavras, 2013.....	51

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Crescimento e produção de óleo e matéria seca de <i>Achillea millefolium</i> L. cultivadas em solução nutritiva com omissão de macronutrientes. Lavras, 2013.....	68
Tabela 2	Teores de clorofilas a, b e carotenóides de <i>Achillea millefolium</i> L. cultivadas em solução nutritiva com omissão de macronutrientes. Lavras, 2013	71
Tabela 3	Compostos voláteis de <i>Achillea millefolium</i> L. cultivados em solução nutritiva com omissão de macronutrientes. Lavras, 2013..	73
Tabela 4	Efeito da omissão de macronutrientes no teor de óleo e nos constituintes voláteis majoritários de <i>A. millefolium</i> L. cultivados em solução nutritiva. Lavras, 2013	75
Tabela 5	Crescimento e produção de óleo e matéria seca de <i>Achillea millefolium</i> L. cultivadas em solução nutritiva com omissão de micronutrientes. Lavras, 2013	79
Tabela 6	Teores de clorofilas a, b e carotenóides de <i>Achillea millefolium</i> L. cultivadas em solução nutritiva com omissão de micronutrientes. Lavras, 2013	81
Tabela 7	Compostos voláteis de <i>Achillea millefolium</i> L. cultivados em solução nutritiva com omissão de micronutrientes. Lavras, 2013 ..	83
Tabela 8	Efeito da omissão de micronutrientes na produção dos compostos voláteis majoritários de <i>A. millefolium</i> L. cultivados em solução nutritiva. Lavras, 2013	85

CAPÍTULO 4

Tabela 1	Crescimento <i>in vitro</i> de <i>A. millefolium</i> , cultivadas em meio MS, sob diferentes espectros de luz, durante período de 45 dias. Lavras 2013.	106
Tabela 2	Pigmentos fotossintéticos de <i>A. millefolium</i> L. cultivadas em meio MS, sob diferentes espectros de luz, durante período de 45 dias. Lavras 2013	108
Tabela 3	Constituintes voláteis de <i>Achillea millefolium</i> L. em cultivo <i>in vitro</i> sobre diferentes espectros de luz, por 45 dias. Lavras, 2013	110
Tabela 4	Compostos majoritários de <i>A. millefolium</i> L. cultivada <i>in vitro</i> sob diferentes espectros de luz. Lavras, 2013.....	112
Tabela 5	Crescimento <i>in vitro</i> de <i>A. millefolium</i> L. cultivadas em meio MS, sob diferentes intensidades de luz durante um período de 45 dias. Lavras 2013	113
Tabela 6	Pigmentos fotossintéticos de <i>A. millefolium</i> L. cultivadas em meio MS, sob diferentes intensidades de luz, durante período de 45 dias. Lavras 2013	115
Tabela 7	Compostos voláteis de <i>Achillea millefolium</i> L. em cultivo <i>in vitro</i> sobre diferentes intensidades de luz, por 45 dias. Lavras, 2013.....	117
Tabela 8	Compostos majoritários de <i>A. millefolium</i> L. cultivada <i>in vitro</i> sob diferentes intensidades de luz por 45 dias. Lavras, 2013	119
Tabela 9	Compostos voláteis de <i>Achillea millefolium</i> L. em cultivo <i>in vitro</i> sobre diferentes concentrações de Thiadizuron (TDZ) por 45 e plantas em meio MS por 30 e 75 dias. Lavras, 2013.	124
Tabela 10	Compostos majoritários de <i>A. millefolium</i> cultivadas em meio MS com a adição de Thidiazuron. Lavras, 2013.....	126

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Caracterização da espécie	15
2.2	Composição química volátil	17
3	NUTRIÇÃO MINERAL NO CULTIVO DE PLANTAS MEDICINAIS	19
4	IRRIGAÇÃO NO CULTIVO DE PLANTAS MEDICINAIS	20
5	CULTIVO <i>IN VITRO</i>	22
6	LUZ NO CULTIVO <i>IN VITRO</i>	24
7	THIDIAZURON (TDZ)	25
	REFERÊNCIAS	27
	CAPÍTULO 2 Lâminas de irrigação no crescimento e constituintes voláteis de <i>Achillea millefolium</i> L.	37
1	INTRODUÇÃO	39
2	MATERIAL E MÉTODOS	41
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	CAPÍTULO 3 Crescimento e produção de compostos voláteis de <i>Achillea millefolium</i> L. cultivada em solução nutritiva com omissão de macro e micronutrientes	61
1	INTRODUÇÃO	63
2	MATERIAL E MÉTODOS	65
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.1	Macronutrientes	68
3.1.1	Crescimento e pigmentos fotossintéticos	68
3.1.2	Teor de óleo essencial e análise dos compostos voláteis	71
3.2	Micronutrientes	78
3.2.1	Crescimento e pigmentos fotossintéticos	78
3.2.2	Teor de óleo essencial e análise dos compostos voláteis	82
4	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	90
	CAPÍTULO 4 Efeito da qualidade e intensidade luz e tdz no crescimento, multiplicação e produção de constituintes voláteis de <i>Achillea millefolium</i> L. cultivada <i>in vitro</i>.	96
1	INTRODUÇÃO	98
2	MATERIAL E MÉTODOS	99

2.1	Qualidades de Luz.....	101
2.2	Intensidades de Luz.....	102
2.3	Concentrações de TDZ.....	103
2.4	Análises dos compostos voláteis	104
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
3.1	Qualidades de luz.....	106
3.1.1	Crescimento	106
3.1.2	Compostos voláteis	109
3.2	Intensidades de Luz.....	113
3.2.1	Crescimento	113
3.2.2	Compostos voláteis	116
3.3	Diferentes concentrações de TDZ	120
3.3.1	Multiplificação	120
3.3.2	Constituintes voláteis.....	123
4	CONCLUSÕES	128
	REFERÊNCIAS	129
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	134

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia tem ganhado relevância na medicina, principalmente por serem comprovadas as propriedades medicinais que lhes eram atribuídas pelo conhecimento popular. Além disso, a busca por alternativas aos medicamentos sintéticos e consequente demanda por produtos naturais, elevou a importância das plantas medicinais na agricultura.

As plantas medicinais são importantes produtoras de moléculas bioativas, sendo que vários fatores interferem na produção desses compostos, como tipo de metabólito produzido (alcaloides, terpenoides, flavonoides, taninos, etc.) parte produtora ou acumuladora (folhas, tricomas, raízes, inflorescências, sementes) idade da planta, sazonalidade, altitude e latitude. Além desses fatores, o manejo do cultivo também interfere nos processos de síntese dessas moléculas, como a adubação, irrigação, poda e aplicação de elicitores (SRIVASTAVA; LAL 2012).

Uma alternativa ao cultivo tradicional seria o cultivo *in vitro*, tendo como principais vantagens a produção em larga escala e o controle do processo produtivo, independente dos fatores climáticos e edáficos. O cultivo *in vitro* das plantas medicinais pode ser utilizado para a produção de moléculas ativas, sendo necessário adequar fatores como o meio de cultivo, regime de luz, qualidade e intensidade de luz e a ação dos reguladores de crescimento, fatores que maximizam a produção dos metabólitos (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005).

A *Achillea millefolium* L. é uma importante planta medicinal distribuída por todo mundo e apresenta princípios ativos importantes como flavonoides e

óleo essencial, presentes nas folhas e inflorescências. É utilizada para tratar os sintomas de gripe, como analgésica, antioxidante, antiinflamatória, calmante, entre outras propriedades comprovadas cientificamente.

Por apresentar compostos de interesse e propriedades medicinais importantes, os estudos do cultivo em campo e *in vitro* são necessários, pois, conhecendo as respostas de crescimento e produção dos princípios ativos, podem-se obter maiores produções com qualidade da matéria prima.

Assim, o trabalho avaliou o crescimento e a produção de constituintes voláteis de *Achillea millefolium* L. sob diferentes lâminas de água e omissão de nutrientes e, *in vitro*, a influência da intensidade e qualidade de luz e do regulador Thidiazuron (TDZ).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da espécie

A *Achillea millefolium* L., também conhecida como milfolhas, milefólio, mil em rama, erva dos carpinteiros, novalgina, entre outros nomes populares, pertence à família das Asteraceae. É originária do continente Europeu e da Ásia Ocidental, se adaptou bem as de cultivo em varias regiões do mundo, como Índia, Irã, Estados Unidos e Brasil, estando distribuída por praticamente todo o mundo (LOPEZ-LAZARO 2009).

É uma planta herbácea perene, apresentando de 20 a 60 cm de altura, apresentando folhas bem subdivididas e aromáticas, crescimento estolonífero e suas inflorescências são de coloração branca, sendo propagada pela divisão dos estolões ou sementes (Figura 1). É utilizada na medicina popular para a dispepsia, inflamações, febre, cólicas, como analgésica e antioxidante (LORENZI; MATOS , 2006).

A milfolhas é considerada medicinal desde muito tempo, havendo indícios de sua utilização pelo homem primitivo de cerca de 60 000 anos atrás (THOMSON, 1978). Estudos científicos confirmam seus usos tradicionais como analgésica, antioxidante, antiulcerogênico, colerética, anti-inflamatória, gastroprotetora, antifibrogênica e estrogênica (MISTIERI et al., 2001, BAGGIO et al., 2002; KONYALIOGLUA e KARAMENDERES 2005; BENEDECK et al., 2006; INNOCENTI et al., 2007; POTRICH et al. 2010; BURK.; CICHACZ.; DASKALOVA, 2010, 2010; HEMATTI et al., 2011).

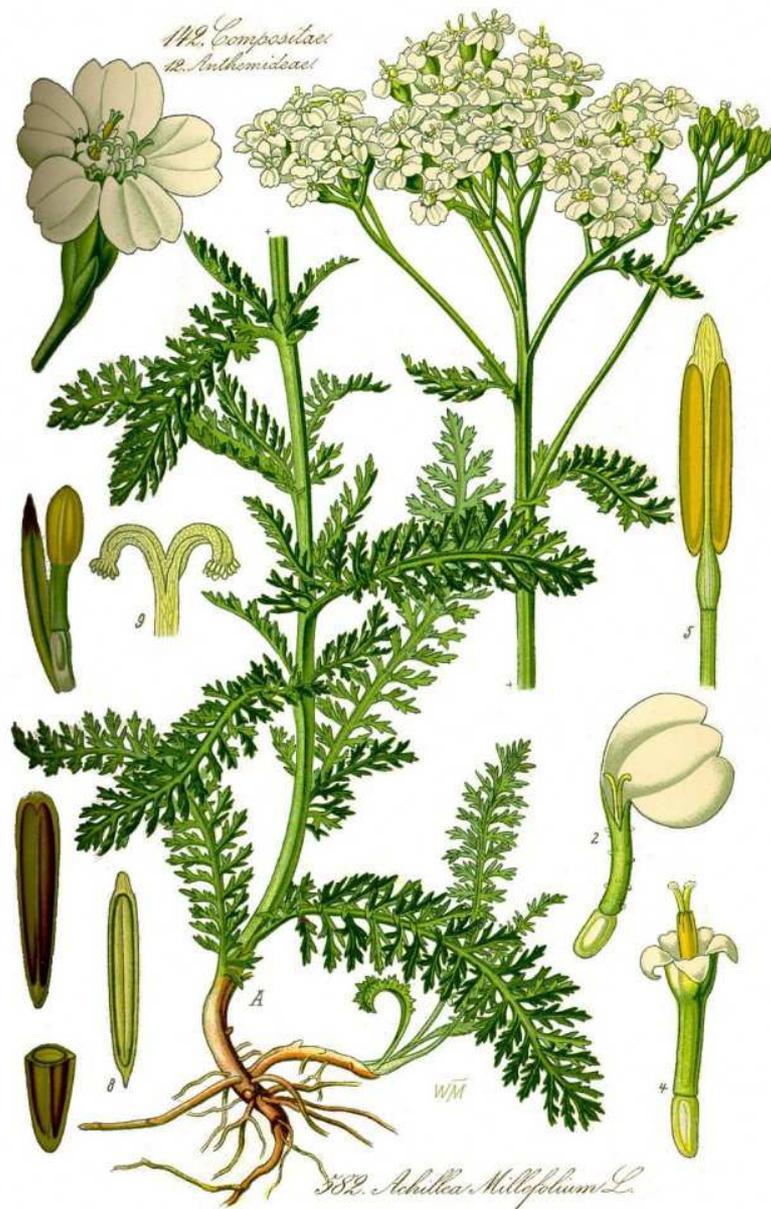


Figura 1 Ilustração botânica de *Achillea millefolium* L. Fonte: On line 1

2.2 Composição química volátil

A fração volátil da *A. millefolium* é composta majoritariamente por monoterpenos (30-80%), sesquiterpenos (8-62%) e em menor quantidade por outros compostos (1-3%), como álcoois, ésteres, aldeídos e norcarotenóides, sendo identificado em seu óleo essencial mais de 140 compostos terpenicos, o que demonstra a grande complexidade dos estudos relacionados com a espécie (KINDLOVITS; NÉMETH, 2012).

Quantitativamente, os constituintes mais importantes (Figura2) do óleo essencial são o sabineno, 1,8 cineol, borneol, β -cariofileno, β -cubebeno, e camazuleno, que confere ao óleo extraído por hidrodestilação, uma coloração azul típica (ROHLOFF et al., 2000; RAHIMMALEK et al., 2009, NADIM et al., 2011).

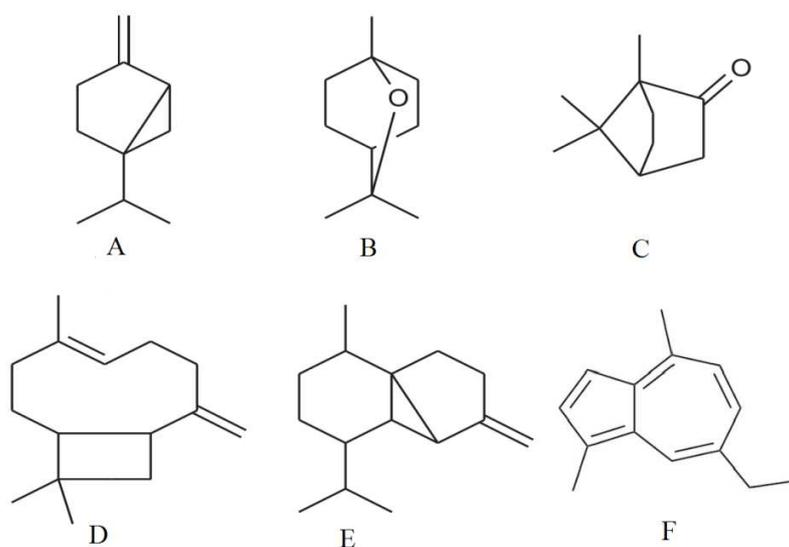


Figura 2 Compostos majoritários do óleo essencial de *A. millefolium* L. sabineno (A); 1,8 cineol (B); borneol (C); β -cariofileno (D); β -cubebeno (E); camazuleno (F). Fonte: (A, B, C, D, E):BARROS et al. 2009; (F): On line 2

O sabineno é um monoterpene responsável por características aromáticas nas plantas e presentes em outras espécies como pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), zimbro (*Juniperus communis* L.) e noz-moscada (*Myristica fragrans* Houtt.) (NOVAK et al., 2002; ROSSATO et al., 2006; DEWIK, 2009).

O 1,8 cineol, conhecido também como eucaliptol é encontrado em diversas espécies medicinais, sendo comprovados seus efeitos sobre o sistema respiratório, imunológico e gastrointestinal (SCELZA et al., 2006, NEVES et al., 2007).

O borneol está presente nos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), sálvia (*Salvia officinalis* L.), valeriana (*Valeriana officinalis* L.) e camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e essas espécies são utilizadas para o tratamento de dor abdominal, para aplicação em ferimentos, queimaduras, para aliviar dores reumáticas, hemorroidas, doenças da pele, ulcerações na boca, ouvidos, olhos ou nariz e na aromaterapia (XIAO-FEI et al., 2008; HORVÁTHOVÁ et al., 2009).

O composto β -cariofileno é um sesquiterpene responsável pelas propriedades medicinais anti-inflamatórias de espécies medicinais, estando presente em óleos de espécies como o de copaíba (*Copaifera* spp.) e o de sementes de cenoura (*Daucus carota* L.), e em compostos voláteis de tomilho (*Thymus* spp), cravo (*Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston), patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) e senécio (*Senecio bonariensis* Hook. & Arn.) (SILVA et al., 2010; GELMINI et al., 2012; BHUIYAN et al., 2013; HUSSAIN et al., 2013).

O β -cubebeno é um sesquiterpene, citado como possível responsável por atividades anti-inflamatória, antimicrobianas, inseticidas e nematicidas, sendo observada sua presença em plantas do gênero *Bacharis*, *Hymenae* e *Ocimum*

(TAMAYO et al., 2008, FLORAO et al., 2012, BIASI et al., 2009, SOSA et al., 2012).

O camazuleno é um sesquiterpeno originário da transformação da matricina, através do processo de hidrodestilação, e são conferidas a ele propriedades bactericidas, fungicidas e anti-inflamatórias, além de ser antioxidante, principalmente de lipídios. Está presente em espécies como a camomila (*Matricaria recutita* L.); artemisia (*Artemisia arborescens* L.) tanacetum (*Tanacetum gracile* Hook.), e também no gênero *Achillea* (SASHIDHARA, 2006; VERMA et al., 2008; RAAL et al., 2012).

Os compostos majoritários presentes na *Achillea millefolium* L. são citados em outras espécies com propriedades medicinais semelhantes, assim, por apresentar compostos importantes em seu óleo essencial, os estudos devem relacionar o manejo do cultivo (*in vivo* e *in vitro*) com as produções dos compostos de interesses.

3 NUTRIÇÃO MINERAL NO CULTIVO DE PLANTAS MEDICINAIS

As exigências nutricionais em plantas medicinais ainda são pouco estudadas, principalmente quando se relaciona quais elementos limitam seu crescimento e como eles afetam a produção dos metabólicos secundários. Alguns estudos indicam que a fertilização química promove maiores produtividades de matéria seca, porém pode haver decréscimo dos teores de princípios ativos (CORRÊA JUNIOR; MING; SCHEFFER, 1991; SOUZA et al., 2007).

Para a *Achillea collina* Lam., foram avaliadas a omissão de nitrogênio e a produção de compostos fenólicos, sendo observado maior teor desses compostos no tratamento com a omissão desse elemento, a mesma resposta foi

observada para camomila (*Matricaria chamomilla* L.) para a produção de cumarinas (KOVÁČIK et al. 2007; GIORGI et al. 2009).

Em menta (*Mentha piperita*) cultivada em solução nutritiva, a proporção ideal de P e N foi a de 60 mg.L⁻¹ de P e 4 mg.L⁻¹ de N, sendo observado a diminuição gradual no rendimento de óleo essencial ao longo do período de cultivo, além de uma relação inversa entre o aumento da matéria seca e o teor de óleo essencial (SOUZA et al., 2007).

Para a vernonia (*Vernonia herbacea* Veil.) a melhor produção de frutanos foi observada na solução nutritiva com concentrações inferiores de N, P, Ca, Mg e S aos demais tratamentos (solução de Hougland e Arnon). Em insulina vegetal (*Cissus sicyoides* L.) a produção de mucilagem respondeu positivamente as doses de N, sendo a melhor interação observada para a menor dosagem de fósforo avaliada (CUZZUOL et al., 2005; ABREU et al., 2002).

Araújo (2007) avaliou a nutrição mineral em erva baleeira (*Cordia verbenaceae* DC.) e observou que o incremento de P e N aumentaram o rendimento de óleo, mas para o fósforo, houve diferença significativa para os teores de α -humuleno.

Assim, cada espécie apresenta necessidades específicas dos nutrientes, que variam de acordo com o crescimento e o metabolismo do princípio ativo produzido.

4 IRRIGAÇÃO NO CULTIVO DE PLANTAS MEDICINAIS

Entre os fatores que afetam a produção dos princípios ativos, a disponibilidade hídrica interfere diretamente no metabolismo primário e consequentemente no secundário, dessa maneira, o manejo adequado do fornecimento de água pode ser uma importante ferramenta no cultivo de plantas medicinais (KHAZAIE, et al 2008).

A água tem importante papel em numerosas reações metabólicas e na sua falta, aspectos como o crescimento e desenvolvimento são afetados. Diversos processos fisiológicos e bioquímicos, tais como a trocas gasosas, metabolismo dos carboidratos, aminoácidos e outros compostos orgânicos, são alterados pela deficiência hídrica (ŠIRCELJ et al., 2005; PAGTER et al., 2005).

Meira et al. (2013) avaliaram o fornecimento de diferentes lâminas de irrigação para melissa (*Melissa officinalis* L.) e observaram que a planta cresceu em matéria fresca proporcionalmente ao fornecimento hídrico, porém, quando avaliados os teores de óleo essencial, o decréscimo também foi proporcional.

Já para alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) as produções de óleo e de matéria seca foram influenciadas positivamente pelo fornecimento hídrico e em outro trabalho com a espécie, foi avaliado o estresse hídrico antes da colheita e foi observado que no período de 8 dias sem irrigação, a planta não apresentou alterações significativas no teor de óleo essencial (ALVARENGA et al., 2011; LOPES et al., 2011).

Outros trabalhos sobre a influência da disponibilidade hídrica foram realizados em alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.), manjerição (*Ocimum basilicum* L.), sambacatiá (*Hyptis pectinata* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e calêndula (*Calendula officinalis* L.) sendo observado que as plantas medicinais apresentam comportamentos distintos com relação ao estresse hídrico (SANTOS et al., 2004; COSTA FILHO et al., 2006; PRAVUSCHI et al., 2010; MARQUES et al., 2009; BORTOLO.; MARQUES; PACHECO, 2009).

Assim, como a resposta ao fornecimento de água é variável com a espécie, devem-se realizar estudos que considerem as produções em matéria seca e princípios ativos, obtendo-se então um equilíbrio entre esses dois parâmetros.

5 CULTIVO *IN VITRO*

A cultura de tecidos em plantas medicinais permite um cultivo independente de fatores climáticos e edáficos, facilitando a multiplicação e obtenção de matéria prima de qualidade, livre de contaminações, permite a clonagem de genótipos superiores, conservação de germoplasma; auxilia a engenharia genética e a otimização da produção de metabólitos de interesse, economizando trabalho e custos (VANISREE et al., 2004; MORAIS et al., 2012).

Culturas de células apresentam vantagens como reprodutibilidade, direcionamento para produção de substâncias de interesse, facilidade de isolamento de compostos e possibilidade de produção em grande escala, já o isolamento de compostos bioativos de plantas obtidas por extrativismo ou cultivo em campo pode ser trabalhoso e representa um obstáculo para os estudos farmacêuticos ou aplicações industriais (NITZSCHE et al., 2004).

Em hortelã-japonesa (*Mentha arvensis* L.), Arrigoni-Blank et al. (2011) avaliaram a micropropagação da espécie através de diferentes explantes, reguladores de crescimento, genótipos e substratos para aclimatização, além da composição do óleo essencial, sendo observadas diferenças significativas entre os parâmetros avaliados, porém, não houve diferença nos teores do óleo essencial das plantas micropropagadas. A produção *in vitro* de metabólitos foi avaliada em hipérico (*Hipericum brasiliense* Choisy.) através de elicitores e foi observado que aumentos de conteúdo de quercetina com o tratamento como aumento do fornecimento de boro (CARDOSO; OLIVEIRA 1996).

Arikat et al. (2004), comparando o rendimento de óleo essencial de plantas *in vivo* e *in vitro* de sálvia (*Salvia fruticosa* Mill.), observaram que as plântulas *in vitro* apresentaram maior rendimento em relação às plantas *in vivo* e que os

constituintes majoritários detectados no óleo das plantas *in vivo* e *in vitro* foram similares, sendo eles: α -pireno, 1,8-cineol, cânfora e borneol.

Trabalhando com cultura de anteras de nim (*Azidarachta indica* A.Juss), Srivastava e Chatuverdi (2011) concluíram que a técnica permite uma produção controlada de azidaractina, com maiores teores nos calos indiferenciados (728,41 mg.g.ms⁻¹) do que nos que foram regenerados.

O estudo realizado por Ali et al., 2011 determinou para a espécie *Gymnema sylvestre* (R. Br) fatores como fotoperíodo, sacarose e qualidade de luz na produção *in vitro* de ácido gimnêmico. Os maiores teores foram observados com a concentração de sacarose a 5% (35,4 mg. g.ms⁻¹), fotoperíodo de 12hs (26,86 mg.g.ms⁻¹) e espectro na cor azul (58,28 mg. g.ms⁻¹), o que indica a influencia de fatores físicos na produção dos metabólicos secundários *in vitro*.

Reis et al. (2009) avaliando diferentes meios de cultura para melissa (*Melissa officinalis* L.) observaram que os meios MS e MS/4 promoveram a formação de plântulas com maior teor de óleo essencial e também promoveu a alterações no componente majoritário do óleo, sendo o neral e geranial e o acetato de nerila no meio MS/2.

Para *Achillea millefolium* L. são relatados alguns trabalhos importantes com culturas de tecidos, como o trabalho realizado por Figueiredo e Pais (1991) que conseguiram estabelecer condições de cultivo para suspensão de células da espécie, recomendando para essa técnica um inoculo de 70g de células, obtidas de calos friáveis em meio B5, suplementado com 1,5 mg de 2,4 D/0,1 mg. L⁻¹ de cinetina e 2% de sacarose, no escuro.

Complementando esse estudo, Figueiredo et al. (1996) conseguiram a transformação de monoterpenos em sesquiterpenos, utilizando a cultura de células de milfolhas. Outro avanço no cultivo *in vitro* da espécie, foi a cultura de radículas, que apresentou diferenças dos constituintes entre as plantas cultivadas em campo (LOURENÇO et al., 1999).

Em trabalho com a mesma espécie, Turker et al. (2009) avaliou a influência dos reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* da aquiléia e observaram que as combinações de 5mg. de CIN + 1 mg de AIB e 3,0BAP +0,5 de AIA promoveram maiores números de brotações, além da formação de calos em concentrações de TDZ acima de 0,5 mg L⁻¹.

A manipulação dos meios de cultura, reguladores de crescimento, regimes de luz e temperatura devem favorecer além da propagação vegetativa, a produção de compostos de interesse.

6 LUZ NO CULTIVO *IN VITRO*

A luz participa ativamente nos processos metabólicos das plantas e no cultivo *in vitro*, é uma importante ferramenta para produção de compostos de interesse, visto que podemos alterar a qualidade de luz (diferentes comprimentos de onda), intensidade ou irradiâncias (fluxo de fótons) e o regime (fotoperíodo) (RAMAKRISHNA e RAVISHANKAR, 2011; SÁEZ et al., 2013).

Como exemplos, podemos citar que para produção de gingerol e zingibereno, em cultura de calos em gengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) foram observados somente nos tratamentos com a presença de luz. O aumento da intensidade de luz favoreceu os níveis de tanino e glicosídeos fenólicos em folhas de salgueiro *Salix* spp, mesma resposta foi observada para cultura de raízes de artemisia (*Artemisia annua* L.) para a produção de artemisina. O taxol e a baccatina III tiveram maior acúmulo sob influência de luz branca, em culturas de células de *Taxus cuspidata* (Sieb. et Zucc.) (LARSSONS et al., 1986; FETT NETO; PENNINGTON; DI COSMO, 1995; LIU et al., 2002; ANASORI e ASGHARI, 2008).

A radiação UV-B aumentou a concentração de flavonóides em abeto (*Picea abies* L.) e em beijo (*Catharanthus roseus* L.) incrementou a produção de

vimblastina e vincristina, que são compostos eficazes no tratamento de leucemia (FISHCHBACH et al., 1999; BINDER et al., 2009).

Assim, os trabalhos confirmam a influencia da luz no metabolismo secundário, sendo importante fator a ser avaliado no cultivo *in vitro* de planta medicinais.

7 THIDIAZURON (TDZ)

O Thidiazuron (TDZ) é uma fenil-ureia (N-fenil-1, 2, 3-thidiazol-5-ilureia) que apresenta características análogas aos das citocininas quando presentes nos meios de cultura, sendo muito importante na cultura de tecidos com regulador de crescimento. O TDZ promove a emissão de múltiplas brotações, perda da dominância apical, regeneração e formação de calos, quando combinados com outros reguladores (FLORES; NICOLOSO; MALDANER, 2007; SILVA et al., 2003).

O regulador se mostrou eficiente na multiplicação de várias espécies medicinais, como em *Scilla natalensis* Planch. onde o regulador sozinho promoveu o maior numero de brotações e maiores respostas do que quando combinado com AIA; em *Tylophora indica* Merrill, o regulador promoveu o maior comprimento de brotações; em estudos de organogênese em *Hypericum perforatum* L. também foi observado uma maior resposta, quando comparados com outros reguladores (MCCARTAN e VAN STADEN, 1998; THOMAS; PHILIP, 2005; THOMAS; MASEENA, 2006; MURCH et al., 2000; LIU et al., 2003).

O tempo de exposição ao regulador também deve ser verificado, pois a exposição por períodos maiores que 25 dias pode provocar hiperidricidade, além de perdas do efeito do regulador, como foi verificado em *Artemisia judaica* L.,

sendo observado que um tempo superior a 30 dias houve diminuição do número de explantes (LIU et al., 2003).

Os estudos com o TDZ são, na maioria dos casos, relacionados a multiplicação e a regeneração, no entanto, os trabalhos não relacionam a influência desse regulador na produção de metabólicos secundários.

REFERÊNCIAS

ABREU, I.N. et al. Nitrogênio e fósforo na produção vegetal e na indução de mucilagem em plantas de insulina. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 536-540, dez. 2002.

ALI, A. A. B. et al. Production of Gymnemic acid depends on medium, explants, PGRs, color lights, temperature, photoperiod, and sucrose sources in batch culture of *Gymnema sylvestre*. **The Scientific World Journal**, New York, n. 2, May 2012. doi: 10.1100/2012/897867.

ALVARENGA, I.C.A. et al. Water stress before harvest of pepper-rosmarin. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 7, p. 706-711, jul. 2011.

ANASORI, P.; ASGHARI, G. Effects of light and differentiation on gingerol and zingiberene production in callus culture of *Zingiber officinale* Rosc. **Research in Pharmacy Science**. Jos, v. 3, n.1, p. 3:59-63, 2008

ARAÚJO, J.S. Desenvolvimento vegetal, produção e composição química do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) em função do fornecimento de N, P, K e B e da aplicação de ácido jasmônico. 2007. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade de Campinas, Campinas, 2007.

ARIKAT, N. A. et al. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 100, n. 1, p. 193-202, 2004.

ARRIGONI-BLANK, M.F. et al. Micropropagação, aclimatização, teor e composição química do óleo essencial de genótipos de hortelã japonesa. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 175-184, 2011.

BAGGIO, C.H. et al. Action of crude aqueous extract of leaves of *Achillea millefolium* L. (Compositae) on gastro-intestinal tract. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 12, p. 31-33, 2002. Suplemento.

BARROS, F. M. C. D. et al. Seasonal variability and terpenoid biosynthesis of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 861-867, jul. 2009.

BENEDECK, B. et al. Choleric effects of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in the isolated perfused rat liver. **Phytomedicine**. Jena, v.13, n. 9-10, p.702-706, Nov. 2006.

BHUIYAN, M, N, I. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzigium caryophyllatum* (L.) Alston). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Nairobi, v.6, n.16, p.1260-1263, Apr. 2012.

BIASI, L.A. et al. Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca quimiotipo eugenol. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.27, n.1 p.35-39, jan. 2009.

BINDER, B. Y. et al. The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots. **Biotechnology Progress**, Washington, v.25, n. 3, p.8615, May/June 2009.

BORTOLO, D.P.G.; MARQUES, P.A.A.; PACHECO, A. C. Teor e rendimento de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Jaboticabal, v. 11, n. 4, p. 435-441, 2009.

BURK, D.R.; CICHACZ, Z.A.; DASKALOVA, S. M. Aqueous extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) inflorescences suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairobi, v. 4, n.3, p. 225-234, Feb. 2010.

CARDOSO, M. A.; OLIVEIRA, D. E. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: Shoot multiplication and callus induction. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 91-94, 1996.

CORRÊA JUNIOR, C; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba: EMATER-PR, 1991. 151p.

COSTA FILHO, L. O.; ENCARNAÇÃO, C.R.F.; OLIVEIRA, A.F.M. Influência hídrica e térmica e desenvolvimento de *Ocimum gratissimum* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.8, n.2, p.8-13, 2006.

CUZZUOL, G.R.F. et al. Soluções nutritivas para cultivo e produção de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 9, p. 911-917, set. 2005.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. Hoboken: J. Wiley, 2009.

FETT NETO, A.G.; PENNINGTON, J.J.; DI COSMO, F. Effect of white light on taxol and baccatin III accumulation in cell cultures of *Taxus cuspidate* and Zucc. Sieb and Zucc. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 146, n. 5-6, p. 584-590, Sept. 1995.

FIGUEIREDO, A. C. S.; PAIS, M. S. S. *Achillea millefolium* (Yarrow) cell suspension cultures: establishment and growth conditions. **Biotechnology Letters**, London, v. 13, n. 1, p. 63-68, Jan. 1991.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Biotransformation of monoterpenes and sesquiterpenes by cell suspension cultures of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*. **Biotechnology Letters**, London, v. 18, n. 8, p. 863-868, Aug. 1996.

FLORAO, A. et al. Essential oils from *Bacharis* species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. **Journal of Essential Oil Research**, Philadelphia, v. 24, n. 6, p. 561-570, 2012.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando thidiazuron. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2007.

GELMINI, F. et al. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary *in vivo* evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v 440, n.2, p.170-178, 2012.

GIORGI, A. et al. Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). **Food Chemistry**, Oxford, v. 114, n. 1, p. 204-211, Jan. 2009.

HORVÁTHOVÁ, E. et al. Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.47,n.6, p.1318-1323, Jun. 2009.

HUSSAIN, A.I. et al. Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two *Thymus* species from the Pakistani flora. **Food Science and Technology**, Oxford, v.50, n.1, p. 185-192, Jan. 2013.

INNOCENTI, G. et al. *In vitro* estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. Tome **Phytomedicine**, Jena, v.14, n. 2-3, p.147-152, 2007.

KINDLOVITS, S.; NÉMETH, É. Sources of variability of yarrow (*Achillea* SPP.) essential oil. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 41, n.1, p. 92-103, Sept. 2012.

KONYALIOGLUA, S.; KARAMENDERES, C. The protective effects of *Achillea* L. species native in Turkey against H₂O₂-induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v.102, n.2, p.221-227, Nov. 2005.

KOVÁČIK, J. et al. Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. **Plant Science**, Clare, v. 172, n. 2, p. 393-399, Feb. 2007.

LARSSON, S. et al. Effects of light and nutrient stress on defensive chemistry and susceptibility to *Galerucella lineola* (Coleoptera, Chrysomelidae) in two *Salix* species. **Oikos**, Copenhagen, v. 47, n. 2, p. 205-10, Sept.. 1986.

LIU, C. Z., et al. Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. **Process Biochemistry**. Oxford, v 38, n. 4, p.581-585, Dec. 2002.

LIU, C. Z. et al. Regeneration of the Egyptian medicinal plant *Artemisia judaica* L. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, n..6, 525-530, Feb. 2003.

LOPES, O. D. et al. Determinação do coeficiente de cultura (Kc) e eficiência do uso de água do alecrim-pimenta irrigado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 6, p. 548-553, 2011.

LOPEZ-LAZARO, M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 9, n. 1, p. 31-59, Jan. 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F..J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006.

LOURENÇO, P.M.L. et al. Essential oils from hairy root cultures and from plant roots of *Achillea millefolium* **Phytochemistry**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 637-642, July 1999.

MARCHESE, J. A.; FIGUEIRA, G. M. O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 7, n. 3, p. 86-96, 2005.

MARQUES, P.A.A.; BERNARDI FILHO, L.; OLIVEIRA, R.B.D. Oregano production under various water depths estimated by means of the class A pan evaporation. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 59-63, mar. 2009.

MEIRA, M.R. et al. Crescimento vegetativo, produção de fitomassa e de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. sob diferentes lâminas de irrigação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 5, p. 779-785, maio 2013.

MISTIERY, M.L.A. Estudos das propriedades analgésicas da *Achillea millefolium* L. (Asteracea). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v3, n2, p.1-6, 2001.

MORAIS, T. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.1, p.110-121, 2012.

MURCH, S. J. et al. Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*. cv'Anthos'). **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, n. 6, 576-581, June 2000.

NADIM, M.M. et al. The Essential oil composition of *Achillea millefolium* L. cultivated under tropical condition in India. **World Journal of Agricultural Sciences**, Dubai v.7, n. 5, p. 561-565, 2011.

NEVES, J.R.C. et al. 1,8 cineole decreases gastric compliance in anesthetized rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, Rio Claro, v.22, n. 1, p. 63-67, 2007.

NITZSCHE, A. et al. Chemical and biological characterization of cinnamic acid derivatives from cell cultures of lavender (*Lavandula officinalis*) induced by stress and jasmonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 10, p. 2915-2923, May 2004.

NOVAK, J. et al. Distribution of the cis-sabinene hydrate acetate-chemotype in accessions of marjoram (*Origanum majorana* L.). **Euphytica**, Wageningen, v.127, n.1, p. 69-74, 2002.

PAGTER, M.; BRAGATO, C.; BRIX, H. Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* water deficit. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 81, n. 4, p. 285-299, Apr. 2005.

POTRICH, F.B. et al. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: Involvement of the antioxidant system. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v.130, n.1, p. 85-92, July 2010.

PRAVUSCHI, P. R.; MARQUES, P. A. A.; MAREGA, B. H. Efeito de diferentes lâminas de irrigação na produção de óleo essencial do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 687-693, dez. 2010.

RAAL, A. et al. Content of essential oil, terpenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) teas from different countries. **Food Chemistry**, Oxford, v. 131, n. 2, p. 632-638, 2012.

RAHIMMALEK, M. et al. Essential oil variation among and within six *Achillea* species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 29, n. 2-3, p. 348-355, Mar. 2009.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.

REIS, E. S.; et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* *in vitro* sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringa, v. 31, n. 2, p. 331-335, jun. 2009.

ROHLOFF, J. et al. Production of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in Norway: essential oil content and quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 12, p. 6205-6209, Dec. 2000.

ROSSATO, M. et al. Avaliação do óleo essencial de *Aloysia sellowii* (Briquet) Moldenke (Verbenaceae) do Sul do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p.200-202, abr. 2006.

SANTOS, T. T. et al. Efeito do estresse hídrico na produção de massa foliar e teor de óleo essencial em sambacaitá (*Hyptis pectinata* L.). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 1-4, mar. 2004.

SASHIDHARA, K.V. Essential oil composition of *Matricaria recutita* L. from the lower region of the Himalayas. **Flavour and Fragrance Journal**, Sussex, v. 21, n.2, p. 274-276, Mar./Apr. 2006.

SCELZA, M. F. Z. et al. *In vitro* evaluation of macrophage viability after incubation in orange oil, eucalyptol, and chloroform. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, St Louis, v.102, n. 1, p.24-27, 2006.

SILVA, C.D.M.D. et al. Sesquiterpenoids of *Senecio bonariensis* Hook. & Arn. Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n.1, p. 87-92, 2010.

SILVA, F. G. et al. Efeito da concentração de sais e fitorreguladores na indução de calos em carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 27, n.3, 541-547, 2003.

ŠIRCELJ, H. et al. Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. *Journal of plant physiology*, 162(12), 1308-1318. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, n. 12, p. 1308-1318, 2005.

SOSA, M.E. et al. Insecticidal and nematicidal essential oils from Argentinean *Eupatorium* and *Baccharis* spp. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.43, p.132-138, Aug. 2012.

SOUZA, M.A.A.; et al. Produção de biomassa e óleo essencial de hortelã em hidroponia em função de nitrogênio e fósforo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.25, n.1, p. 41-48, mar. 2007.

SRIVASTAVA, N. K.; LAL, R. K. Variations among commercial cultivars of *Vetiveria zizanioides* in the photosynthetic and metabolic characters associated with essential oil accumulation. International Journal of **Medicinal Plant Research**. New York, v. 1, n. 4, p. 45-49, 2012.

SRIVASTAVA, P.; CHATURVEDI, R. Increased production of azadirachtin from an improved method of androgenic cultures of a medicinal tree *Azadirachta indica* A. Juss **Plant signaling & behavior**, Austin v. 6, n. 7, p. 974-981, 2011.

TAMAYO, L. M. A. et al. Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril* Linneaus) de interés para la industria de alimentos. **Revista Lasallista Investigation**, Caldas, v.5, p. 100-111, 2008.

THOMAS, T. D.; MASEENA, E. A. Callus induction and plant regeneration in *Cardiospermum halicacabum* Linn. an important medicinal plant. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 3, p. 332-336, 2006.

THOMAS, T.D.; PHILIP, B. Thidiazuron-induced high-frequency shoot organogenesis from leaf-derived callus of ia medicinal climber, *Tylophora indica* (Burm. F.) merrill. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v. 41, n. 2, p. 124-128, Mar./Apr. 2005.

TURKER, A. U.; YUCESAN, B.; GUREL, E. *In vitro* Regeneration of *Achillea millefolium* L from Shoot-tips and Root Segments of Seedlings. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v. 18, n. 1, p. 65-69, Jan. 2009.

VANISREE, M. et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin. Academia Sinica**, Taipei, v. 45, n. 1, p. 1-22, Jan. 2004.

VERMA, M. et al. , Induction of mitochondrial-dependent apoptosis by an essential oil from *Tanacetum gracile*, **Planta Medica**, Stuttgart, v. 74, n. 5, p. 515-20, Apr. 2008.

XIAO-FEI, J. et al. Preliminary study: biotransformation of borneol to camphor in mice, rats and rabbits. **World Science and Technology**, Karnataka, v. 10, n. 1, p.27-36, 2008.

ZHANG, D. et al. Environmental Control of flowering and growth of *Achillea millefolium* L. 'Summer Pastels'. **Hortscience**, Alexandria, v. 31, n.3, p. 364–365, 1996.

ZHOU, J.G. Responses of medicinal plant to drought stress and controlled experiment. China Journal of Chinese Matéria Medica, **Beijing**, v.35, n.15, p.1919-1924, 2010.

CAPÍTULO 2

Lâminas de irrigação no crescimento e constituintes voláteis de *Achillea millefolium* L.

RESUMO

A *Achillea millefolium* L. é uma importante planta medicinal, que possui propriedades farmacológicas comprovadas como analgésica, anti-inflamatória e estrogênica. O trabalho foi realizado para se conhecer a resposta da *Achillea millefolium* L. a diferentes lâminas de irrigação, caracterizando seu crescimento e a produção de compostos voláteis. Os tratamentos foram a aplicação de 55, 110, 220 440 e 880 mm de água, durante um período de cultivo de 110 dias em casa de vegetação. Avaliaram-se a produção de matéria seca da parte aérea, das raízes, do caule e total; número de brotações e de folhas, comprimento de raízes, diâmetro do caule e os teores de clorofila a, b, total e carotenoides. Os compostos voláteis foram analisados por *headspace*-CG/EM. Pelos resultados observados, a lâmina estimada de 606,7 mm foi a que proporcionou a maior produção de matéria seca total. Houve diferenças significativas na composição química qualitativa e quantitativa da fração volátil do óleo essencial. Os compostos majoritários identificados foram o sabineno, 1,8-cineol, borneol e β -cariofileno, representado aproximadamente 75% do total dos constituintes químicos. Concluiu-se que as lâminas de aproximadamente 605 mm favoreceram o crescimento da espécie e que a disponibilidade hídrica afeta o metabolismo dos compostos voláteis em *A. millefolium* L.

Palavras-chave: Milfolhas. Constituintes voláteis. Plantas medicinais. Disponibilidade hídrica.

ABSTRACT

The *Achillea millefolium* L. is an important medicinal plant which has proven pharmacological properties including analgesic, anti-inflammatory and estrogen. The work was conducted to know the response of *Achillea millefolium* L. the different irrigation, characterizing its growth and the production of volatile compounds. The treatments were the application of 55, 110, 220 440 and 880 mm of water during a growing season of 110 days in the greenhouse. We evaluated the dry matter production of shoots, roots, stem and total number of shoots and leaves, root length, stem diameter, and the contents of chlorophyll a, b, and total carotenoids. The volatile compounds were analyzed by headspace-GC/MS. To the observed results indicates with 606.07 mm was estimated that yielded the highest total dry matter production. There were significant differences in the qualitative and quantitative chemical composition of the volatile fraction of essential oil. The major compounds identified were sabinene, 1,8-cineole, borneol and β -caryophyllene, represented approximately 75% of all chemical constituents. It was concluded that the blades of approximately 605 mm favored the growth of the species and the availability of water affects the metabolism of the volatile compounds in *A. millefolium* L.

Keywords: Yarrow. Essential oil. Borneol. Water availability.

1 INTRODUÇÃO

A *Achillea millefolium* L. (milfolhas) é uma planta pertencente à família das Asteraceas, considerada nativa da Europa e do Oeste Asiático, se adaptou a várias condições climáticas e desenvolve-se por praticamente todo mundo, inclusive há registros de sua ocorrência na região Antártica. É utilizada na medicina popular para a dispepsia, inflamações, febre, cólicas, como analgésica e antioxidante (LORENZI e MATOS, 2006; RADUZIENE e GUDAITYTE, 2006; BIMBIRAITĖ et al., 2008).

Um dos princípios ativos da espécie é o óleo essencial, presente nas folhas e inflorescências, com uma grande diversidade de compostos, dentre os quais majoritários o cariofileno, sabineno, γ -terpineno, borneol e o camazuleno (JUDZENTIENE; MOCKUTE, 2010; RAHIMMALEK et al., 2009).

A produção do óleo essencial em plantas é influenciada por fatores endógenos, como a idade da planta, parte produtora ou acumuladora, genótipo e por fatores ambientais como radiação, altitude, latitude, nutrição mineral e a disponibilidade hídrica (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; FIGUEIREDO et al., 2008).

Além de outros fatores, a disponibilidade hídrica influencia diretamente no metabolismo primário e conseqüentemente no secundário, devido ao desvio de rotas e ativação de enzimas do sistema antioxidante e de defesa da planta (Guimarães Dias et al., 2012; LIAO et al., 2012, Carvalho et al., 2013).

Pesquisas com espécies medicinais têm indicado alterações no teor e qualidade do óleo essencial advindo do estresse hídrico. O entendimento sobre como a disponibilidade hídrica afeta o metabolismo secundário se faz necessário, principalmente em plantas medicinais, pois as possíveis alterações ocorridas nos teores de princípios ativos podem comprometer seus parâmetros

de qualidade, eficácia e segurança (BAGHALIAN et al., 2011; RAMAKRISHNA e RAVISHANKAR, 2011).

Desta forma, objetivou-se avaliar o crescimento e a produção de constituintes voláteis de *Achillea millefolium* L. submetidos a diferentes lâminas de irrigação em casa de vegetação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação do Departamento de Biologia/ Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), (coordenadas: 21°13'34.98"S, 44°58'53.65" O, altitude 919 m) entre os meses de julho e outubro de 2012, totalizando 110 dias de cultivo. A casa de vegetação era coberta com filme plástico translúcido (150 micras) e sombrite 50%. O acompanhamento das temperaturas máximas, mínimas e umidade relativa do ar foram medidos através de termohigrometro presente na casa de vegetação.

As mudas foram obtidas através do plantio de segmentos de rizoma em bandejas de polipropileno, com 78 células de volume de 120 cm³, preenchidas com substrato comercial em casa de vegetação nebulizada. Mudanças com 60 dias, produzidas a partir de rizomas, foram plantadas em microlisímetros de drenagem, com capacidade 15L e diâmetro de 25 cm, preenchidos com substrato composto por solo de barranco e areia, na proporção de 2:1 e adubado com formulação de NPK 4-14-8, na proporção de 2 kg por m³ de substrato.

O solo utilizado para o substrato apresentava as seguintes características físico-químicas: pH (água): 5,4; P: 4,13 mg.dm³; K: 73,32 mg.dm³; Ca: 2,30 cmolc.dm⁻³, Mg: 0,30 cmolc.dm⁻³, Al:0,10 cmolc.dm⁻³, H+Al: 2,90 cmolc.dm⁻³, V:49,00%; matéria orgânica: 2,10 dag.kg⁻¹, Argila: 70,00 dag.kg⁻¹; Silte: 16,00 dag.kg⁻¹ e Areia: 14,00 dag.kg⁻¹, sendo analisado pelo Laboratório de Análises de Solos do Departamento de Ciências do Solo da UFLA.

Os tratamentos consistiram na aplicação das lâminas de 55,110, 220, 440 e 880 mm de água, com 5 repetições para cada um, perfazendo 25 unidades experimentais. As lâminas foram distribuídas equitativamente ao longo do ciclo com irrigações diárias dos tratamentos, aferidas através de proveta graduada. Para início do experimento, o substrato de todos os tratamentos foi saturado com água antes do plantio das mudas.

Aos 110 dias de cultivo, foi avaliado o crescimento da planta através do número de folhas, diâmetro da base, comprimento das raízes, número de brotações, matéria seca da parte aérea, matéria seca do caule, matéria seca das raízes e matéria seca total. Para as medições foram utilizados paquímetro digital com precisão de 0,01 mm e régua graduada com precisão de 0,01 cm.

Para as avaliações, a planta foi separada em folhas, caule e raízes. Cada parte foi separada e lavada em água destilada e seca em estufa de circulação forçada a temperatura de 40°C até estabilização do peso. Para determinação da matéria seca de cada parte foi utilizado balança analítica com precisão de 0,1 mg.

Também foram determinados, ao final do experimento, os teores de clorofila a, b e total e de carotenoides. No momento da coleta, as folhas das plantas foram acondicionadas em papel de alumínio e mantidas em banho de gelo até serem transferidas ao laboratório. A extração e quantificação das clorofilas, a, b e total foram realizadas segundo a metodologia de Arnon (1949), a partir de 1g de matéria fresca homogeneizada em 10 mL de acetona 80%, seguida da leitura em espectrofotômetro (Beckman, modelo 640 B) nos comprimentos de onda 645 e 663 nm. A extração e quantificação de carotenoides totais foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Duke e Kenyon (1986) com a leitura realizada a 470 nm.

As análises químicas da fração volátil foram analisadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA. Para extração da fração volátil de folhas de *A. millefolium* empregou-se a técnica do “headspace” estático. Para isso utilizou-se de do extrator “headspace” automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/ EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais foram estabelecidos os seguintes parâmetros: temperatura de incubação da amostra de

100 °C durante 30 min, temperatura de seringa a 110 °C. O volume de injeção foi de 500 µL da fase de vapor, injetados em modo split na razão de 50:1

As amostras constituíram de 60 mg da parte aérea de *A. millefolium* acondicionadas em vials de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE; A análise foi realizada em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z.

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e da linha de transferência para o EM foram mantidas em 230 °C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 200 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 270 °C. As concentrações dos constituintes da fração volátil foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos ± o desvio padrão ($n=2$).

Os constituintes foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à série de *n*-alcanos (C₈-C₁₈), (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação proposta por KOVÁTS (1965) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; DAVIES, 1990).

Os dados de crescimento e pigmentos fotossintéticos foram submetidos à análise de regressão polinomial e quando significativos, foram ajustados os modelos através do programa SAEG (FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES,

2007). A análise do óleo foi representada através de tabela com os compostos identificados e seus respectivos índices de retenção, áreas relativas (%) e desvios padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de produção de matéria seca estão representados no Gráfico 1. Os dados de crescimento se ajustaram ao modelo quadrático, sendo os valores máximos com as respectivas lâminas representados na Tabela 1. Para a produção de matéria seca total, as lâminas intermerdiárias entre os tratamentos 440 e 880 mm, foram as melhores, com o máximo de produtividade na lâmina estimada de 570 mm.

Tabela 1 Valores máximos estimados para as lâminas aplicadas e para a produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca das raízes (MSR), matéria seca do caule (MSC) e matéria seca total (MST). Lavras, 2013

Parâmetros	Máximos estimados	
	Produção (g)	Lâmina aplicada (mm)
MSPA	2,09	606,07
MSR	1,84	647,96
MSC	2,13	644,74
MST	6,78	570,62

Em trabalhos com aroeirinha (*Schinus terebentifolium*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*) a resposta foi semelhante ao presente trabalho, onde as disponibilidades hídricas intermediárias se mostraram ideais para a produção de matéria seca (SILVA et al. 2002; SILVA et al., 2008; PRAVUSCHI et al., 2010).

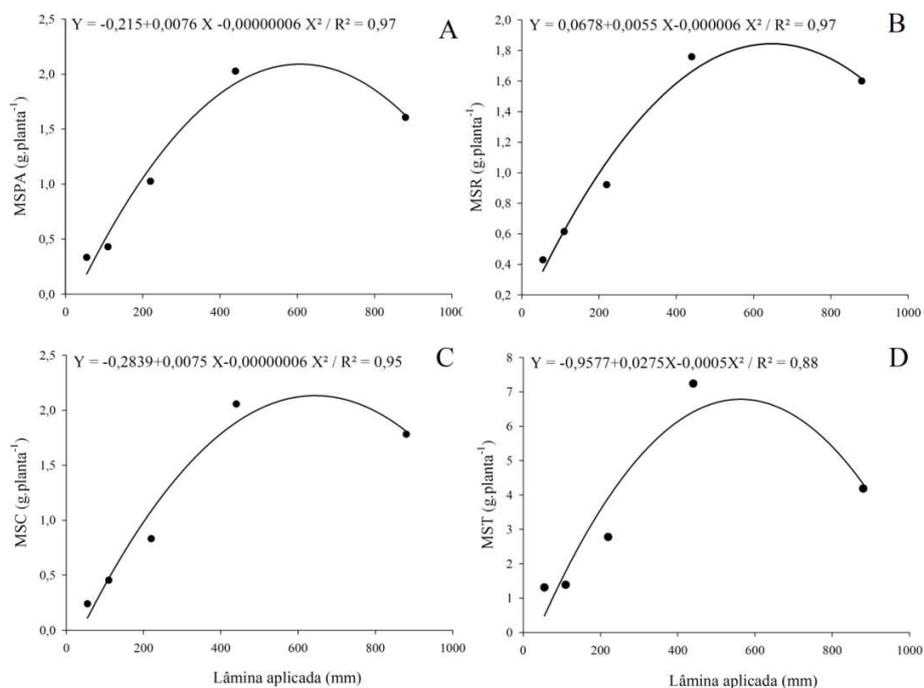


Gráfico 1 Produção de *Achillea millefolium* L. cultivada com a aplicação de diferentes lâminas de irrigação. A-Massa seca da parte aérea (MSPA); B-Massa seca das raízes (MSR); C- Massa seca do caule (MSC); D-Massa seca total (MST). Lavras, 2013

Comparativamente, algumas espécies apresentam respostas crescentes em relação disponibilidade hídricas. Em orégano, *Origanum vulgare* L., Marques et al. (2009) observaram uma resposta positiva para espécie, onde a maior lâmina aplicada (216,8 mm) correspondeu a maior produtividade de matéria seca total, o mesmo ocorrendo com *Lippia sidoides* Cham., sendo que essa resposta esta relacionada com manutenção adequada das relações hídricas das plantas, bem como a disponibilidade nutricional advinda da solubilização dos nutrientes no solo (ALVARENGA et al., 2012).

O crescimento das plantas aos 110 dias está representado pela apresentou comportamento linear crescente para o número de folhas, já o comprimento de raiz, o numero de brotações e diametro do caule apresentaram resposta quadrática (Gráfico 2). Foi observado que a maior disponibilidade hídrica aumentou o número de folhas, porém com pouca alocação de biomassa, indicando uma adaptação que permita a maior perda de água.

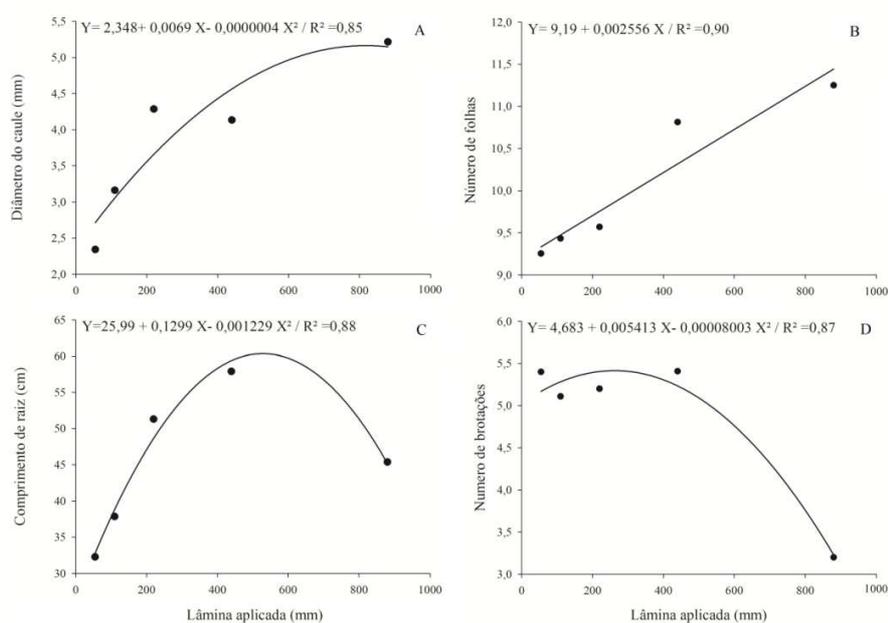


Gráfico 2 Variáveis de crescimento de *Achillea millefolium* L. cultivada com a aplicação de diferentes lâminas de irrigação. A-Diâmetro do caule; B- número de folhas; C- comprimento de raiz; D- Número de brotações. Lavras, 2013

O comprimento de raiz acompanhou o crescimento da parte aérea até certo ponto, tendo maiores valores nas lâminas intermediárias. Em algumas espécies, em condições de limitação hídrica moderada, observa-se o maior crescimento do sistema radicular em detrimento da parte aérea, com o propósito

de atingir a camada úmida mais profunda no solo (WANG e TAUB, 2010; LOVELLI et al. 2011; MA et al., 2010).

O Gráfico 3 representa os teores das clorofilas a, b, total e carotenoides. Os modelos ajustados dos pigmentos apresentaram comportamento quadrático decrescente com o aumento da água disponível, o que pode indicar que a planta está adaptada a condições de déficit hídrico, visto que conseguiu manter os níveis proporcionais de clorofila a e b e de carotenoides. Normalmente, as plantas sob déficit hídrico diminuem a quantidade de pigmentos fotossintéticos e acumulam maiores proporções de pigmentos protetores como carotenoides, xantofilas e antocianinas, de modo a diminuir a ação das espécies reativas de oxigênio (MOHAMMADKHANI e HEIDARI, 2007; DINAKARA; DJILIANOV; BARTELS, 2012).

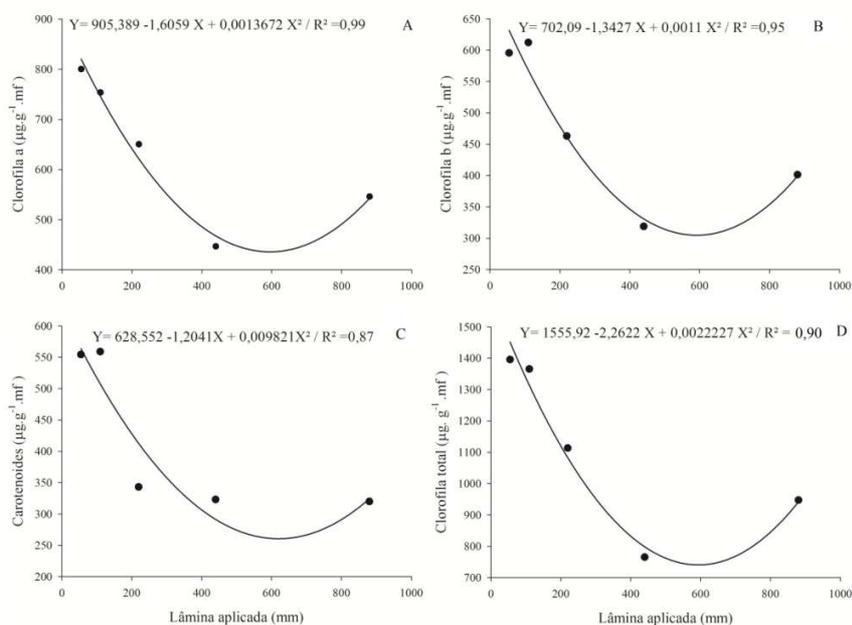


Gráfico 3 Concentrações de pigmentos fotossintéticos de *Achillea millefolium* L. cultivada com a aplicação de diferentes lâminas de irrigação. A- clorofila a; B- clorofila b; C-carotenoides; D- clorofila total. Lavras, 2013

Os pontos mínimos das concentrações dos pigmentos estão representados na Tabela 2, onde foram tomadas como referência a maior produção de matéria seca da parte aérea, na lâmina estimada de 606,07 mm. Trabalhando com a mesma espécie, Khalil et al. (2011) observaram que a planta manteve os menores potenciais hídricos e osmóticos no tratamento de estresse hídrico (10 dias sem irrigação), com a diminuição da condutividade estomática, transpiração e área foliar, indicam que a planta apresenta certa tolerância ao estresse hídrico

Tabela 2 Valores mínimos estimados para a lâmina aplicada de 606,07 mm e para os teores de clorofila a, clorofila b, carotenóides e clorofila total. Lavras, 2013

Parâmetros	Mínimos estimados
	Teor ($\mu\text{g. g}^{-1}$)
Clorofila a	435,87
Clorofila b	304,82
Carotenoides	260,60
Clorofila total	740,70

Foram identificados 27 constituintes químicos na fração volátil das folhas de *A. millefolium* (Tabela3), desses, 20 pertencem a classe dos monoterpenos, sendo que 4 deles apresentaram teores mais expressivos: sabineno (32,21-50,97%), 1,8 cineol (6,05-12,85%), borneol (6,96-13,03), beta-cariofileno (10,30 a 20,07%).

Esses compostos são relatados na literatura para a espécie em trabalhos de cultivo da espécie nas condições climáticas da Índia, Lituânia, Irã, Portugal, Noruega e Canadá, (FIGUEIREDO et al., 1992; LAWRENCE, 1997; ROHLOFF 2000; MOCKUTE e JUDZENTIENE, 2003; RAHIMMALEK et al., 2009; NADIM et al., 2011).

O aumento da disponibilidade hídrica reduziu o número de constituintes químicos presentes entre os tratamentos. No tratamento com 55 mm de lâmina aplicada houve 27 compostos identificados, contrastando com a maior lâmina aplicada (880 mm), com apenas 17 constituintes.

O teor de 1,8-cineol foi favorecido pela limitação hídrica, onde apresentou o maior teor entre os tratamentos, reposita contrária foi observada em *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm., onde a limitação prejudicou o teor do composto (REZENDE et al.,2011).

Tabela 3 Constituintes voláteis de *Achillea millefolium* L. cultivados com a aplicação de diferentes lâminas de irrigação. Lavras, 2013

LÂMINAS DE ÀGUA APLICADAS						
Área (%) ± DP						
Compostos	IR ¹	55 mm	110 mm	220 mm	440 mm	880 mm
3-metil-pentanol	849	0,13±0,02	0,14±0,01	0,31±0,02	0,51±0,05	—
α-tujeno	925	1,10±0,17	1,16±0,07	1,65±0,11	1,43±0,04	1,77±0,05
α-pineno	932	1,33±0,16	1,4±0,15	2,27±0,13	1,36±0,02	2,00±0,13
canfeno	947	1,05±0,08	0,96±0,01	1,56±0,08	0,91±0,05	1,04±0,06
sabineno	973	36,04±2,74	32,21±1,32	41,54±2,14	38,85±0,74	50,97±0,9
β-pineno	976	3,00±0,15	3,03±0,03	2,32±0,1	2,24±0,12	2,45±0,05
6-metil-5-hepten-2-ona	986	0,14±0,02	0,11±0,02	—	—	—
mirceno	990	2,74±0,23	2,32±0,44	1,67±0,07	1,38±0,01	1,67±0,02
α-terpineno	1016	0,36±0,01	0,23±0,07	0,23±0,01	—	—
p-cimeno	1023	1,97±0,04	1,51±0,56	1,17±0,01	1,38±0,06	0,79±0,04
D-limoneno	1027	3,68±0,19	2,68±0,83	1,89±0,04	1,41±0,04	1,63±0,01
1,8-cineol	1030	12,85±0,12	10,76±1,55	9,79±0,64	6,05±0,04	8,39±0,54
3-hidroxi-1-noneno	1040	0,44±0,01	0,34±0,02	—	0,46±0,07	—
E-β-ocimeno	1046	0,11±0,02	—	—	—	—
γ-terpineno	1057	3,10±0,05	2,07±0,33	1,22±0,03	1,41±0,04	1,33±0,01
hidrato de <i>trans</i> -sabineno	1065	3,03±0,5	3,33±0,24	2,06±0	1,52±0,16	1,16±0,03
terpinoleno	1088	0,37±0,01	0,29±0,05	1,33±0,05	—	—
tujanol	1098	1,54±0,16	1,85±0,09	0,4±0,01	1,56±0,09	0,98±0,01
canfora	1143	0,14±0,04	0,14±0,02	—	—	—
borneol	1164	10,56±1,64	13,03±1,15	12,14±0,98	12,41±0,33	6,96±0,18
terpinen-4-ol	1176	0,48±0,05	0,48±0,01	0,33±0,02	0,57±0,05	—

Tabela 3, conclusão

LÂMINAS DE ÀGUA APLICADAS						
Área (%) ± DP						
Compostos	IR¹	55 mm	110 mm	220 mm	440 mm	880 mm
α -terpineol	1190	1,74±0,17	2,44±0,66	2,15±0,12	1,92±0,1	1,81±0,03
acetato de bornila	1285	0,74±0,12	0,94±0,03	0,82±0,11	—	—
β -cariofileno	1417	10,3±0,65	15,41±2,28	12,98±1,81	20,07±0,69	13,54±1,01
α -humuleno	1451	1,08±0,06	1,51±0,21	1,09±0,17	1,96±0,07	1,12±0,11
β -cubebeno	1479	0,66±0,22	0,59±0,21	1,07±0,11	0,95±0,16	2,41±0,31
óxido de cariofileno	1580	0,29±0,02	—	—	0,63±0,02	—
Constituintes identificados (%)		99,04	98,02	99,59	98,97	100
Nº de constituintes		27	25	22	21	17

¹Índice de retenção relativo a série n-alcanos (C₈-C₁₈) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão ($n=2$)

Os compostos majoritários estão representados no Gráfico 4, onde se pode observar que houve diferenças entre os teores dos compostos, com destaque para o sabineno, que representou cerca de 50% dos compostos voláteis no tratamento com maior lâmina aplicada (880 mm). O manejo hídrico interfere na composição química volátil da espécie e pode alterar sua atividade biológica (NÉMETH; BERNAT, 2008).

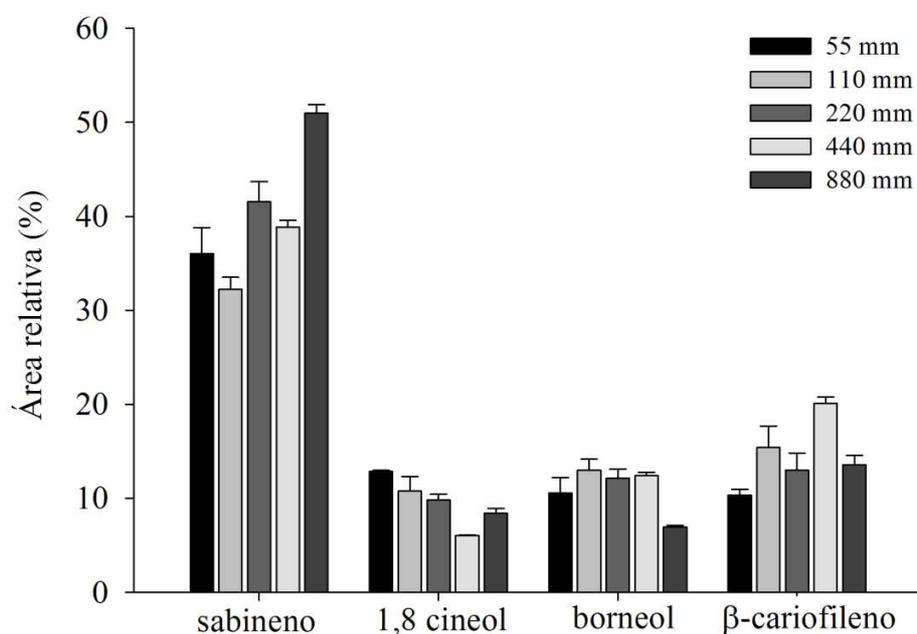


Gráfico 4 Compostos majoritários de *Achillea millefolium* L. cultivados sob diferentes lâminas de irrigação correspondentes aos mesmos constituintes químicos. Desvio padrão ($n=2$)

Essa variação na composição do óleo pode ser atribuída à atividade de enzimas do grupo das terpeno-sintases, que possuem a capacidade de transformar o substrato em vários produtos distintos (GODARD; WHITE; BOHLMANN, 2008; DEGENHARDT; KÖLLNERA; GERSHENZON, 2009).

Eiasu; Steyn; Soundy (2012) em trabalho com frequência de irrigação em *Pelargonium* spp; observaram uma variação dos teores de citronelol e geraniol entre os tratamentos, apresentando uma relação citronelol: geraniol 2 vezes maior que os tratamentos mais irrigados, sendo essa variação ocorrida no período de uma semana, Sangwan et al. (1994) avaliaram condições de estresse moderado em duas espécies de *Cymbopogon* spp. também observaram variações significativas nos teores de citral e geraniol, assim como ocorrido em *Ocimum basilicum* L. e *Mentha* spp. que apresentaram alterações nos teores dos seus constituintes voláteis (SIMON et al., 1992; MISRA e SVIRSTAVA, 2000).

Como o teor de sabineno foi superior no tratamento de maior lâmina, provavelmente este deve ser o principal substrato para a produção de outros compostos, por rotas ainda desconhecidas.

Nas condições de estresse, algumas dessas enzimas são ativadas, expressas ou alteram sua funcionalidade para determinadas rotas biossintéticas, o que pode explicar a maior variabilidade de compostos no tratamento de maior limitação hídrica (GODARD; WHITE; BOHLMANN, 2008; DEGENHARDT; KÖLLNERA; GERSHENZON, 2009).

4 CONCLUSÃO

A *Achillea millefolium* L. apresentou melhores produções de matéria seca da parte aérea, das raízes, do caule e total nas lâminas de irrigação estimadas entre 570 e 660 mm, sendo que, a partir desses níveis, a planta não acumulou biomassa.

Os maiores teores de clorofila a, b e carotenoides nos tratamentos de menores lâminas indicam que a planta acumula pigmentos sob limitação hídrica, que pode ser uma forma de proteção ao estresse hídrico.

A planta alterou o metabolismo de terpenoides, apresentando maior número, 27 constituintes na menor lâmina aplicada, 55 mm, além disso, a variação nos teores dos compostos majoritários indica que o manejo da irrigação pode ser utilizado para se adequar os teores desses compostos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPEMIG, CAPES e CNPQ o auxílio financeiro para a realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publish Corporation, 2007.
- ALVARENGA, I.C.A. et al. Fator de resposta do alecrim-pimenta a diferentes lâminas de irrigação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 4, p. 462-468, out./dez. 2012.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v.24, n.1, p. 1-15, Jan. 1949.
- BAGHALIAN, K. et al. Physiological and phytochemical response to drought stress of German chamomile (*Matricaria recutita* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.49, n.2, p.201-207, Feb. 2011.
- BIMBIRAITÊ, K.. et al. O Comparison of the chemical composition of four yarrow (*Achillea millefolium* L.) morphotypes. **Biologija**, Vladivostok, v .54, n.3, p. 208-212, 2008.
- CARVALHO, K. et al. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v.40, n.4, p.3269-3279, 2013.
- DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 503, n.1, p.. 1-24, Mar. 1990.
- DEGENHARDT, J.; KÖLLNERA, T.G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.70, n. 15-16, p.1621–1637, Oct./Nov. 2009.

DINAKARA, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, Clare, v.182, n. 1, p. 29–41, 2012.

DUKE, S. O.; KENYON, W.H. Effects of dimethazone (FMC 57020) on chloroplast development. II Pigment synthesis and primary leaves. **Pesticide Biochemistry Physiology**, San diego, v. 25, n. 1, p.11-18, Aug. 1986.

EIASU, B.K.; STEYN, J.M.; SOUNDY, P. Physiomorphological response of rose-cented geranium (*Pelargonium* spp.) to irrigation frequency. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v.78, p. 96-103, Jan. 2012.

FIGUEIREDO, A.C. et al. Composition of the essential oils from leaves and flowers of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*. **Flavour and Fragrances Journal**, Hoboken, v. 7, n.4, p. 219-222. Aug. 1992.

FIGUEIREDO, A. C. . . et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Hoboken, v. 23, n. 4, p. 213-226, Aug. 2008.

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES. **Sistema para análises estatísticas e genéticas** – SAEG: versão 9.1. Viçosa, MG: UFV, 2007.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.2, p. 374-381, 2007.

GODARD, K.; WHITE, R.; BOHLMANN, J. Monoterpene-induced molecular responses in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, Oxford, v.69,n. 9, 1838–1849, June 2008.

KHALIL, S.K. et al. Growth and physiology of yarrow species *Achillea millefolium* cv. Cerise Queen and *Achillea filipendulina* cv. Parker Gold at optimum and limited moisture. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v.5, v.13, p.1698-1706, Dec. 2011.

KOVÁTS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. **Advances in Chromatography**, New York, v. 1, p. 229-247, 1965.

JUDZENTIENE, A.; MOCKUTE, D. Essential oil composition of two yarrow taxonomic forms. **Central European Journal Of Biology**, Warsaw, v.. 5, n. 3, p. 346-352, June 2010.

LAWRENCE, B.M. Progress in essential oils. Yarrow oil. **Perfum Flavour**, Hoboken, v.22, n.1, p. 68-72, Jan. 1997.

LIAO, W.B. et al. Nitric oxide and hydrogen peroxide alleviate drought stress in marigold explants and promote its adventitious root development. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.58, p.6-15, Sept. 2012

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. NOVA ODESSA: INSTITUTO PLANTARUM, 2006. 512 p.

LOVELLI, S. et al. Abscisic acid root and leaf concentration in relation to biomass partitioning in salinized tomato plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart., v.169, n.3; p.226-233. 2012.

MA, X.F. et al. Effects of water deficit at seedling stage on maize root development and anatomical structure. **The Journal of Applied Ecology**, Oxford, v.21, n.7, p.1731-1736, 2010.

MARQUES, P.A.A.; BERNARDI FILHO, L.; OLIVEIRA, R.B. Oregano production under various water depths estimated by means of the class A pan evaporation. **Horticultura Brasileira**, Brasilia, v.27, n.1 p. 59-63, mar. 2009.

MISRA, A.; SRIVASTAVA, N. K. Influence of water stress on japanese mint. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, Birmingham, v.7, n.1, p.51-58, 2000.

MOHAMMADKHANI, N.; HEIDARI, R. Effects of water stress on respiration, photosynthetic pigments and water content in two maize cultivars. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Peshawar, v.22, n.10, p.4022-4028, 2007.

NADIM, M.M. et al. The Essential Oil Composition of *Achillea millefolium* L. Cultivated under tropical condition in India. **World Journal of Agricultural Sciences**, Peshawar, v.7, n.5, p. 561-565, 2011.

NEMETH, E.; BERNAT, J. Biological activities of yarrow species (*Achillea* spp.) **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v.14, n. 29, p.3151-3167, Oct. 2008.

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. Topic detection and tracking evaluation. 2008. Disponível em: <<http://www.nist.gov/speech/test/tdt/>>. Acesso em: 16/04/2013.

PRAVUSCHI, P.R. et al. Efeito de diferentes lâminas de irrigação na produção de óleo essencial do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 687-693, dez. 2010.

RAHIMMALEK, M. et al. Essential oil variation among and within six *Achillea* species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v.29, n. 2-3, p. 348-355, Mar. 2009.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signal Behavior**, Austin, v. 6, n.11, p.1720-1731, 2011.

REZENDE, M.E. . et al. Teor e composição química do óleo essencial de alpínia em razão da adubação e da disponibilidade de água no solo. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, n. 2, p. 208-215,2011.

ROHLOFF, J. . et al. Production of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in Norway: essential oil content and quality, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 12, p.6205-6209, Dec. 2000.

SANGWAN, N.S. . et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 34 n.1, p.3-21, May 2001.

SILVA, M.A.V. et al. Resposta estomática e produção de matéria seca em plantas jovens de aroeira submetidas a diferentes regimes hídricos. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.32, n.2, p.335-344, 2008.

SILVA, S.R.S. et al. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.

SIMON, J.E. Water stress-induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 4, n. 1, p. 71-75, 1992.

WANG, X.; TAUB, D.R. Interactive effects of elevated carbon dioxide and environmental stresses on root mass fraction in plants: a meta-analytical synthesis using pairwise techniques. **Oecologia**, New York, v.163, n.1, p.1-11, 2010.

CAPÍTULO 3

Crescimento e produção de compostos voláteis de *Achillea millefolium* L. cultivada em solução nutritiva com omissão de macro e micronutrientes

RESUMO

A nutrição mineral é um dos fatores limitantes na produção agrícola, sendo relativamente pouco estudada em plantas medicinais, sendo necessário determinar quais os elementos são limitantes para a produção e como esses elementos influenciam nos metabólitos secundários de interesse. A *Achillea millefolium* L. é uma espécie medicinal com propriedades antiinflamatórias e analgésicas, devido à presença de óleo essencial em suas folhas e inflorescências. Assim, foi realizado o trabalho com o objetivo de determinar quais elementos limitam o crescimento da espécie, bem como sua influência nos teores de óleo essencial e nos compostos majoritários. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, sendo aplicada a técnica do elemento faltante de macro e micronutrientes, em solução nutritiva de Hoagland & Arnon por um período de cultivo de 55 dias. Os tratamentos foram as omissões das fontes de N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, B, Mn, Mo e Cu, mais a testemunha com a solução completa, totalizando 13 tratamentos com 4 repetições com 2 plantas por vaso. Foram avaliados a matéria seca total, diâmetro do colo, comprimento radicular, número de folhas, clorofilas a, b e carotenoides, teor de óleo essencial e os compostos voláteis das folhas através de CG/EM. A ordem crescente de limitação de macronutrientes para produção de matéria seca total, foram: Ca = K = N > P > S > Mg e para os micronutrientes foram: Zn > Fe > B > Cu > Mn > Mo. A ordem crescente de limitação de macronutrientes da espécie para o teor de óleo essencial foram Ca = N = K > Mg > S > P e para os micronutrientes foram Cu > Fe > Mo > Zn > B > Mn. A *Achillea millefolium* L. alterou significativamente as produções de matéria seca total, teor de óleo essencial e compostos voláteis em função da omissão de macro e micronutrientes, com isso, pode-se adequar um manejo de adubação aliando a produção aos teores de óleo e de compostos voláteis, obtendo-se então uma matéria prima vegetal de qualidade.

Palavras-chave: Milfolhas. Óleo essencial. Borneol 1,8 cineol. Elemento faltante.

ABSTRACT

Mineral nutrition is a limiting factor in agricultural production, with relatively little studied in medicinal plants, being necessary to determine which elements are limiting for the production and how these elements influences in secondary metabolites of interest. The *Achillea millefolium* L. is a medicinal plant with anti-inflammatory and analgesic properties, due to the presence of essential oil in your leaves and inflorescences. Thus, the study was undertaken in order to determine which factors limit the growth of the specie, as well as its influence on the levels of essential oil and the major compounds. The experiment was conducted in a greenhouse, and randomized design being applied to the missing element technique of macro and micronutrients in nutrient solution and Hoagland & Arnon, by a cultivation period of 55 days. The experiment was conducted in a greenhouse in a completely randomized design was applied to the missing element technique of macro and micronutrients in the Hoagland & Arnon by a cultivation period of 55 days. The treatments were omissions sources of N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, B, Mn, Mo and Cu, plus the control solution with a total of 13 treatments and 4 replicates with 2 plants per pot. We evaluated the total dry matter, stem diameter, root length, number of leaves, chlorophyll a, b and carotenoids, essential oil content and volatile compounds from the leaves by GC / MS. The order of increasing limitation of macronutrients to produce total dry matter were: Ca = K = N > P > S > Mg and micronutrients were: Zn > Fe > B > Cu > Mn > Mo. The order of increasing limitation of macronutrients species for essential oil content were Ca = N = K > Mg > S > P and micronutrients were Cu > Fe > Mo > Zn > B > Mn. The *Achillea millefolium* L. changed significantly the production of total dry matter, oil content and volatile compounds due to the omission of macro and micronutrients, so can be tailor a handling allying fertilization, essential oil content and volatile compounds, obtaining then a vegetable raw material quality.

Keywords: Yarrow. Essential oil. Borneol, 1,8 cineole. Missing element.

1 INTRODUÇÃO

A *Achillea millefolium* L., conhecida popularmente como milefólio, mil em rama ou aquileia, está distribuída quase no mundo todo, tendo como origem a Europa e oeste asiático. É uma planta perene, rizomatosa, com porte médio entre 40 e 60 cm, atingindo até um metro quando floridas. As inflorescências em capítulos são branco-leitosas, porém, existem variedades com outras colorações (ZHANG et al., 1996).

A planta é considerada medicinal e aromática, sendo utilizadas infusões de suas folhas para tratar os sintomas de gripes e resfriados, além de cólicas, inflamações cutâneas e queimaduras. Cientificamente foram comprovadas suas ações analgésica, antioxidante, colerética e anti-inflamatória (BENEDECK et al. 2006; BURK.; CICHACZ; DASKALOVA, 2010; BOZIN et al., 2008; POTRICH et al., 2010).

Os princípios ativos que caracterizam a ação medicinal da espécie são principalmente os flavonóides, como a luteolina, quercetina e riboflavina e o óleo essencial, constituídos principalmente por cariofileno, sabineno, gama terpineno e camazulenos, sendo identificados mais de 140 compostos terpenicos em seu óleo (KINDOVLITS e NEMETH, 2012; LOPEZ-LÁZARO, 2009; GUÉDON; ABBE; LAMAISON, 1993).

A produção de metabólitos secundários em plantas medicinais está relacionada com a genética da planta e sua interação com o ambiente. A genética determina qual princípio ativo vai ser produzido, em que época e onde se acumulará na planta, além disso, sabe-se que mesmo em uma determinada espécie, temos os quimiotipos, que são variações fitoquímicas ocorridas dentro das espécies (LAKUSIC et al., 2012, VERMA et al., 2013, PADALIA et al., 2010).

Nas condições ambientais, temos como fatores principais a influência da radiação solar, limitação hídrica e a fertilidade do solo. O manejo adequado da fertilidade do solo permite um crescimento e desenvolvimento rápidos e eficientes, resultando em uma maior produtividade. Porém, os estudos de nutrição mineral em plantas medicinais são relativamente escassos, principalmente relacionados com a produção e qualidade dos metabólitos secundários (YOUSEFZADEH et al., 2013).

Assim, o trabalho foi realizado para se avaliar o crescimento, a produção e a composição dos compostos voláteis de *A. millefolium* L. cultivada em solução nutritiva com a omissão de macro e micronutrientes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, no período de 22/11/2012 a 16/01/2013. Foi utilizada para o experimento a técnica do elemento faltante, onde foram suprimidas as fontes de macro e micronutrientes, utilizando a solução nutritiva proposta por Hoagland e Arnon (1950).

As soluções foram preparadas com os sais puros, e a composição química da solução nutritiva completa foi de 210,1 mg de N; 31 mg de P; 234,6 mg de K; 200,4 mg de Ca; 48,6 mg de Mg; 64,2 mg de S; 500 µg de B; 20 µg de Cu; 648 µg de Cl; 5,022 µg de Fe; 502 µg de Mn; 11 µg de Mo e 50 µg de Zn por litro de solução. O pH foi ajustado para 5,8 através de soluções estoque de NaOH 0,5N e HCl 0,5N, sendo aferido por peagmetro portátil.

Os 13 tratamentos foram a solução completa e as omissões das fontes de N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, B, Zn, Mn, Mo e Cu. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições e duas plantas por repetição. As plantas utilizadas para o experimento foram propagadas por meio de segmentos de rizomas, colocados em bandejas de isopor contendo substrato comercial e permaneceram em casa de vegetação climatizada por 60 dias.

As mudas foram padronizadas e adaptadas em solução completa de Hoagland e Arnon com a concentração de 25% e 50%, por uma semana cada, até o início dos tratamentos. As plantas foram cultivadas por 55 dias, em vasos com capacidade de 4,5 L de solução, com sistema permanente de aeração, sendo as soluções trocadas semanalmente e completadas diariamente com água deionizada para manter o nível constante da solução.

Ao final do período de cultivo, foram determinadas as medidas do diâmetro do caule, comprimento radicular, número de folhas, teores de clorofila a, b, total e carotenoides. Para determinação dos pigmentos fotossintéticos,

folhas, completamente expandidas foram acondicionadas em papel alumínio e mantidas em banho de gelo durante o transporte ao laboratório. A extração e quantificação das clorofilas, a, b e total foram realizadas segundo a metodologia de Arnon (1949) a partir de 1g de matéria fresca homogeneizada em 10 mL de acetona 80%, seguida da leitura em espectrofotômetro (Beckman, modelo 640 B) nos comprimentos de onda 645 e 663 nm. A extração e quantificação de carotenoides totais foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Duke e Kenyon (1986) com a leitura realizada a 470 nm.

As plantas foram colocadas em estufa de circulação forçada 40°C até peso constante, para determinação da matéria seca total. O teor de óleo essencial (% p/p) foi obtido através do peso do óleo essencial extraído por hidrodestilação, em aparelho de Clevenger, de 20 g de matéria seca da parte aérea, por um período de 90 minutos. Foram determinadas as produções relativas (PR%) da matéria seca total e do teor de óleo essencial, tomando como base o tratamento completo, através da equação: $PR (\%) = (PTO * 100) / PC$, onde PTO= Produção no tratamento de omissão do nutriente e PC = produção no tratamento com solução completa.

As análises químicas da fração volátil foram analisadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA. Para extração da fração volátil de folhas de *A. millefolium* empregou-se a técnica do “*headspace*” estático. Para isso utilizou-se de do extrator “*headspace*” automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/ EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais foram estabelecidos os seguintes parâmetros: temperatura de incubação da amostra de 100 °C durante 30 min, temperatura de seringa a 110 °C. O volume de injeção foi de 500 µL da fase de vapor, injetados em modo *split* na razão de 50:1. As amostras constituíram de 60 mg da parte aérea de *A. millefolium* acondicionadas em *vilas* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE. A análise foi realizada

em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z.

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e da linha de transferência para o MS foram mantidas em 230 °C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 200 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 270 °C. As concentrações dos constituintes da fração volátil foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos.

Os constituintes foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à série de *n*-alcanos C₈-C₁₈, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST SPEECH GROUP WEBSITE, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação proposta por KOVÁTS (1965) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; DAVIES, 1990).

Os dados de crescimento, produção de matéria seca total, clorofila a, b, carotenoides, teor de óleo foram submetidos a análise de variância e quando significativos submetidos ao teste de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade, pelo programa SAEG (FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Macronutrientes

3.1.1 Crescimento e pigmentos fotossintéticos

Os valores médios de crescimento em diâmetro do caule, comprimento de raízes, número de folhas, matéria seca total e a produção relativa de matéria seca total estão apresentados na Tabela 1. Além da limitação do crescimento, foram observados sintomas foliares de deficiência, como clorose amarelo avermelhada nas folhas jovens na omissão de N, coloração vermelho-arroxeadas nas folhas maduras na omissão de P, necrose do bordo para o centro das folhas maduras na omissão de K e morte dos meristemas e raízes, na omissão de Ca (Figura 1).

Tabela 1 Crescimento e produção de óleo e matéria seca de *Achillea millefolium* L. cultivadas em solução nutritiva com omissão de macronutrientes. Lavras, 2013

Tratamentos	Ø (mm)	CR (cm)	NF	MST (g.planta ⁻¹)	PRMS (%)	PRO (%)
Completo	1,30 a	36,28 b	9,80a	26,10 a	100	100
-N	0,45 b	40,81a	5,33b	7,70 c	29,50	—
-P	0,70 b	37,33b	6,5 b	14,30 b	54,79	171,62
-K	0,60 b	27,73d	6,83b	6,66 c	25,54	—
-Ca	0,25 c	12,00e	5,33b	2,20 c	8,43	—
-Mg	1,08 a	37,66b	8,83a	32,33 a	123,88	90,34
-S	1,38 a	31,93c	9,83a	27,70 a	106,13	113,41
CV(%)	23,14	7,31	17,86	24,75	—	—

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade. Ø- Diâmetro do caule, CR-comprimento de raízes, NF-número de folhas, MST- matéria seca total, PRMS-produção relativa de matéria seca, PRO-produção relativa de óleo essencial

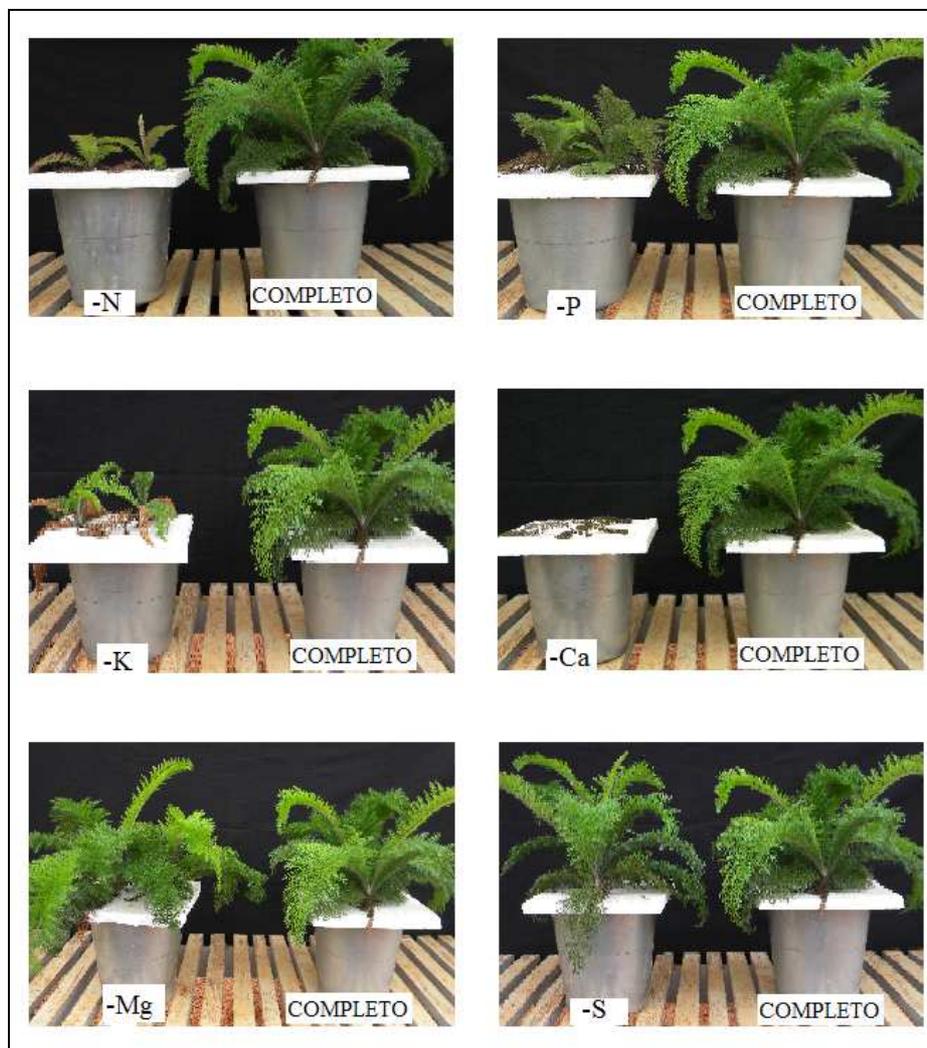


Figura 1 Aspecto geral das plantas de *Achillea millefolium* L. sobre omissão de macronutrientes. Lavras, 2013. Fonte: Arquivo pessoal

A omissão de N, K e Ca reduziram a MST aos menores valores, enquanto a omissão de P proporcionou a produção de matéria seca total, valores intermediários, quando comparados ao controle. O fósforo foi limitante para o crescimento de *Croton urucuana* Baillon, *Ocimum* sp., *Pfaffia glomerata*

(Spreng) Pedersen e *Calendula officinalis* L., diminuindo significativamente a produção de matéria seca total, isso se deve ao papel essencial do P em processos metabólicos como a síntese protéica e de ácidos nucléicos, fosforilação fotossintética e oxidativa, respiração, e ativação de enzimas específicas, além de função estrutural das membranas celulares (MOREIRA et al 2005, SORREANO et al 2008)

As produções relativas de matéria seca total foram limitadas principalmente pela omissão de Ca, K e N, onde se observa valores inferiores ao tratamento completo, porém, o Mg e S foram os que menos interferiram nesse parâmetro. Em *Mentha spicata*, Pichi et al. (2012) não observaram incremento da produção de matéria seca total, testando níveis crescentes de Ca em solução nutritiva.

As omissões de Mg e S não foram limitantes para o crescimento, apresentando diâmetros, comprimentos de raízes e produções de matéria seca total, sendo semelhantes ao controle e apresentando produções relativas de matéria seca total até superiores que o tratamento controle, indicando que a quantidade fornecida na solução de adaptação foi suficiente para manter o crescimento da planta. No controle foi observado valores médios de diâmetro do caule de 1,3mm, comprimento radicular de 36,28 cm, número de folhas de 9,8 e matéria seca total de 26,10g.

O comprimento de raízes não foi afetado pela omissão de P e Mg, enquanto a omissão de N aumentou o comprimento de raízes. Taiz e Zeiger (2006) citam que plantas em condições de deficiências nutricionais tendem a investir mais energia na produção de raízes para ampliar o potencial de absorção dos nutrientes.

Para os pigmentos fotossintéticos (Tabela 2), a ordem crescente de limitação para a clorofila *a* foi $N > S = P > Mg > K$; para a clorofila *b* foi $N=P = Mg = S > K$ e para os carotenoides foi $S = N > P > K > Mg$. Os baixos teores

observados na omissão de N está relacionada com a síntese proteica de clorofila, acarretando então redução da capacidade fotossintética e conseqüentemente perda da produção, além disso, o acúmulo de carotenoides nas omissões de K e Mg pode ser um sinal de estresse (ABBASZADEH et al., 2009).

Tabela 2 Teores de clorofilas a, b e carotenoides de *Achillea millefolium* L. cultivadas em solução nutritiva com omissão de macronutrientes. Lavras, 2013

Tratamentos	Clorofila (mg. g ⁻¹ . mf)		
	a	b	carotenoides
Completo	0,93b	0,58a	0,50a
-N	0,24d	0,15c	0,15c
-P	0,52c	0,24c	0,28b
-K	1,09a	0,40 b	0,48a
-Ca	—	—	—
-Mg	0,89b	0,28c	0,50a
-S	0,45c	0,30c	0,15c
CV(%)	10,22	12,13	13,37

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. mf- matéria fresca

3.1.2 Teor de óleo essencial e análise dos compostos voláteis

O teor de óleo não pode ser quantificado nos tratamentos com omissão de N, Ca e K, devido à baixa produção de matéria seca e pela característica de baixa produtividade da planta, sendo priorizadas as amostras para avaliação dos compostos voláteis. No controle, o teor de óleo foi de 0,069 % (p/p), condizente com os teores observados por Rahimmalek et al. (2009) e Bocevskaa e Sovová (2007) para a mesma espécie. Para os constituintes voláteis, foram identificados 25 compostos voláteis, sendo que o maior número de compostos (25) foi observado na omissão de K e o menor (18) na omissão de Mg. A ordem de

limitação dos macronutrientes para o número de constituintes foi: $Mg > S > P > S > N > K$.

Tabela 3 Compostos voláteis de *Achillea millefolium* L. cultivados em solução nutritiva com omissão de macronutrientes. Lavras, 2013

COMPOSTO	IR ¹	TRATAMENTOS						
		Completo	-N	-P	ÁREA±DP -K	-Ca	-Mg	-S
3-metil-pentanol	849	0,36±0,01	0,25±0,01	—	0,11±0,01	—	—	0,21±0,01
α -tujeno	925	1,05±0,22	1,12±0,04	0,80±0,01	0,98±0,04	1,10±0,05	1,13±0,01	0,82±0,02
α -pineno	932	1,75±0,4	1,47±0,05	1,38±0,03	1,51±0,07	1,75±0,12	1,93±0,06	1,25±0,03
canfeno	947	0,93±0,21	0,79±0,03	0,84±0,05	0,93±0,03	0,98±0,03	1,00±0,03	0,69±0,01
sabineno	972	37,68±3,25	29,97±0,45	26,21±0,03	27,46±1,09	33,06±2,04	40,75±1,08	28,28±1,10
β -pineno	976	1,91±0,28	1,87±0,02	1,75±0,45	2,03±0,09	1,92±0,15	2,10±0,08	1,59±0,05
mirceno	990	2,67±0,5	1,50±0,10	2,23±0,02	1,82±0,25	1,44±0,09	2,73±0,25	2,13±0,11
α -terpineno	1016	—	0,20±0,01	—	0,29±0,03	—	—	—
<i>p</i> -cimeno	1023	0,89±0,11	1,33±0,29	0,83±0,09	0,91±0,21	1,25±0,08	1,01±0,02	0,73±0,02
d-limoneno	1027	2,34±0,38	1,72±0,01	1,77±0,01	2,46±0,53	1,64±0,07	2,55±0,20	1,78±0,05
1,8-cineol	1030	8,33±1,41	7,74±0,66	7,05±0,29	9,38±1,88	9,63±1,31	9,74±0,52	6,19±0,26
3-hidroxi-1-noneno	1040	—	0,29±0,01	—	0,24±0,01	—	—	—
γ -terpineno	1057	2,16±0,31	0,98±0,05	1,21±0,01	2,10±0,59	1,23±0,15	2,11±1,87	1,89±0,12
hidrato de <i>trans</i> -sabineno	1065	0,84±0,11	2,95±0,35	2,46±0,66	3,01±0,18	2,30±0,15	1,07±0,01	1,28±0,11
terpinoleno	1088	—	—	—	0,30±0,08	—	—	—
tujanol	1098	0,70±0,12	1,86±0,15	1,35±0,01	1,38±0,03	1,35±0,11	0,86±0,58	1,00±0,04
borneol	1164	6,41±1,12	10,67±0,27	11,84±0,04	11,68±0,90	10,66±0,6	7,19±0,18	8,68±0,43
terpinen-4-ol	1176	—	0,61±0,05	0,40±0,35	0,56±0,09	—	—	0,35±0,01
α -terpineol	1190	2,61±0,6	3,91±0,3	4,00±0,15	2,97±0,2	3,79±0,11	3,18±0,07	3,49±0,1
acetato de bornila	1285	0,62±0,06	0,89±0,03	0,68±0,27	1,18±0,12	1,16±0,2	0,67±0,03	0,76±0,04
β -cariofileno	1417	18,04±4,69	18,54±2,42	15,68±0,05	21,38±2,33	22,55±2,82	19,75±0,03	21,26±0,93

Tabela 3, conclusão

		TRATAMENTOS						
		ÁREA±DP						
COMPOSTO	IR ¹	Completo	-N	-P	-K	-Ca	-Mg	-S
α -humuleno	1451	1,55±0,50	1,66±0,23	1,46±0,29	2,01±0,20	1,98±0,25	1,71±0,90	2,03±0,08
β -cubebeno	1479	8,77±3,73	8,42±1,58	16,02±0,02	3,9±0,94	1,07±0,45	1,53±0,09	13,21±2,86
α -farneseno	1508	0,98±0,38	0,65±0,15	0,93±0,22	0,69±0,18	—	—	0,46±0,09
óxido de cariofileno	1580	—	0,93±0,18	0,48±1,57	0,53±0,04	1,21±0,10	—	0,45±0,01
Constituintes identificados (%)		100	100	98,78	99,81	100	100	100
Nº de constituintes		20	24	21	25	19	18	22

¹Índice de retenção relativo à série n-alcanos (C₈-C₁₈) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (n=4)

Os compostos majoritários (Tabela 4) o sabineno (26,21-40,75%), 1,8-cineol (6,19 - 9,63), borneol (6,41-11,84 %), β -cariofileno (15,36-22,55%) e β -cubebeno (1,07-16,02 %), sendo que estes foram observados em outros trabalhos de caracterização dos constituintes voláteis da espécie (NADIM et al., 2011; RAHIMMALEK et al., 2009).

Tabela 4 Efeito da omissão de macronutrientes no teor de óleo e nos constituintes voláteis majoritários de *A. millefolium* L. cultivados em solução nutritiva. Lavras, 2013

Tratamentos	TO (%)	sabineno	1,8-cineol	borneol	β -cariofileno	β -cubebeno
Completo	0,069b	37,68b	8,33a	6,41d	18,04b	8,77c
-N	—	29,97c	7,74b	10,67b	18,54b	8,42c
-P	0,118 a	26,21d	7,05b	11,84a	15,68b	16,02a
-K	—	27,46c	9,38a	11,68a	21,38a	3,90 d
-Ca	—	33,06b	9,63a	10,66b	22,55a	1,07 e
-Mg	0,062c	40,75a	9,74a	7,19d	19,75a	1,57 e
-S	0,078d	28,28c	6,19c	8,68c	21,26a	13,21b
CV (%)	12,36	9,67	10,26	7,18	10,99	9,77

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

A omissão dos macronutrientes alterou os teores dos constituintes majoritários, sendo observado que, para o teor de sabineno a ordem de limitação foi: $P > N = K = S > Ca > Mg$, para o teor de 1,8 cineol foi: $S > N = P > Ca > K > Mg$; para o de borneol : $Mg > S > Ca = N > K = P$; para o de β -cariofileno: $N = P > Mg = K = Ca = S$ e para o β -cubebeno: $Ca = Mg > K > N > S > P$.

Na omissão de nitrogênio, foram identificados 24 compostos, quatro a mais que o controle, sendo eles o α - terpineno (0,20%), 3-hidroxi-1-noneno (0,29%), terpinen-4-ol (0,61%) e óxido de cariofileno (0,93%). Entre os

majoritários, houve a redução no constituinte sabineno (29,97%), 1,8 cineol (7,74%) e β - cubebeno (8,42%), aumento no borneol (10,67%) e de β -cariofileno (18,54%). Em *Ocimum basilicum* L. foi observado produções crescentes de linalol e eucaliptol, com incremento das doses de N (ZHELJAZKOV et al., 2008). Tatar et al. (2013) observaram variações nos teores de 1,8 cineol e α -humuleno para *A. millefolium* L. com aplicações do nutriente em diferentes épocas de cultivo

Na omissão de fósforo, foram identificados 22 constituintes, sendo observados a presença de α -bergamoteno (0,44%) e o óxido de cariofileno (0,48%). Nos majoritários, houve redução do teor de sabineno (26,215), 1,8 cineol (7,05%), β -cariofileno (15,68%), e aumento dos teores de borneol (11,84%) e de β -cubebeno (16,02) que praticamente dobrou seu teor nesse tratamento. O teor de óleo essencial foi o maior entre os tratamentos, apresentando um teor de 0,116%.

O P está vinculado a processos metabólicos como a síntese proteica e de ácidos nucléicos, fosforilação fotossintética e oxidativa, respiração, e ativação de enzimas específicas, além de função estrutural das membranas celulares. A suplementação com P em solução nutritiva favoreceu o aumento do número de compostos em *Origanum dictamnus* e em *Pelargonium* spp. (ECONOMAKIS et al., 2002; PRASSAD et al., 2012).

Potássio-Nesse tratamento foi observado o maior número de constituintes, sendo identificados cerca de 25, sendo que os que não estavam presentes no tratamento controle eram o α - terpineno (0,29%), 3-hidroxi-1-noneno (0,24%), terpinoleno (0,30%), terpinen-4-ol (0,56%), e o óxido de cariofileno (0,53%). Entre os majoritários, houve redução no constituinte sabineno (27,46%) e β -cubebeno (3,9%), sendo incrementados os compostos 1,8 cineol (9,38%), borneol (11,68%) e β -cariofileno (21,38%).

O potássio desempenha papel importante como cofator de mais de 40 enzimas, manutenção do pH celular e balanço de íons na planta. Maiores doses de potássio aumentaram proporcionalmente os compostos em *Rosmarinus officinalis* L. e *Salvia officinalis* L. (TOUNEKTI et al.,2010, TOUNEKTI et al.,2011).

Cálcio-Apesar da morte da planta aos 15 dias de cultivo, foram identificados cerca de 19 compostos, com a ausência do 3-metil-pentanol, α -farneseno e a presença de óxido de cariofileno (1,21%). Nos componentes majoritários, houve redução do sabineno (33,06%) e β - cubebeno (1,07%), e aumento dos componente 1,8 cineol (9,63%), borneol (10,66%) e β - cariofileno (22,55%).

O cálcio desempenha papel importante no crescimento vegetal, sendo importante para divisão celular e na síntese de novas paredes celulares, sendo relatado para a *Satureja hortensis* L. o aumento dos teores de carvacrol, γ -terpinene e β -bisabolleno com a aplicação de CaCO_3 ao solo de cultivo, mesma resposta observada para *Ocimum basilicum* para os teores de linalol, 1,8-cineole, geranil, α -terpinolene e β -pineno (MUMIVAND et al.; 2011; DZIDA, 2010).

A omissão de Mg proporcionou o menor número de constituintes voláteis dentre os macronutrientes, sendo observados 18 compostos, com a ausência do 3-metil-pentanol e do α - farneseno. Houve aumento da produção de sabineno (40,75%), 1,8 cineol (9,74%), borneol (7,19%) e β -cariofileno (19,75%), havendo apenas a redução do β -cubebeno (1,53%). O teor de óleo observado foi estatisticamente igual ao controle, apresentando teor de 0,062 %. O estudo conduzido por Szoke et al. (2004) indicou resposta positiva da planta a disponibilidade do elemento para a produção de compostos voláteis em *in vitro* de *Chamomilla recutita* L. O Mg participa da molécula de clorofila e como é facilmente redistribuído pela planta, os sintomas são visíveis em folhas velhas (SORREANO et al., 2008).

Na omissão do enxofre, cerca de 22 compostos foram identificados, sendo observada a ausência do terpinen-4-ol (0,35%), α -farneseno (0,46%) e o óxido de cariofileno (0,45%). Os constituintes sabineno (28,28%) e 1,8 cineol (6,19%) sofreram redução em seus teores, enquanto o borneol (8,68%), β -cariofileno (21,26%) e β -cubebeno (13,21%) tiveram seus teores aumentados.

A omissão de enxofre incrementou o teor de óleo, sendo superior ao tratamento controle, com 0,078%. O enxofre participa na formação de aminoácidos e proteínas sulfonadas (ferredoxinas) e como cofator de enzimas no metabolismo e promoveu o aumento da produção de óleo essencial em *Ocimum basilicum* L. (manjeriço) (ZHELJAZKOV et al., 2008).

Os macronutrientes são mais limitantes na produção vegetal por participarem, principalmente, da síntese proteica, no crescimento e regulação osmótica dos tecidos, sendo encontrados em níveis relativamente maiores que os micronutrientes, assim o maior fornecimento desses nutrientes permite maiores produtividades (TAIZ; ZEIGER, 2006).

3.2 Micronutrientes

3.2.1 Crescimento e pigmentos fotossintéticos

Os parâmetros de crescimento de *A. millefolium* L. estão representados na tabela 5 onde nota-se que, entre os micronutrientes, o Fe e o Zn foram limitantes para a produção de matéria seca total, sendo os únicos com produções relativas de matéria seca inferiores ao controle, 74,07 e 67,94% respectivamente. Nesses tratamentos foram observados sintomas de deficiência nutricional, principalmente no Fe, onde as plantas apresentaram clorose generalizada e queima dos bordos dos folíolos. Nas plantas com deficiência de Zn foi

observado o enrolamento das folhas jovens, e queima marginal das folhas velhas (Figura 2).

Tabela 5 Crescimento e produção de óleo e matéria seca de *Achillea millefolium* L. cultivadas em solução nutritiva com omissão de micronutrientes. Lavras, 2013

Tratamentos	Ø (mm)	CR (cm)	NF	MST (g)	PRMS (%)	PRO (%)
Completo	1,30 a	36,28 b	9,80 a	26,10 a	100	100
-Fe	1,08 a	42,93a	7,20a	19,33 b	74,07	89,13
-Zn	0,95 a	27,90c	6,83b	17,73 b	67,94	93,67
-Mo	1,20 a	35,46b	9,00a	35,66 a	136,65	88,80
-B	1,26 a	35,40b	8,77a	28,06 a	107,54	122,08
-Mn	1,46 a	35,41b	9,66a	33,95 a	130,08	139,99
-Cu	1,53 a	36,76b	10,5a	30,28 a	116,03	77,18
CV(%)	23,14	7,31	17,86	24,75	—	—

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Ø- Diâmetro do caule, CR-comprimento de raízes, NF-número de folhas, MST- matéria seca total, PRMS-produção relativa de matéria seca, PRO-produção relativa de óleo essencial

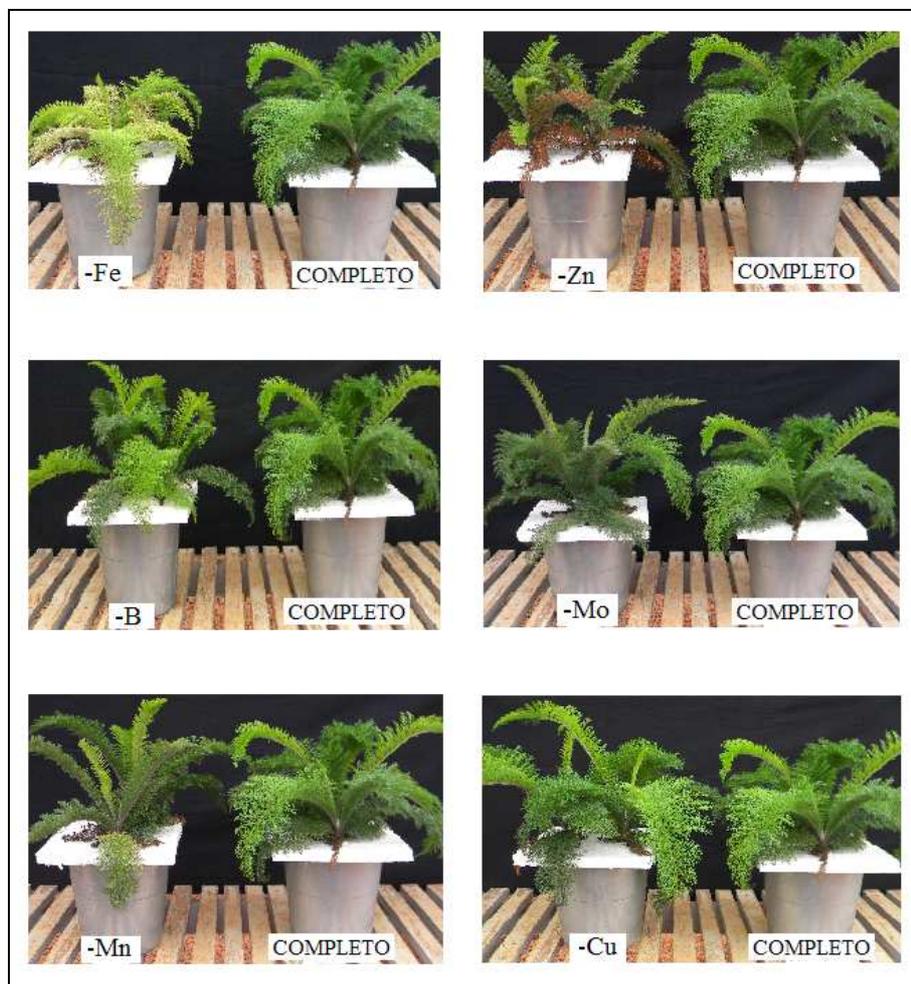


Figura 2 Aspecto geral das plantas de *Achillea millefolium* L. sobre omissão de micronutrientes. Lavras, 2013. Fonte: Arquivo pessoal

A aplicação foliar de Fe e Zn em *Matricaria recutita* favoreceu a produção de capítulos florais, indicando que a suplementação de Fe pode ser uma ferramenta importante para a produção em plantas medicinais (NASIRI et al., 2010). Os teores de clorofila total e de carotenoides foram inferiores ao controle (Tabela 6). O Zn participa em várias atividades enzimáticas e no desenvolvimento dos cloroplastos.

Tabela 6 Teores de clorofilas a, b e carotenoides de *Achillea millefolium* L. cultivadas em solução nutritiva com omissão de micronutrientes. Lavras, 2013

Tratamentos	Clorofila (mg.g ⁻¹ . mf)		
	a	b	carotenoides
Completo	0,93b	0,58a	0,50a
-Fe	0,26d	0,23c	0,22c
-Zn	0,67c	0,24c	0,30b
-Mo	1,08a	0,51a	0,62 a
-B	0,78b	0,44b	0,55 a
-Mn	0,55c	0,37b	0,44 a
-Cu	0,92b	0,43b	0,59 a
CV(%)	10,22	12,13	13,37

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. mf- matéria fresca

O B apresentou poucos sintomas de deficiência, que foi o crescimento desordenado dos folíolos, devido à participação desse elemento no processo de divisão celular, além de um decréscimo dos teores de clorofila a e b, porém sua omissão não prejudicou a produção relativa de matéria seca total e nem de óleo.

As omissões de Mn, Mo e Cu não prejudicaram as produções relativas de matéria seca total, para as produções relativas de óleo, as omissões de B e Mn não foram prejudiciais. A ordem de limitação para a produção de matéria seca total foi Zn = Fe > B = Cu = Mn = Mo, o que pode indicar que os teores de Mo, Mn, Cu e B presentes na solução completa influenciou negativamente a produção de MST.

Para os pigmentos fotossintéticos, a ordem crescente de limitação para a clorofila a foi Fe > Mn = Zn > B = Cu > Mo; para a clorofila b foi Zn = Fe > B = Mn = Cu > Mo e para os carotenoides foi Fe > Zn > Mn = Mo = B = Cu.

3.2.2 Teor de óleo essencial e análise dos compostos voláteis

Foram identificados 25 constituintes voláteis, estão representados na tabela 7, sendo observado que o número de constituintes foi limitado seguindo a ordem: B > Mo = Cu > Zn > Fe > Mn, onde a omissão de Mn proporcionou o maior número de constituintes (22) e a de B, o menor número, com 18.

Tabela 7 Compostos voláteis de *Achillea millefolium* L. cultivados em solução nutritiva com omissão de micronutrientes. Lavras, 2013

COMPOSTO	IR ¹	TRATAMENTOS					
		AREA±DP					
		-Fe	-Zn	-B	-Mn	-Mo	-Cu
3-metil-pentanol	849	—	—	0,37±0,01	0,26±0,08	—	—
α-tujeno	925	0,91±0,03	0,81±0,02	1,33±0,2	0,74±0,19	0,81±0,05	0,59±0,04
α-pineno	932	1,38±0,06	1,32±0,03	2,04±0,31	1,17±0,34	1,32±0,08	0,97±0,07
canfeno	947	0,74±0,02	0,79±0,01	1,08±0,14	0,63±0,18	0,71±0,03	0,53±0,02
sabineno	972	29,41±0,78	27,72±0,73	44,28±5,72	26,04±6,08	28,39±1,68	20,82±1,69
β-pineno	976	1,81±0,05	1,51±0,03	2,17±0,25	1,46±0,19	1,51±0,09	1,12±0,08
mirceno	990	1,92±0,05	1,77±0,04	2,60±0,4	1,61±0,29	1,74±0,1	1,35±0,09
p-cimeno	1023	0,86±0,01	0,85±0,02	0,99±0,05	0,63±0,13	0,81±0,05	0,61±0,04
d-limoneno	1027	1,96±0,05	1,76±0,06	2,53±0,29	1,64±0,26	1,73±0,1	1,33±0,1
1,8-cineol	1030	6,95±0,25	6,25±0,12	9,48±1,03	5,85±1,48	6,90±0,43	5,20±0,43
γ-terpineno	1057	1,59±0,04	1,3±0,07	1,91±0,23	1,59±0,16	1,47±0,11	1,11±0,07
hidrato de <i>trans</i> -sabineno	1065	1,57±0,11	1,1±0,12	0,84±0,07	0,87±0,17	0,94±0,09	0,71±0,06
tujanol	1098	1,07±0,06	0,93±0,13	0,61±0,11	0,73±0,14	0,70±0,06	0,52±0,03
borneol	1164	8,95±0,33	9,3±0,82	5,61±1,33	6,33±0,9	6,77±0,72	4,89±0,25
terpinen-4-ol	1176	0,41±0,02	—	—	0,29±0,01	—	—
α-terpineol	1190	3,65±0,1	2,97±0,31	2,38±0,52	2,53±0,41	2,77±0,26	2,22±0,06
acetato de bornila	1285	0,89±0,04	0,94±0,01	—	0,59±0,03	0,58±0,04	—
β-cariofileno	1417	22,28±0,42	24,83±0,77	17,2±5,07	17,58±3,34	21,04±1,05	13,95±0,99
α-humuleno	1451	2,00±0,04	2,22±0,06	1,50±0,52	1,63±0,40	1,89±0,08	1,28±0,08
β-cubebeno	1479	9,80±0,71	11,65±1,88	3,19±1,46	24,18±3,51	18,39±3,82	38,48±3,06

Tabela 7, conclusão

TRATAMENTOS							
COMPOSTO	IR ¹	AREA±DP					
		-Fe	-Zn	-B	-Mn	-Mo	-Cu
α -bergamoteno	1494	—	—	—	—	—	1,24±0,17
α -farneseno	1508	1,71±0,18	1,3±0,23	—	3,41±0,27	1,75±0,4	3,28±0,44
óxido de cariofileno	1580	0,56±0,03	0,58±0,04	—	0,40±0,01	—	—
Constituintes identificados (%)		99,99	99,99	100	99,15	100	100
Nº de constituintes		21	20	18	22	19	19

¹Índice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₁₈) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (n=4)

O teor de óleo essencial nas omissões de micronutrientes apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05\%$) entre eles, sendo que nas omissões de Mn e B foram os que apresentaram os maiores teores (0,096% e 0,084% respectivamente), assim a limitação dos micronutrientes para o teor de óleo seguiu a ordem $Cu > Fe = Zn = B > Mn > Mo$.

Os compostos majoritários (Tabela 8) identificados foram o sabineno, com os teores entre 20,82-37,68%, 1,8 cineol (5,20-9,48%), borneol (4,89-9,30%) β -cariofileno (19,95-24,83%) e β -cubebeno (3,19-38,44%).

Tabela 8 Efeito da omissão de micronutrientes na produção dos compostos voláteis majoritários de *A. millefolium* L. cultivados em solução nutritiva. Lavras, 2013

Tratamentos	TO (%)	sabineno	1,8-cineol	borneol	β -cariofileno	β -cubebeno
Completo	0,069c	37,68b	8,33a	6,41c	18,04b	8,77e
-Fe	0,061d	29,41c	6,95b	8,95b	22,28a	9,80d
-B	0,064d	44,28a	9,48a	5,61d	17,20b	3,19f
-Zn	0,061d	27,72c	6,25c	9,30a	24,83a	11,65d
-Mn	0,084b	26,04d	5,85c	6,33c	17,58b	24,18b
-Mo	0,096a	28,39c	6,90b	6,77c	21,04a	18,39c
-Cu	0,053e	20,82e	5,20c	4,89d	19,95c	38,48a
CV (%)	12,36	9,67	10,26	7,18	10,99	9,77

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

Os micronutrientes influenciaram nos teores dos constituintes majoritários, sendo observado que para o teor de sabineno, a ordem de limitação foi: $Cu > Mn > Zn = Fe = Mo > B$; para o 1,8 cineol: $Cu = Mn = Zn > Fe > B$; para o borneol: $B = Cu > Mn = Mo > Fe > Zn$; para o β -cariofileno: $Cu > B = Mn > Fe = Zn = Mo$, sendo o que menos variou com a omissão dos micronutrientes e para o β -

cubebeno: B > Fe > Mo > Zn > Mn > Cu, que por sua vez foi o que mais variou entre os compostos majoritários.

Na omissão de ferro foram identificados 21 compostos, não estando presente o 3 metil-pentanol, sendo presentes o terpinen-4-ol (0,41%) e óxido de cariofileno (0,56%). Para os majoritários, houve redução dos teores de sabineno (29,41%), 1,8 cineol (6,95%) e aumento dos teores de borneol (8,95%), β -cariofileno (22, 28%) e β -cubebeno (9,80%). O teor de óleo foi prejudicado em função da omissão do elemento, com teor de 0,061%.

Com relação ao zinco, foram identificados 20 voláteis, porém com a ausência do 3-metil-pentanol, e presença do óxido de cariofileno. Houve diminuição dos teores de sabineno (27,72 %), 1,8 cineol (6,25%), e aumento dos teores de borneol (6,41%), β -cariofileno (24,83%) e β -cubebeno (11,65%). O teor de óleo foi inferior ao controle com teor de 0,064%.

A aplicação foliar de Fe e Zn em *Matricaria recutita* L. favoreceu a produção de capítulos florais, e em *Ocimum basilicum* L. favoreceu o crescimento e a produção de óleo essencial quando cultivados em solos salinos, sendo observado também um incremento significativo do teor de linalol. O fornecimento de níveis adequados de Fe e Zn em plantas medicinais pode incrementar a produção de metabólitos de interesse, pois esses elementos atuam na produção de clorofila e na rota do ácido chiquimico, como cofatores de enzimas (GUANGQIU; CHONGLING; HAOLIANG, 2007; MORTEL et al., 2006).

No tratamento com omissão de B foram identificados apenas 18 compostos, não apresentando os compostos acetato de bornila e α -farneseno. Houve aumento dos teores de sabineno (44,28%) e 1,8 cineol (9,48%) e diminuição dos teores de borneol (5,61%), β -cariofileno (17,20%) e β -cubebeno (3,19%). O teor de óleo foi superior ao controle, com 0,084%. O boro está relacionado em complexos de componentes da parede celular, na atividade

enzimática e alongamento o e divisão celular. Em *Curcuma longa* L. foi observado que a deficiência de boro alterou o acúmulo de curcumina e de óleo essencial (DIXIT; SRIVASTAVA; SHARMA, 2002).

Sem a disponibilidade de manganês, 22 compostos foram identificados na omissão de Mn, onde se constatou a presença de terpinen-4-ol (0,29%) e o óxido de cariofileno (0,40%). Houve diminuição dos teores de sabineno, 1,8 cineol, (5,85%), borneol (6,33%) e β - cariofileno (17,58%), sendo observado o aumento de quase 3 vezes do teor de β -cubebeno (24,18%). O tratamento com omissão de Mn apresentou teor de óleo maior que o controle, com 0,096%.

Com a omissão do molibdênio, foram identificados 19 compostos no tratamento, sendo notada a ausência de 3-metil-pentanol, havendo decréscimo do teor de sabineno (28,39%), 1,8 cineol (6,90%) e aumento dos teores de borneol (6,77%), β - cariofileno (21,04%) e do β - cubebeno (18,39%). O teor de óleo foi inferior ao controle, com 0,061%.

Com relação à omissão do cobre, foram observados 19 compostos, com a ausência do 3-metil-pentanol e acetato de bornila e presença do α -bergamoteno (1,24%), houve diminuição do teor de sabineno (20,82%), 1,8 cineol (5,20%), borneol (4,89%) e β - cariofileno (13,48%) e destaque para o aumento do teor de β - cubebeno, que foi o maior entre todos os tratamentos, representando cerca de 38,48% dos compostos voláteis. A omissão do elemento prejudicou a produção de óleo, com teor de 0,053%.

O manganês atua na ativação de algumas enzimas, resistência a doenças e participação na produção de metabólicos secundários, já o molibdênio esta relacionado com a transferência de elétrons, fixação de N e síntese de proteínas, enquanto o cobre participa na desintoxicação de radicais livres, lignificação e viabilidade de pólen (WELCH; SHUMAN, 1995; YRUELA, 2009).

Os micronutrientes são importantes cofatores de enzimas, inclusive das terpeno-sintases, que são responsáveis pela produção desses compostos, com

isso, a omissão de um ou outro nutriente pode favorecer a atividade de uma ou mais enzimas, alterando as rotas biossintéticas, resultando nas diferenças observadas tanto na composição, como nos teores dos constituintes (DEWICK, 2002).

4 CONCLUSÃO

A ordem crescente de limitação de macronutrientes para produção de matéria seca total foi: Ca = K = N > P > S > Mg e para os micronutrientes foram: Zn > Fe > B > Cu > Mn > Mo.

A ordem crescente de limitação de macronutrientes da espécie para o teor de óleo essencial foram Ca = N = K > Mg > S > P e para os micronutrientes foram Cu > Fe > Mo > Zn > B > Mn.

A *Achillea millefolium* L. alterou significativamente as produções de matéria seca total, teor de óleo essencial e compostos voláteis em função da omissão de macro e micronutrientes, com isso, pode-se adequar um manejo de adubação aliando a produção aos teores de óleo e de compostos voláteis, obtendo-se então uma matéria prima vegetal de qualidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPEMIG, CAPES e CNPQ o auxílio financeiro para a realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

ABBASZADEH, B. et al. Nitrogenous fertilizer influence on quantity and quality values of balm (*Melissa officinalis* L.) **Journal of Agriculture, Extension and Rural Development**, Prabhakaran, v. 1, p. 31-33, 2009.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publish Corporation, 2007.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v.24, n.1, p. 1-15, Jan. 1949.

BENEDECK, B. et al. Choleric effects of yarrow (*Achillea millefolium* L.) in the isolated perfused rat liver. **Phytomedicine**, Jena, v13, n.9-10, p.702-706, Nov. 2006.

BOCEVSKAA, M.; SOVOVÀ, H. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from yarrow. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 40, p. 360-367, 2007.

BOZIN, B. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl sl and *A. pannonica* Scheele essential oils. **Molecules**, Basel, v. 13, n. 9, p. 2058-2068, Sept. 2008.

BURK, D.R.; CICHACZ, Z.A.; DASKALOVA, S. M. Aqueous extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) inflorescences suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairobi, v. 4, n.3, p. 225-234, Feb. 2010.

DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 503, n. 1, p. 1-24, 1990.

DEWICK, P.M. The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 19, n. 2, p. 181-222, 2002.

DIXIT, D.; SRIVASTAVA, N.; SHARMA, S. Boron deficiency induced changes in translocation of $^{14}\text{CO}_2$ -photosynthate into primary metabolites in relation to essential oil and curcumin accumulation in turmeric (*Curcuma longa* L.). **Photosynthetica**, Prague, v.40, n. 1, p.109-113, 2002.

DUKE, S.O.; KENYON, W.H. Effects of dimethazone (FMC 57020) on chloroplast development II: Pigment synthesis and primary leaves. **Pesticide Biochemistry Physiology**, Oxford, v. 25, n. 1, p.11-18, 1986.

DZIDA, K. Biological value and essential oil content in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) depending on calcium fertilization and cultivar. **Acta Scientiarum Polonorum- Hortorum Cultus**, Lublin, v. 9, n. 4, p. 153-161, 2010.

ECONOMAKIS, C. et al. Effect of phosphorus concentration of the nutrient solution on the volatile constituents of leaves and bracts of *Origanum dictamnus*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 22, p. 6276-6280, Nov. 2002.

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES. **Sistema para análises estatísticas e genéticas** – SAEG: versão 9.1. Viçosa, MG: UFV, 2007.

GUANGQIU, Q.; CHONGLING, Y.; HAOLIANG, L. Influence of heavy metals on the carbohydrate and phenolics in mangrove, *Aegiceras corniculatum* L., seedlings. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 78, n. 6, p. 440-444, June. 2007.

GUÉDON, D.; ABBE, P.; LAMAISON, J. L. Leaf and flower head flavonoids of *Achillea millefolium* L. subspecies. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 607-611, July, 1993.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. **California Agricultural Experiment Station**, San Francisco, v. 347, p.427-439, 1950.

KINDLOVITS, S.; NÉMETH, É. Sources of variability of yarrow (*Achillea* SPP.) essential oil. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 41, n.1, p. 92-103, Sept. 2012.

KOVÁTS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. **Advances in Chromatography**, New York, v. 1, p. 229-247, 1965.

LAKUSIC, D.V. et al. Environment-related variations of the composition of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in the Balkan Peninsula. **Chemical Biodiversity**, v. 9, n. 7, p. 1286-1302, 2012.

LOPEZ-LAZARO, M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 31-59, 2009.

MOREIRA, P. A. et al. Desenvolvimento vegetativo e teor foliar de macronutrientes da calêndula (*Calendula officinalis* L.) adubada com nitrogênio e fósforo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.1, p.18-23, 2005.

MORTEL, J.E. de van et al. Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiology**, Rockville, v.142, n.3, p. 1127-1147, Nov. 2006.

MUMIVAND, H. et al. Plant growth and essential oil content and composition of *Satureja hortensis* L. cv. Saturn in response to calcium carbonate and nitrogen application rates. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairobi, v. 5,n. 10, p. 1859-1866, May 2011.

NADIM, M.M. et al. The Essential Oil Composition of *Achillea millefolium* L. cultivated under tropical condition in India. **World Journal of Agricultural Sciences**, Peshawar, v.7, n.5, p.561-565, 2011.

NASIRI, Y.; et al. Effects of foliar application of micronutrients (Fe and Zn) on flower yield and essential oil of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairobi, v. 4, n. 17, p. 1733-1737, Sept. 2010.

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. Topic detection and tracking evaluation. 2008. Disponível em: <<http://www.nist.gov/speech/test/tdt/>>. Acesso em: 03 jul. 2012.

PADALIA, R.C. et al. Chemical diversity in the genus *Alpinia* (Zingiberaceae): comparative composition of four *Alpinia* species grown in Northern India. **Chemical Biodiversity**, Weinheim, v. 7, n. 8, p. 2076-2087, 2010.

PICHI, D.G. et al. Cálcio e fitorreguladores no desenvolvimento e estado nutricional de *Mentha spicata* x *suaveolens* cultivada em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.3, p.446-452, 2012.

POTRICH, F.B et al. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: Involvement of the antioxidant system. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v.130, n.1, p. 85–92, July 2010.

PRASAD, A.; et al. Microbial and chemical sources of phosphorus supply modulate the yield and chemical composition of essential oil of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) in sodic soils. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 48, n. 1, p. 117-122, Jan. 2012.

RAHIMMALEK, M. et al. Essential oil variation among and within six *Achillea* species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v.29, n. 2-3, p. 348-355, Mar. 2009.

SORREANO, M.C.M. et al. Deficiência de macronutrientes em mudas de sangra d'água (*Croton urucurana*, Baill.) **Cerne**, Lavras, v. 14, n. 2, p. 126-132, 2008.

SZOKE, E. et al. Effect of magnesium on essential oil formation of genetically transformed and non-transformed chamomile cultures. **Journal of the American College of Nutrition**, Abingdon, v. 23, n. 6, p. 763s-767s, Dec. 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 722p.

TATAR, Ö. et al. Physiological and biochemical responses of *Achillea millefolium* group-related cultivar to a different nitrogen regimes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Sofia, v. 27, n. 2, p. 3649-3653, Apr. 2013.

TOUNEKTI, T. et al. Influence of ionic interactions on essential oil and phenolic diterpene composition of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 10-11, p. 813-821, Otc./Nov. 2010.

TOUNEKTI, T. et al. Ionic interactions and salinity affect monoterpene and phenolic diterpene composition in rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, New York, v. 174, n. 3, p. 504-514, 2011.

VERMA, R.S. et al. Phytochemical diversity of *Murraya koenigii* (L.) Spreng. from western Himalaya. **Chemistry and Biodiversity**, Weinheim, v. 10, n.4,p. 628-641, Apr. 2013.

WELCH, R. M.; SHUMAN, L. Micronutrient nutrition of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 14, n. 1, p. 49-82, 1995.

YOUSEFZADEH, S. et al. Effects of Azocompost and urea on the herbage yield and contents and compositions of essential oils from two genotypes of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) in two regions of Iran. **Food Chemistry**, Oxford, v.138, n.2-3, p. 1407-1413, May 2013.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 36, n. 5, p. 409-430, 2009.

ZHANG, D. et al. Environmental Control of Flowering and Growth of *Achillea millefolium* L. Summer Pastels'. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 3, p. 364-365, 1996.

ZHELJAZKOV, V. D. et al. Productivity, oil content, and oil composition of sweet basil as a function of nitrogen and sulfur fertilization. **Hortscience**, Alexandria, v. 43, n. 5, p. 1415-1422, 2008.

CAPÍTULO 4

Efeito da qualidade e intensidade luz e tdz no crescimento, multiplicação e produção de constituintes voláteis de *Achillea millefolium* L. cultivada *in vitro*

RESUMO

O cultivo *in vitro* de plantas medicinais é uma ferramenta importante para a agricultura, permitindo a produção em grande escala de metabólitos de interesse. O trabalho avaliou o crescimento, os compostos voláteis e a multiplicação de *A. millefolium* sob a influência de diferentes qualidades de luz, através da utilização de LEDs, nas cores verde, azul, vermelho, branca, luz fluorescente branca fria, diferentes níveis de luz (13,14; 27,79; 35,05; 47,03 e 69,00 $\mu\text{mol. m}^2. \text{s}^{-1}$), e diferentes concentrações de Thidiazuron (0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg.L^{-1}) no cultivo *in vitro*. Os resultados observados indicaram que a luz no espectro do azul ou a intensidade de 27,79 $\mu\text{mol. m}^2. \text{s}^{-1}$ e como as mais favoráveis para a micropropagação, apresentando maiores produções de matéria seca da parte aérea, de raízes, total, porcentagem de sobrevivência e enraizamento, número e comprimento das raízes. Na multiplicação, a concentração de 0,25 mg.L^{-1} de TDZ proporcionou maior número de brotações com maior comprimento e matéria seca. Os compostos majoritários identificados foram o sabineno, 1,8 cineol, borneol, β -cariofileno e β -cubebeno. Pelos resultados observados, tanto para a micropropagação quanto para os compostos voláteis, a luz é um fator de cultivo que pode ser utilizado de modo eficiente para manipular a produção de compostos de interesse, bem como a multiplicação *in vitro*, utilizando o regulador TDZ.

Palavras-chave: Milfolhas. Micropropagação. Óleo essencial. Sabineno.

ABSTRACT

In vitro cultivation of medicinal plants is an important tool for agriculture, allowing large-scale production of metabolites of interest. The study evaluated the growth, volatile compounds and the multiplication of *A. millefolium* L. under the influence of different qualities of light through the use of LEDs, in the colors green, blue, red, white, cool white fluorescent light, light of different levels (13,14, 27,79, 35,05, 47, 03 and 69.00 mol. m². s⁻¹), and different concentrations of TDZ (0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0 mg L⁻¹) *in vitro*. The observed results indicated that light in the blue spectrum or intensity of 27.79 μmol. m². s⁻¹ and as the most favorable for micropropagation, with higher dry matter production of shoots, roots, total percentage of survival and rooting, number and length of roots. In multiplication, the concentration of 0.25 mg L⁻¹ TDZ gave more shoots with greater length and dry matter. The major compounds identified were sabinene, 1,8 cineol, borneol, β-caryophyllene and β-cubebeno. The major compounds identified were sabinene, 1,8 cineol, borneol, β-caryophyllene and β-cubebeno. The observed results, both for the micropropagation and for the volatile compounds, light is a factor to culture may be used to effectively handle the production of compounds of interest as well as the proliferation *in vitro* using the pgr TDZ.

Keywords: Yarrow. Micropropagation. Essential oil. Sabinene.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* de plantas medicinais é uma ferramenta tecnológica importante, pois permite um cultivo intenso, rápido e em larga escala. Além disso, fatores como clima, tipo de solo, sazonalidade, que interferem no cultivo convencional em campo, não são limitantes para o cultivo em salas de crescimento ou biofabricas (COLE et al., 2009).

Apesar de apresentar essas vantagens, o cultivo *in vitro* passa por uma série de adequações metodológicas, que verificam quais são as melhores formas de assepsia dos explantes, condições de crescimento, multiplicação e o efeito dos reguladores de crescimento, de modo a se determinar um protocolo de estabelecimento mais adequado para cada espécie (INÁCIO et al., 2010; ALATAR et al., 2012).

Entre os fatores que interferem nesse processo, pode-se citar a assepsia, que evita os prejuízos pela contaminação dos explantes por fungos e bactérias, o tipo e posição do explante, que esta relacionada com o balanço hormonal. O fotoperíodo, intensidade e qualidade de luz também interferem sobre o crescimento *in vitro*, principalmente em plantas medicinais, pois se sabe que o fator luz afeta o metabolismo primário e secundário e pode ser adequado para a produção de metabólicos de interesse (PALÚ et al., 2011).

Os reguladores de crescimento permitem a produção de calos, regeneração, multiplicação, organogênese, enraizamento e crescimento das plantas *in vitro*, devendo ser avaliados em diferentes concentrações para determinar em quais níveis e combinações se obtêm as melhores respostas (PALMA et al., 2013; JANA et al., 2013).

O objetivo com o trabalho foi avaliar o crescimento, multiplicação e os compostos voláteis de *Achillea millefolium* L. em cultivo *in vitro* sob diferentes condições de luz (intensidade e qualidade luz), e concentrações de TDZ.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Para o estabelecimento *in vitro* da espécie, utilizou-se o segmento terminal do rizoma. As plantas matrizes (Figura 1) foram cultivadas em casa de vegetação em regime de fertirrigação, que foi realizada duas vezes ao dia, sobre o substrato areia lavada. A solução nutritiva foi formulada com as seguintes fontes e concentrações (mg.L^{-1}): CaNO_3 :760; NH_4SO_4 : 225; KCl 400; MgSO_4 :375; Tenso Ferro[®] 44; Mn SO_4 :6,72; HBO_3 :3,28; ZnSO_3 : 0,56; CuSO_4 : 0,36; NaMoO_4 :0,05 e Mono amônio fosfato (MAP):110.



Figura 1 Plantas matrizes de *A. millefolium* cultivadas em areia sob sistema de fertirrigação. Lavras, 2013. Fonte: Arquivo pessoal.

Inicialmente, os segmentos de rizoma com 20 mm foram reduzidos a 10 mm, com auxílio de pinça e bisturi. Os explantes (gemas terminais do rizoma) foram lavados com 4 gotas de sabonete líquido Protex[®] e enxaguados com água corrente, por 30 minutos. Após o enxágue, foram imersos em álcool 70% por 10 segundos e colocados em solução água sanitária 50% e agitação por 20 minutos.

Em capela asséptica de fluxo laminar, os explantes foram lavados quatro vezes com água destilada autoclavada, sendo as duas primeiras lavagens realizadas em 30 segundos, e as subsequentes em 1 minuto, posteriormente, foram excisados a um tamanho de 5 mm e inoculados em tubos de ensaio, 150 x 25 mm, contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Os tubos de ensaio contendo o meio de cultura foram autoclavados a uma temperatura de 125° C, por 25 min e pressão de 1,50 atm, antes de receberem os explantes. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, com lâmpadas brancas frias fluorescentes e intensidade de 32 $\mu\text{mols. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, e temperatura de 25 +/- 2,5°C.

Para a multiplicação, aos 45 dias de cultivo, as plântulas estabelecidas foram repicadas e transferidas para frascos contendo 40 mL de meio de MS + TDZ (Thiadizuron), na concentração de 0,5 mg.L^{-1} . Após 30 dias de permanência no regulador de crescimento, (Figura 2) as múltiplas brotações viáveis, com 2 cm de comprimento e 4 folhas desenvolvidas, foram individualizadas, lavadas em água estéril, reduzidas ao tamanho de 1 cm e inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS, formando então os explantes a serem utilizados nos tratamentos de qualidade e intensidade de luz.

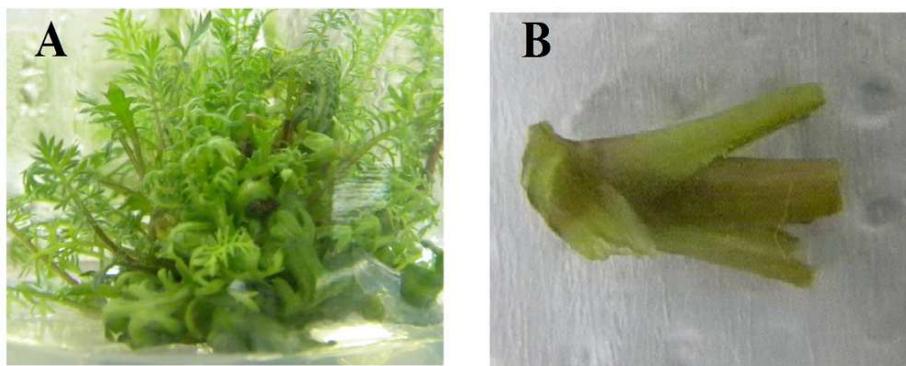


Figura 2 A-Múltiplas brotações de *A. millefolium* L. cultivadas durante 30 dias em MS+ 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ. B-Explante utilizado para os experimentos

2.1 Qualidades de Luz

Após a inoculação nos tubos de ensaio, as plântulas foram mantidas sob lâmpadas LED (*Light Emission Diode*) com espectros azul, vermelho, branco verde e lâmpada fluorescente branca fria (Gráfico 1). Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo 5 tratamentos com 4 repetições e 5 tubos por repetição. Os espectros de luz foram aferidos através do espectrômetro portátil SPECTRA PEN Z850, (Qubit Systems-Kingston, Ontario-USA).

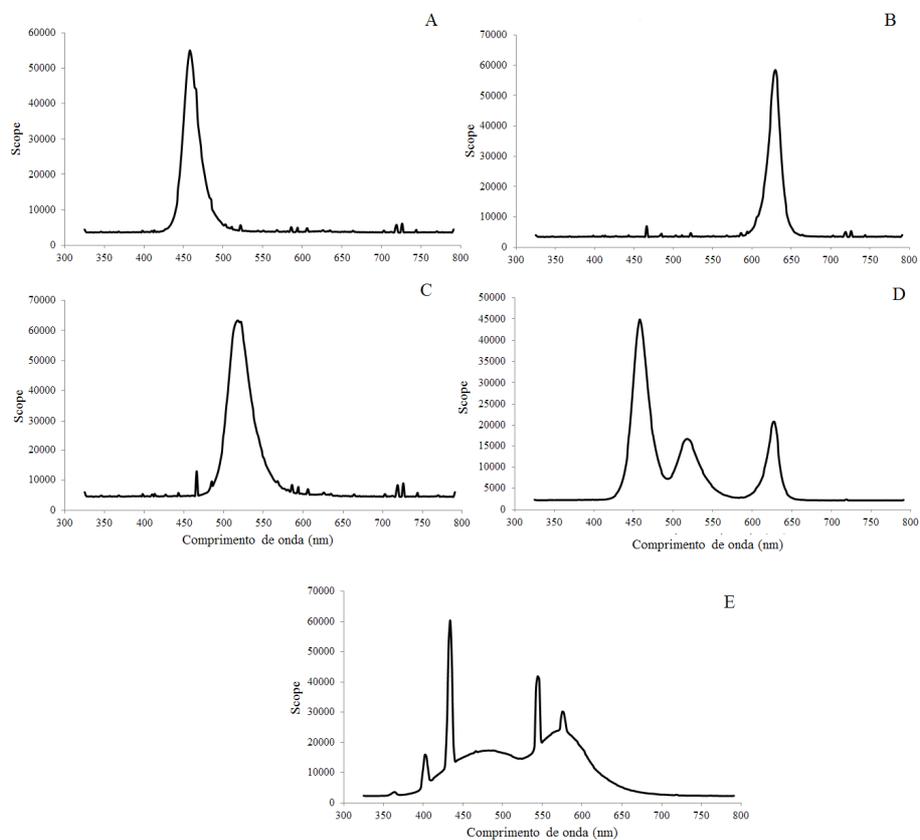


Gráfico 1 Espectros de luz utilizados para o experimento. A- LED espectro azul, B- LED espectro vermelho, C- LED espectro verde, D- LED espectro branco, E-lâmpada fluorescente branca fria. Lavras 2013.

2.2 Intensidades de Luz

As intensidades de luz utilizadas foram: 13,14; 27,79; 35,05; 47,03 e 69,00 $\mu\text{mol. m}^2.\text{s}^{-1}$, aferidas através do medidor PRO CHECK + PAR PHOTON FLUX SENSOR, modelo QSO-S, (DECAGON DEVICES- Pullman- Washington- USA). As fontes emissoras de luz foram lâmpadas fluorescentes brancas frias.

Aos 45 dias, as plântulas foram avaliadas quanto à porcentagem de sobrevivência (S%) e enraizamento (E%), número de raízes (NR), comprimento das raízes (CR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR), matéria seca total (MST), os teores de clorofilas a, b e carotenoides. Da matéria seca da parte aérea, foram retiradas amostras para a análise dos compostos voláteis. Os dados de porcentagem de sobrevivência e de enraizamento foram transformados para $\text{arc sen } (\sqrt{x/100})$, onde x é a porcentagem da variável. Os parâmetros foram submetidos à análise de variância e quando significativos, comparados pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, através do programa SAEG (FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES, 2007).

2.3 Concentrações de TDZ

Plântulas que estavam 30 dias em tubos contendo meio MS foram reduzidas a 10 mm, lavadas e inoculadas em frascos, contendo 40 ml de meio MS com as seguintes concentrações: 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg.L⁻¹ de (TDZ) e o controle, sem a adição do regulador. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo que, para cada tratamento, foram utilizados 5 repetições com 5 frascos cada.

Aos 45 dias, foi avaliada a sobrevivência dos explantes, número de brotações viáveis, comprimento das brotações, massa seca das brotações, e massa seca total das brotações.

Para comparação dos compostos voláteis, foram retiradas amostras das plantas antes do início do experimento, ou seja, com 30 dias em meio MS, sendo denominadas “plantas iniciais” (PI) e plantas que não foram inoculadas no meio contendo o regulador, permanecendo no tubo de ensaio, em meio MS, até 75 dias, sendo denominadas “plantas finais” (PF). Também foram retiradas

amostras da parte aérea das múltiplas brotações para avaliação dos compostos voláteis de todos os tratamentos.

Os dados de sobrevivência, número de brotações viáveis, comprimento das brotações, massa seca das brotações e massa seca total das brotações foram submetidos análise de regressão através do programa SAEG (SAEG, 2007).

2.4 Análise dos compostos voláteis

As análises químicas da fração volátil foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA. Para extração da fração volátil de folhas de *A. millefolium* empregou-se a técnica do “*headspace*” estático. Para isso utilizou-se de do extrator “*headspace*” automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/ EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais foram estabelecidos os seguintes parâmetros: temperatura de incubação da amostra de 100 °C durante 30 min, temperatura de seringa a 110 °C. O volume de injeção foi de 500 µL da fase de vapor, injetados em modo split na razão de 50:1. As amostras (em quadruplicada) constituíram de 60 mg da parte aérea de *A. millefolium* acondicionadas em *vials* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE.

A análise foi realizada em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 *m/z*.

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de

1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e da linha de transferência para o MS foram mantidas em 230 °C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, seguido por uma rampa de temperatura de 3 °C/min até 200 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 270 °C. As concentrações dos constituintes da fração volátil foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos.

Os constituintes foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos com uma solução padrão de *n*-alcanos (C₈-C₁₈), Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação proposta por KOVÁTS (1965) e para as atribuições foram consultados índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; DAVIES, 1990).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Qualidades de luz

3.1.1 Crescimento

Houve diferenças significativas ($p < 0,05\%$) entre os tratamentos para todas as variáveis analisadas, sendo que a lâmpada LED com espectro azul proporcionou maiores acúmulos de matéria seca da parte aérea, raízes e total, bem como maior número e comprimento de raízes, sobrevivência e enraizamento das plântulas (Tabela 1). No espectro verde, observa-se que apesar do comprimento da parte aérea não ter apresentado diferença em relação ao azul, a produção de matéria seca total foi prejudicada, indicando que houve estiolamento.

Tabela 1 Crescimento *in vitro* de *A. millefolium*, cultivadas em meio MS, sob diferentes espectros de luz, durante período de 45 dias. Lavras 2013.

Espectros de Luz	MSPA (mg)	MSR (mg)	MST (mg)	CPA (cm)	CR (cm)	NR	% S	% E
Azul	113,37a	16,57a	129,95a	5,38a	7,69 a	7,97 a	80a	75a
Vermelha	57,55b	2,61b	60,16b	4,38b	4,22b	4,29c	70a	60b
Verde	37,25 c	4,30b	41,55c	4,97a	2,82c	3,33d	45b	20c
Branca	63,50 b	5,12b	68,62b	4,05b	4,73b	4,98c	50b	50b
Fluorescente	66,98 b	2,51b	69,48b	3,44b	7,47a	5,44b	95a	55b
CV (%)	45,15	68,03	45,22	14,83	48,65	52,20	29,32	36,3

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). MSPA-Matéria seca da parte aérea, MSR-Matéria seca das raízes, MST-Matéria seca total, CPA-Comprimento da parte aérea, CR-Comprimento de raízes NR-Número de raízes, % S-Porcentagem de sobrevivência, % E-porcentagem de enraizamento

A porcentagem de sobrevivência das plântulas foi semelhante entre as cores vermelha branca fluorescente e a azul. Na propagação de plantas, sabe-se que uma plântula mais desenvolvida e com o sistema radicular bem formado permite uma aclimatização mais rápida e melhores taxas de sobrevivência em campo (CHANDRA et al., 2010; GRUSZECKI et al., 2010). Na Figura 3 pode-se observar o maior desenvolvimento das plantas.



Figura 3 Plântulas de *A. millefolium* L.cultivadas em meio MS por 45 dias, sob diferentes LEDs. A-Espectro vermelho, B- Espectro Azul, C-Espectro branco, D-Espectro verde, E-Lâmpada fluorescente branca.

Os resultados observados para o crescimento podem ser devido ao comprimento de onda na faixa do azul ser o que possui maior energia, sendo importante para níveis de fotossíntese adequados, além disso, pode-se observar

na Tabela 2 que a relação de clorofila b/a está alta se comparado com o espectro branco e a lâmpada fluorescente, indicando que o excesso energético advindo da excitação dos fitocromos está sendo descarregada na clorofila b (HUYLENBROECK; PIQUERAS; DEBERGH, 2000).

Tabela 2 Pigmentos fotossintéticos de *A. millefolium* L. cultivadas em meio MS, sob diferentes espectros de luz, durante período de 45 dias. Lavras 2013

Espectros de luz	Clorofila (mg.g ⁻¹ .mf)				Carot.
	a	b	b/a	total	
Azul	0,41b	0,63b	0,65a	1,05b	0,32b
Vermelha	0,29c	0,52b	0,65a	0,82c	0,27b
Verde	0,57a	0,99a	0,58a	1,57a	0,47a
Branca	0,28c	0,64b	0,44b	0,92c	0,28b
Fluorescente	0,37b	0,72b	0,51b	1,09b	0,43a
CV (%)	18,63	15,26	15,42	14,75	16,05

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (p<0,05)

Os maiores teores de pigmentos no tratamento com espectro verde indicam o estresse fótico da planta, sendo o comprimento de onda refletido pela clorofila, onde o aumento do teor de clorofila seria uma forma de compensar a falta de luz fotossinteticamente ativa, porém com baixa conversão em fotoassimilados (MASSA et al., 2008).

Os resultados observados são justificados por diversos trabalhos, pois na literatura é relatado que as plantas respondem bem as radiações na cor vermelha e azul, devido aos fitocromos, fototropinas e criptocromos, pigmentos que, quando estimulados, controlam além da expressão de alguns genes, abertura estomática, florescimento entre outros processos (CHEYNIER et al., 2013; CHEN et al., 2004).

Já para a luz verde, ela pode ser utilizada como luz suplementar para o crescimento quando associada com a luz azul ou vermelha, como observado isso em alface e tomate (FOLTA; MARUHNICH, 2007; LIU et al., 2010).

Cultivo sob espectro no azul, vermelho e suas combinações favoreceu o crescimento de ageratum (*Ageratum houstonianum* Mill.), tagetes (*Tagetes erecta* L.), e sálvia (*Salvia splendens* E Sello) promovendo o prolongamento do florescimento, sendo que a mesma suplementação favoreceu o crescimento em *Rehmania glutinosa* Libosch. e foi indicado para o cultivo e cúrcuma (*Curcuma longa* L.), com resposta positivas, quando comparadas aos tratamentos com luz branca fluorescente (HAMN et al., 2000; HEO et al., 2006; TROUWBORST et al., 2010).

3.1.2 Compostos voláteis

Foram identificados cerca de 30 constituintes voláteis, dentre estes o sabineno, borneol, 1,8 cineol, β -cariofileno e β -cubebeno, e representaram entre de 71,18 a 73,47% da composição química total. A lâmpada fluorescente branca fria foi que a apresentou o maior número de compostos, 29, e no espectro vermelho, cerca de 26 constituintes.

Tabela 3 Constituintes voláteis de *Achillea millefolium* L. em cultivo *in vitro* sobre diferentes espectros de luz, por 45 dias. Lavras, 2013

ESPECTROS DE LUZ						
Compostos	IR ¹	Area (%) ±DP				
		Azul	Vermelho	Verde	Branco	Fluoresc.
α-tujeno	925	0,94±0,18	1,17±0,54	0,90±0,12	0,80±0,19	0,77±0,04
α-pineno	932	1,79±0,38	1,79±0,78	1,37±0,14	1,64±0,41	1,41±0,08
canfeno	947	1,19±0,22	1,04±0,39	1,21±0,06	1,06±0,27	0,96±0,03
sabineno	973	24,17±4,61	30,77±5,69	22,12±1,70	20,59±5,21	19,58±1,65
β-pineno	976	1,54±0,23	1,86±0,38	1,41±0,28	1,41±0,37	1,41±0,18
6-metil-5-hepten-2-ona	986	—	—	0,15±0,01	—	0,13±0,01
mirceno	990	0,91±0,12	—	0,56±0,12	0,68±0,22	0,92±0,19
α-terpineno	1016	0,21±0,02	0,17±0,01	0,26±0,11	0,18±0,03	0,19±0,01
p-cimeno	1023	0,38±0,01	0,37±0,02	0,43±0,09	0,31±0,06	0,43±0,03
D-limoneno	1027	1,28±0,14	1,34±0,29	1,00±0,22	1,21±0,32	1,65±0,15
1,8-cineol	1030	7,16±1,23	6,87±1,17	5,31±0,62	6,75±1,26	6,00±0,78
γ-terpineno	1057	0,93±0,07	0,84±0,10	0,75±0,21	0,70±0,14	0,77±0,16
hidrato de <i>trans</i> -sabineno	1065	2,81±0,74	1,50±0,62	1,99±0,75	3,06±1,14	3,88±1,03
terpinoleno	1088	—	—	—	0,14±0,10	0,20±0,20
tujanol	1098	1,38±0,31	1,21±0,40	1,60±0,31	1,40±0,34	1,90±0,15
borneol	1164	13,46±2,09	6,04±2,60	13,96±0,52	12,85±1,43	15,68±0,20
terpinen-4-ol	1176	0,70±0,18	0,50±0,32	0,78±0,26	0,62±0,09	0,91±0,03
α-terpineol	1190	3,47±0,33	2,52±0,79	2,72±0,07	3,58±0,24	3,98±0,06
acetato de bornila	1285	0,97±0,17	0,65±0,21	0,78±0,15	0,88±0,27	1,04±0,08

Tabela 3, conclusão

ESPECTROS DE LUZ						
Compostos	IR ¹	Area (%) ±DP				
		Azul	Vermelho	Verde	Branco	Fluoresc.
α -cubebeno	1374	0,22±0,21	0,31±0,03	0,31±0,14	0,26±0,07	0,29±0,02
β -elemeno	1391	—	—	—	—	0,26±0,26
β -cariofileno	1417	13,65±1,23	12,82±3,62	12,26±0,86	10,96±0,25	10,59±0,53
α -humuleno	1451	1,51±0,15	1,37±0,02	1,47±0,05	1,25±0,02	1,36±0,01
E- β -farneseno	1457	0,63±0,01	1,37±0,24	1,44±0,70	1,03±0,22	0,80±0,38
γ -muuroleno	1475	0,25±0,02	0,32±0,04	0,35±0,02	0,30±0,14	0,25±0,03
β -cubebeno	1479	15,03±1,06	15,16±0,08	18,51±3,35	21,62±3,20	19,33±3,79
α -bergamoteno	1495	0,32±0,01	0,24±1,24	0,97±0,15	0,55±0,23	0,31±0,04
α -farneseno	1509	3,29±0,30	3,14±4,56	4,24±0,85	3,78±1,73	2,06±0,49
β -sesquifelandreno	1523	1,00±0,20	1,26±1,10	2,50±1,41	1,20±0,22	1,20±0,79
óxido de cariofileno	1580	0,28±0,04	0,33±1,20	—	0,25±0,12	—
Constituintes identificados (%)		99,58	97,59	99,87	99,18	98,95
Nº de constituintes		27	26	28	28	29

¹Índice de retenção relativo a série *n*-alcanos (C₈-C₁₈) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (*n* = 4)

Os compostos majoritários (Tabela 4) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05\%$) entre seus teores, sendo que o maior teor de sabineno (30,77%) foi observado no espectro vermelho, o 1,8 cineol (7,16%) e β -cariofileno (13,65%) para o azul, borneol (15,68%) para lâmpada fluorescente branca e β cubebeno (21,62%) para a luz branca LED.

A diferença quantitativa mais expressiva foi observada nos teores de borneol no vermelho, que apresentou uma redução de 40% em comparação com a média dos teores dos demais tratamentos. O teor de sabineno (19,58%) e de β -cariofileno (10,59%) foi prejudicado pelo espectro da lâmpada fluorescente branca fria.

Tabela 4 Compostos majoritários de *A. millefolium* L. cultivada *in vitro* sob diferentes espectros de luz. Lavras, 2013

Espectros de luz	sabineno	1,8-cineol	borneol	β -cariofileno	β -cubebeno
Azul	24,17 b	7,16 a	13,46c	13,65 a	15,03d
Vermelha	30,77 a	6,87b	6,41e	12,82 b	15,16d
Verde	22,12 c	5,31d	13,96b	12,26 c	18,51c
Branca	20,59 d	6,75b	12,85d	10,96 d	21,62a
Fluorescente	19,58 e	6,00c	15,68a	10,59 e	19,33 b
CV (%)	0,12	0,70	0,94	0,17	0,68

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$)

Em *Gymena silvestre*, foi observado maior crescimento dos calos e teor de ácido gimênico no LED's azul, enquanto no vermelho, foi observado um iníbiu o crescimento dos calos (ALI et al., 2012). Em *Chysantemum morifolium*, foi observado o decréscimo do teor de polifenóis no espectro azul (JEONG et al., 2012).

3.2 Intensidades de Luz

3.2.1 Crescimento

A intensidade de luz demonstrou ser uma condição crítica para o crescimento *in vitro* de *A. millefolium*. Com exceção da intensidade de 27,79 $\mu\text{mol. m}^2.\text{s}^{-1}$, as demais condições de luminosidade reduziram o acúmulo de matéria seca da parte aérea, raízes e total; o comprimento da parte aérea e o número de raízes (Tabela 5). Essas variáveis são importantes para a micropropagação, pois permitem plântulas e mudas com melhor desenvolvimento *ex vitro* (CHANDRA et al., 2010).

Tabela 5 Crescimento *in vitro* de *A. millefolium* L. cultivadas em meio MS, sob diferentes intensidades de luz durante um período de 45 dias. Lavras 2013

Tratamentos ($\mu\text{mol. m}^2.\text{s}^{-1}$)	MSPA (mg)	MSR (mg)	MST (mg)	CPA (cm)	CR (cm)	NR	% S	% E
13,14	57,60b	2,60b	60,2b	4,30b	3,86b	5,58c	70a	50a
27,79	113,4a	16,60a	130,0a	5,39a	7,69a	7,96a	80a	75a
35,05	67,00b	2,5b	69,5b	3,44c	2,82b	4,97c	95a	55a
47,03	59,80b	5,8b	69,5b	4,67b	8,32a	6,41b	45b	35b
69,00	37,30b	4,30b	41,60b	4,97b	7,46a	3,33d	45b	30b
CV (%)	25,96	51,18	25,74	25,47	41,21	28,30	32,63	25,86

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). MSPA-Matéria seca da parte aérea, MSR-Matéria seca das raízes, MST-Matéria seca total, CPA-Comprimento da parte aérea, CR-comprimento de raízes; NR-Número de raízes, %S-Porcentagem de sobrevivência, %E-porcentagem de enraizamento.

Confirmando os resultados apresentados na Tabela 5, observa-se na Figura 4 que plântulas cultivadas sob a intensidade de 27,79 $\mu\text{mol. m}^2.\text{s}^{-1}$ caracterizaram-se por plântulas com desenvolvimento normal da parte aérea e

raízes. Nessa condição, a morfologia das folhas *in vitro* foi similar a de propágulos produzidos em condições *ex vitro*. Nos demais tratamentos, observou-se encarquilhamento das folhas, estiolamento da parte aérea ou comprometimento da formação de raízes, corroborando com o presente estudo, pesquisas com *Alocasia amazonica* também apresentaram melhores respostas de crescimento *in vitro* com intensidade de $30 \mu\text{mol. m}^2.\text{s}^{-1}$ (JO et al., 2008).

Com relação à sobrevivência, os níveis acima de $35,05 \mu\text{mol. m}^2.\text{s}^{-1}$ se mostram prejudiciais, o mesmo ocorrendo para o enraizamento.



Figura 4 Plântulas de *A. millefolium* cultivadas em meio MS por 45 dias, sob diferentes intensidades de luz. Lavras, 2013

O tratamento de maior intensidade de luz ($69,00 \mu\text{mol. m}^2. \text{s}^{-1}$), apresentou os maiores teores de pigmentos fotossintéticos (Tabela 6), o que pode indicar estresse por luz, tendo em vista que o acúmulo de pigmentos atua como forma de proteção da planta (KANG et al. 2012; BISWALL et al., 2012).

Tabela 6 Pigmentos fotossintéticos de *A. millefolium* L. cultivadas em meio MS, sob diferentes intensidades de luz, durante período de 45 dias. Lavras 2013

Intensidades ($\mu\text{mol. m}^2. \text{s}^{-1}$)	Clorofila ($\text{mg. g}^{-1}. \text{mf}$).			total	Carot.
	a	b	b/a		
13,14	0,83b	0,68a	0,84a	1,52b	0,45b
27,79	0,73b	0,42b	0,56b	1,16c	0,37b
35,05	0,37c	0,29b	0,81a	0,67d	0,21c
47,03	0,87b	0,44b	0,49b	1,32c	0,45b
69,00	1,18a	0,63a	0,53b	1,81a	0,61a
CV (%)	15,32	25,20	23,08	16,70	20,44

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). mf-matéria fresca

O excesso de luz pode ser prejudicial às plantas, podendo ocorrer à chamada fotoinibição, fenômeno que causa perda de eficiência fotossintética ocorrida por danos ao fotossistema, seja por produção de espécies reativas de oxigênio, ou danos à proteína D1, que quando danificada pelo excesso de luz, precisa ser novamente sintetizada (ARAÚJO; DEMINICIS, 2009).

Isto demonstra que a luz em excesso interfere no processo fotossintético das plantas, e que nem sempre a maior disponibilidade de luz apresenta melhores respostas em crescimento. Ao contrário de *A. millefolium*, para *Phaius tankervilleae* (Banks ex L'Herit) e *Vanda coerulea* Giff, duas orquídeas, essas espécies apresentaram melhores respostas de crescimento sob luminosidades mais intensas ($74,00 \mu\text{mol. m}^2. \text{s}^{-1}$) apresentou as melhores respostas de crescimento (SOONTORNCHAINAKSAENG et al., 2001).

Em condições de baixa luminosidade ocorre o chamado estiolamento, que é o alongamento dos internódios, e podem apresentar folhas maiores e mais suculentas, o que, no processo de aclimatização, pode ser prejudicial, devido à fragilidade das plântulas (POSPÓŠILOVÁ et al., 1999; CHANDRA et al., 2010).

3.2.2 Compostos voláteis

Variações qualitativas foram observadas na fração volátil de plântulas cultivadas sob diferentes intensidades de luz (Tabela 7). Houve a presença do camazuleno foi observada apenas nos tratamentos de 13,14 $\mu\text{mol. m}^2.\text{s}^{-1}$ (0,31%) e de 69,00 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ (0,15%), o 1-hidroxi-noneno apenas sob 35,05 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ (0,19%); o biciclofelandreno foi observado apenas no tratamento de 27,79 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ (0,22%) e o γ -cadineno sob 27,79 (0,21%) e 35,05 (0,17%). O maior número de constituintes (31) foi observado na intensidade de 35, 05 $\mu\text{mol. m}^2.\text{s}^{-1}$ e o menor (29) na intensidade de 13,14 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$.

Tabela 7 Compostos voláteis de *Achillea millefolium* L. em cultivo *in vitro* sobre diferentes intensidades de luz, por 45 dias. Lavras, 2013

Compostos	IR ¹	INTENSIDADES LUMINOSAS				
		(μmol. m ² . s ⁻¹)				
		13,14	27,79	35,05	47,03	69,00
		Area (%) ±DP				
α-tujeno	925	0,6±0,177	0,58±0,03	0,79±0,05	1,08±0,61	0,73±0,03
α-pineno	932	1,02±0,29	1,28±0,10	1,23±0,06	1,74±1,04	1,18±0,08
canfeno	947	0,66±0,11	0,70±0,06	0,75±0,01	1,04±0,55	0,68±0,05
sabineno	973	15,75±3,61	21,88±1,27	20,18±1,25	26,45±3,24	18,95±0,10
β-pineno	976	1,14±0,25	1,41±0,15	1,57±0,15	1,24±0,01	1,62±0,03
mirceno	990	0,42±0,12	1,41±0,01	0,82±0,01	0,38±0,21	0,62±0,09
α-terpineno	1016	0,25±0,03	0,19±0,01	0,21±0,01	0,34±0,21	0,21±0,02
p-cimeno	1023	0,37±0,02	0,31±0,07	0,51±0,01	1,19±1,08	0,41±0,08
D-limoneno	1027	0,94±0,15	1,32±0,08	1,53±0,02	4,30±1,08	1,46±0,21
1,8-cineol	1030	3,90±0,74	4,89±0,28	5,63±0,25	2,71±4,42	7,20±0,83
1-hidroxi-noneno	1040	—	—	0,19±0,01	—	—
γ-terpineno	1057	0,82±0,02	0,60±0,09	0,81±0,03	1,28±0,87	0,92±0,30
hidrato de <i>trans</i> -sabineno	1065	2,04±0,09	2,25±0,55	3,62±0,01	2,63±2,02	4,13±0,28
terpinoleno	1088	—	—	0,16±0,01	—	0,29±0,09
tujanol	1098	1,64±0,15	1,51±0,30	2,04±0,11	2,63±2,02	2,28±0,07
borneol	1164	12,35±0,91	11,25±0,73	12,98±1,09	13,63±4,62	15,01±0,72
terpinen-4-ol	1176	1,51±0,61	0,92±0,20	1,05±0,03	0,98±0,73	1,21±0,01
α - terpineol	1190	3,13±0,09	3,20±0,23	3,66±0,11	3,18±1,06	4,08±0,11
acetato de bornila	1285	1,06±0,01	0,87±0,09	1,19±0,01	1,03±0,48	0,97±0,02

Tabela 7, conclusão

INTENSIDADES LUMINOSAS ($\mu\text{mol. m}^2. \text{s}^{-1}$)						
Area (%) \pm DP						
Compostos	IR ¹	13,14	27,79	35,05	47,03	69,00
α -cubebeno	1374	0,29 \pm 0,04	0,31 \pm 0,04	0,30 \pm 0,03	0,35 \pm 0,07	0,24 \pm 0,02
β -elemeno	1391	0,30 \pm 0,02	0,27 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01	0,34 \pm 0,14	0,37 \pm 0,04
β -cariofileno	1417	17,9 \pm 0,561	15,96 \pm 1,48	14,42 \pm 1,26	13,36 \pm 3,76	16,35 \pm 0,10
biciclofelandreno	1427	—	0,22 \pm 0,12	—	—	—
α -humuleno	1451	1,94 \pm 0,12	1,74 \pm 0,17	1,57 \pm 0,11	1,50 \pm 0,58	1,92 \pm 0,01
E- β -farneseno	1457	1,15 \pm 0, 28	1,5 \pm 0,76	0,89 \pm 0,07	0,72 \pm 0,30	0,67 \pm 0,58
γ -muuroleno	1475	0,52 \pm 0,09	0,38 \pm 0,02	0,27 \pm 0,01	0,40 \pm 0,12	0,22 \pm 0,06
β -cubebeno	1479	19,5 \pm 1,89	18,71 \pm 1,23	17,75 \pm 2,00	14,18 \pm 3,84	12,05 \pm 0,22
α -bergamoteno	1495	1,33 \pm 0,18	0,53 \pm 0,27	0,42 \pm 0,08	0,34 \pm 0,14	0,71 \pm 0,01
α - farneseno	1509	6,29 \pm 0,23	3,18 \pm 0,01	2,78 \pm 0,17	1,52 \pm 1,87	2,63 \pm 0,01
γ -cadineno	1512	—	0,21 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01	—	—
β -sesquifelandreno	1523	1,65 \pm 0,77	0,56 \pm 0,32	0,78 \pm 0,12	1,42 \pm 0,23	0,66 \pm 0,01
óxido de cariofileno	1580	0,40 \pm 0,03	0,56 \pm 1,50	0,29 \pm 0,01	0,58 \pm 0,35	0,29 \pm 0,01
camazuleno	1724	0,31 \pm 0,05	—	—	—	0,15 \pm 0,03
Constituintes identificados (%)		100	99,19	98,36	100	98,16
Nº de constituintes		29	30	31	28	30

¹Índice de retenção relativo à série n-alcenos (C₈-C₁₈) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (n=4)

Os compostos majoritários (com áreas relativas maiores que 10%) foram o sabineno (15,75- 26,45%), borneol (11,25-15,01%), β cariofileno (13,36-17,90) e β cubebeno (12,05-19,50%), os quais apresentaram diferenças quantitativas entre os tratamentos de intensidade de luz (Tabela 8).

Tabela 8 Compostos majoritários de *A. millefolium* L. cultivada *in vitro* sob diferentes intensidades de luz por 45 dias. Lavras, 2013

Intensidades ($\mu\text{mol. m}^2. \text{s}^{-1}$)	sabineno	borneol	β -cariofileno	β -cubebeno
13,14	15,75e	12,35d	17,90a	19,50a
27,79	21,88b	11,25e	15,96c	18,71b
35,05	20,18c	12,98c	14,42d	17,75c
47,03	26,45 a	13,63b	13,36e	14,18d
69,00	18,95d	15,01a	16,35b	12,05e
CV (%)	0,78	1,57	0,84	0,29

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$)

O maior teor de sabineno (26,45%) foi observado no tratamento de 47, 03 $\mu\text{mol. m}^2. \text{s}^{-1}$; de borneol (15,01%), no de 69,00 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ e os de β -cariofileno (17,90%) e β cubebeno (19,50%) nos de 13,14 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$. Portanto, os níveis de luminosidade influenciam no metabolismo dos terpenoides de *A.millefolium*, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, em que e a intensidade de luz pode se manipulada para favorecer um ou outro composto de interesse.

A luz também foi significativa para produção de compostos fenólicos e flavonoides em gengibre (*Zinger officinale* Rosc.), indicando que esse fator interfere no metabolismo secundário das plantas (GUO et al., 2010).

3.3 Diferentes concentrações de TDZ

3.3.1 Multiplicação

Foram consideradas brotações viáveis as brotações que não apresentavam anormalidades morfológicas e se apresentavam vigorosas, sendo tomadas como base para as avaliações. A resposta ao regulador foi de 100% (dados não mostrados) e os comprimentos das brotações, número de brotações, matéria seca das brotações e a matéria seca total das brotações estão apresentados no Gráfico 2.

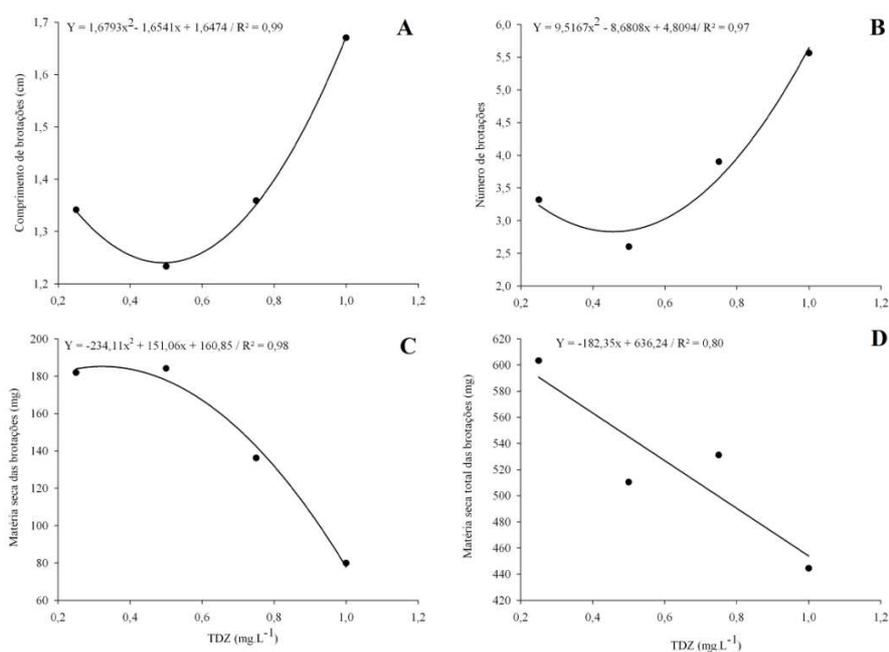


Gráfico 2 Caracterização das brotações de *A. millefolium* cultivadas em diferentes concentrações de TDZ

Para o comprimento de brotações (Gráfico 1A), os menores valores médios (1,25 cm) foram observados para a concentração 0,5 mg TDZ, sendo que a partir dessa concentração, a tendência foi o aumento do comprimento das brotações. A mesma resposta (Gráfico 1 B) foi observada para o número de brotações. O número de brotações foi maior (média de 5,5) no tratamento com maior concentração de TDZ (1,0 mg. L⁻¹), porém, quando observamos a matéria seca das brotações viáveis, nota-se que o comportamento é oposto, apresentando brotações mais leves.

A ação do regulador TDZ favorece a divisão celular, agindo como as citocininas endógenas, permitindo a regeneração, a multiplicação dos meristemas e em combinação com outros reguladores, podem ser usados para a formação e manutenção de calos (KOKOTKIEWICZ et al., 2012; MAHESHWARI; KOVALCHUK, 2011).

Para a matéria seca total das brotações viáveis, houve também o decréscimo linear com o aumento das concentrações do regulador. As respostas observadas indicam que o regulador TDZ pode ser utilizado para a multiplicação de *A. millefolium*, na concentração de 0,25 mg. L⁻¹ de meio, pois apesar de produzir menor número de brotações (média de 3,5) estes foram mais vigorosas permitem maiores índices de enraizamento e sobrevivência das mudas.

Na Figura 5 pode-se observar as múltiplas brotações decorrentes das diferentes concentrações do regulador TDZ, sendo observado o menor número de brotações no tratamento de 0,25 mg .L⁻¹ com o menor teor do regulador, porém, bem mais vigorosas que os demais tratamentos. No tratamento com a maior concentração, temos várias brotações, porém anormais e com baixo vigor.



Figura 5 Aspecto geral das plantas cultivadas por 45 em meio MS, adicionados ao regulador de crescimento Thidiazuron em diferentes concentrações. Lavras, 2013

O TDZ foi utilizado para multiplicação de várias espécies medicinais e aromáticas como em *Curcuma longa* L., *Ocimum basilicum* L., *Curculigo orchioides* Gaertn, *Bauhinia tomentosa* L., *Vitex trifolia* L., *Poupos* spp. onde são observadas respostas semelhantes aos do experimento, com o aumento de número e comprimento das brotações quando aumentados às concentrações do regulador (AHMED e ANIS 2012; NAZ et al., 2012; SIDDQUEE e ANIS et al., 2007; PRATHANTURARUG et al., 2005; THOMAS et al., 2007).

3.3.2 Constituintes voláteis

Foram identificados cerca de 35 constituintes voláteis, sendo que se pode observar que o maior número de compostos (32) foi observado para as plantas iniciais (PI), com a presença dos compostos γ -muuroleno, γ -cadineno e o biciclofelandreno, que não foram observados nas plantas finais (PF). O triciclono e o α -felandreno foram observados apenas nas plantas sem regulador (0 mg TDZ), nesse tratamento também foi observada a ausência do hidrato de trans-sabineno e do *p*-cimeno. No tratamento de 0,25 mg. L⁻¹ não foram identificados o α -terpineno e o terpinoleno. O α -cubebeno foi identificado nos tratamentos de 0 mg; 1,0 mg e nas PF (Tabela 9).

Tabela 9 Compostos voláteis de *Achillea millefolium* L. em cultivo *in vitro* sobre diferentes concentrações de Thiadizuron (TDZ) por 45 e plantas em meio MS por 30 e 75 dias. Lavras, 2013.

Composto	IR ¹	PI	TRATAMENTOS					
			0,0	0,25	0,50	0,75	1,00	PF
tricicleno	923	—	0,64±0,83	—	—	—	—	—
α-tugeno	925	0,96±0,02	1,31±0,05	1,41±0,23	1,21±0,01	1,19±0,05	1,32±0,59	1,21±0,07
α-pineno	932	1,43±0,08	1,91±0,07	1,98±0,43	1,73±0,02	1,61±0,1	1,90±0,63	1,60±0,09
canfeno	947	0,85±0,09	1,27±0,3	1,04±0,28	1,05±0,14	0,94±0,03	1,03±0,34	0,96±0,02
sabineno	973	25,97±2,2	36,3±0,07	34,78±3,21	31,09±1,99	31,49±0,23	32,93±3,86	37,29±1,96
β-pineno	976	2,20±0,19	2,44±0,02	1,99±0,21	1,76±0,18	2,11±0,25	1,92±0,37	2,32±0,11
6-metil-5-hepten-2-ona	986	0,24±0,03	0,18±0,05	0,41±0,07	0,49±0,07	0,27±0,02	0,51±0,03	0,23±0,01
mirceno	990	1,47±0,42	3,23±0,21	1,14±0,15	1,01±0,07	1,49±0,45	1,15±0,27	2,89±0,35
α-felandreno	1005	—	0,20±0,74	—	—	—	—	—
α-terpineno	1016	0,28±0,09	0,98±0,5	—	0,25±0,02	0,24±0,06	0,24±0,02	0,37±0,04
para-cymeno	1023	0,82±0,36	—	0,45±0,01	0,45±0,03	0,69±0,2	0,49±0,04	1,49±0,22
D-limoneno	1027	3,3±1,19	5,49±0,17	2,57±0,04	2,26±0,15	2,88±0,68	2,32±0,16	5,28±0,42
1,8-cineol	1030	8,47±2,65	12,51±0,08	5,11±0,94	4,76±0,73	5,7±1,54	5,74±0,4	10,53±0,24
1-hidroxi-noneno	1040	—	—	—	—	—	—	0,10±0,01
γ-terpineno	1057	1,71±0,93	2,42±0,26	0,68±0,15	0,62±0,08	1,79±0,01	0,70±0,04	2,29±0,47
hidrato de trans-sabineno	1065	2,88±0,25	—	1,56±0,3	1,39±0,23	1,81±0,27	1,25±0,43	2,38±0,12
terpinoleno	1088	0,46±0,16	0,51±0,13	—	—	0,33±0,19	—	0,51±0,03
tujanol	1098	1,56±0,09	1,2±0,54	1,37±0,42	1,30±0,24	1,44±0,02	1,21±2,41	1,29±0,03
borneol	1164	11,52±0,08	8,29±0,03	10,79±2,17	11,05±1,7	11,65±0,47	10,6±0,27	7,41±0,64
terpinen-4-ol	1176	0,73±0,07	0,60±0,3	0,81±0,24	0,75±0,4	0,73±0,03	0,70±1,2	0,68±0,05
α - terpineol	1190	3,33±0,14	2,26±0,04	2,77±0,89	2,18±0,96	2,81±0,07	2,96±0,2	2,01±0,04

Tabela 9, conclusão

Composto	IR ¹	TRATAMENTOS						
		PI	0,0	0,25	Área ±DP		0,75	1,00
acetato de bornila	1285	0,72±0,03	0,54±0,02	0,46±0,1	0,64±0,15	0,73±0,03	0,65±0,13	0,47±0,02
α-cubebeno	1374	0,22±0,05	0,09±0,01	—	—	—	0,27±0,15	0,12±0,01
β-elemeno	1391	0,15±0,01	0,11±0,12	0,33±0,14	—	0,29±0,05	0,31±0,01	0,12±0,01
β-cariofileno	1417	12,12±1,73	7,52±0,01	17,26±3,28	18,26±1,58	16,02±0,29	17,89±3,24	8,45±0,28
biciclofelandreno	1427	0,16±0,05	—	—	—	—	—	—
α-humuleno	1451	1,40±0,18	0,84±0,06	2,2±0,5	2,49±0,25	2,03±0,2	2,35±0,64	0,87±0,04
E- β-farneseno	1457	0,62±0,22	0,17±1,11	1,30±0,03	2,05±0,08	0,82±0,62	1,23±3,32	0,24±0,09
γ-muuroleno	1475	0,24±0,07	—	—	—	—	—	—
β-cubebeno	1479	11,43±4,42	4,20±0,03	6,07±0,03	7,46±2,98	7,66±2,38	6,88±0,01	6,95±2,32
α-bergamoteno	1495	0,65±0,3	0,10±0,09	0,39±0,01	0,49±0,26	0,39±0,1	0,67±0,21	0,20±0,03
α-farneseno	1509	2,79±1,19	0,53±0,01	1,90±0,21	3,18±1,54	1,81±0,25	2,53±1,15	0,59±0,23
γ- cadineno	1512	0,15±0,04	—	—	—	—	—	—
β-sesquifelandreno	1523	0,41±0,14	—	0,25±0,02	1,07±0,52	0,50±0,26	0,55±0,14	0,21±0,14
óxido de cariofileno	1580	0,21±0,05	0,13±0,02	0,41±0,07	—	0,28±0,09	0,58±0,03	0,14±0,01
Constituintes identificados (%)		99,60	98,88	99,58	99,71	99,83	100	99,43
Nº de constituintes		32	28	26	25	28	28	30

¹Índice de retenção relativo à série n-alcanos (C₈-C₁₈) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. DP: desvio padrão (n=4). PI-Plantas iniciais (30 dias); PF-Plantas finais (75dias)

Na Tabela 10 podemos observar as diferenças ($p < 0,05\%$) entre os compostos majoritários, que foram o sabineno, 1,8-cineol, borneol, β -cariofileno, β -cubebeno. Nas plantas iniciais, o teor de borneol (11,52%) apresentou teor estatisticamente igual ao de 0,75 mg.L⁻¹ (11,65%), e o maior teor (11,43%) para o β -cubebeno.

Tabela 10 Compostos majoritários de *A. millefolium* cultivadas em meio MS com a adição de Thidiazuron. Lavras, 2013

Tratamentos	sabineno	1,8-cineol	borneol	β -cariofileno	β -cubebeno
PI	25,97d	8,47c	11,52a	12,12e	11,43 a
0,00	36,30a	12,51a	8,29 e	7,52g	4,20g
0,25	34,78b	5,11e	10,79c	17,56c	6,07f
0,5	31,09c	4,76f	11,05b	18,26 a	7,46c
0,75	31,49c	5,70d	11,65a	16,02d	7,66b
1,00	32,93b	5,74d	10,60d	17,89b	6,88e
PF	37,29a	10,53b	7,41f	8,45f	6,95d
CV (%)	3,12	1,26	0,41	0,89	0,75

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott; PI-Plantas iniciais (30 dias); PF-Plantas finais (75dias)

No tratamento de 0mg de TDZ, o teor de sabineno (36,30%) estatisticamente igual ao tratamento das plantas finais (37,29) e superiores aos demais tratamentos, o mesmo ocorrendo para o teor de 1,8-cineol (12,51%). O β -cariofileno apresentou maior teor (18,26) no tratamento com 0,5 mg de TDZ.

Os reguladores de crescimento atuam em diferentes processos fisiológicos e bioquímicos, ou mesmo na expressão de genes, sendo que a aplicação exógena dessas substâncias pode incrementar a produção de compostos de interesse (SCRAVONI et al., 2006).

Pode-se citar o aumento dos teores de flavonoides em *Alpina purpurata* com a aplicação do TDZ ao meio, para *Mentha piperita* e *Salvia officinalis*, a aplicação foliar aumentou em 16% o teor de óleo essencial, aumentando os teores de β -cariofileno, α -humuleno entre outros compostos voláteis. Nesses trabalhos os autores relatam que as citocininas alteram o metabolismo de enzimas terpeno-sintetases, tendo efeito direto no metabolismo dos monoterpenos (SINGH et al., 2008; VICTORIO et al., 2009).

Assim, a utilização de 0,25mg de TDZ ao meio basal MS promove a multiplicação dos explantes de *A. millefolium* L. e os compostos voláteis são influenciados pela presença do regulador.

4 CONCLUSÕES

O espectro de luz azul, tendo como fonte emissora LEDs, foi o que apresentou os melhores resultados para as variáveis de crescimento analisadas, podendo ser recomendada para o cultivo *in vitro* de *Achillea millefolium* L., permitindo melhores taxas de sobrevivência, enraizamento e acúmulo de matéria seca total.

A intensidade de luz de 27,79 $\mu\text{mol. m}^2. \text{s}^{-1}$ se mostrou adequada para o crescimento *in vitro* de *A. millefolium* L., apresentando melhores valores para as variáveis analisadas.

A utilização de 0,25 mg. L⁻¹ de TDZ ao meio basal MS promove a melhor multiplicação dos explantes de *A. millefolium* L., apresentando brotações mais vigorosas.

Os constituintes majoritários encontrados foram o sabineno, 1,8 cineol, borneol, β -cariofileno e o β -cubebeno, sendo observadas variações quantitativas dos seus teores tanto para a qualidade, intensidade e TDZ.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured, 2007.

AHMED, M. R.; ANIS, M. Role of TDZ in the quick regeneration of multiple shoots from nodal explant of *Vitex trifolia* L.--an important medicinal plant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 168, n. 5, p. 957-66, Nov. 2012.

ALATAR, A.A. et al. Simple and rapid protocol for the isolation of PCR-amplifiable DNA from medicinal plants. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 348-54, Feb. 2012.

ALI, A. A. B. et al. Production of Gymnemic acid depends on medium, explants, PGRs, color lights, temperature, photoperiod, and sucrose sources in batch culture of *Gymnema sylvestre*. **The Scientific World Journal**, New York, n. 2, May 2012.

ARAÚJO, S.A.C.; DEMINICIS, B.B. Fotoinibição da fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 4, p. 463-472, out./dez. 2009.

BISWAL, A. K. et al. Light intensity-dependent modulation of chlorophyll b biosynthesis and photosynthesis by over expression of chlorophyll and oxygenase in tobacco. **Plant physiology**, Rockville, v. 159, n. 1, p. 433-449, May 2012.

CHANDRA, S. et al. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology letters**, Dordrecht, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, Sept. 2010.

CHEN, M.; HORY, J.; FANKHAUSER, C. Light signal transduction in higher plants. **Annual Reviews in Genetics**, v.38, p.87-117, Dec. 2004

CHEYNIER, V. et al. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, maio 2013.

COLE, I.B.; FAROOQ, F.T.; MURCH, S.J. Protocols for establishment of an *in vitro* collection of medicinal plants in the genus *Scutellaria*. **Methods in Molecular Biology**. Totowa, 547, 155-165, 2009.

DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 503, n.1, p. 1-24, 1990.

FOLTA, K. M.; MARUHNICH, S. A. Green light: a signal to slow down or stop. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 12, p. 3099-3111, Dec. 2007.

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES. **Sistema para análises estatísticas e genéticas – SAEG: versão 9.1**. Viçosa, MG: UFV, 2007.

GRUSZECKI, W.I. et al. Blue-light-controlled photoprotection in plants at the level of the photosynthetic antenna complex LHCII. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 167, n. 1, p. 69-73, 2010.

GUO, Q. et al. Effects of light intensity on physiological and biochemical characteristics of *Chrysanthemum morifolium* at vegetative stage. **China Journal of Chinese Materia Medica**, Beijing, v. 35, n. 5, p. 561, 2010.

HAHN, E.; KOZAI, T.; PAEK, K. Blue and red light-emitting diodes with or without sucrose and ventilation affect *in vitro* growth of *Rhemanina glutinosa* plantlets. **Journal of Plant Biology**, Amsterdam, v. 43, n. 4, p. 247-250, 2000.

HEO, J. W.; LEE, C. W.; PAEK, K. Y. Influence of mixed LED radiation on the growth of annual plants. **Journal of Plant Biology**, Amsterdam, v. 49, n. 4, p. 286-290, 2006.

HUYLENBROECK, J. van; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P. The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. **Plant Science**, Clare, v. 155, n. 1, p. 59-66, June 2000.

INÁCIO, M.C. et al. In vitro seeds germination and ex vitro plants development of algodãozinho-do-campo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 11, p. 2294-2300, Nov. 2010.

JANA, S.; et al. Effect of cytokinins on in vitro multiplication of *Sophora tonkinensis*. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, Canberra, v. 3, n. 7, p. 549-553, Jul. 2013.

JEONG, S. W. et al. Influences of four different light-emitting diode lights on flowering and polyphenol variations in the leaves of *Chrysanthemum morifolium*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, n. 39, p. 9793-9800, Oct. 2012.

JO, E. A. E. et al. Effect of photoperiod and light intensity on *in vitro* propagation of *Alocasia amazonica*. **Plant Biotechnology Reports**, New York, v. 2, n. 3, p. 207-212, Aug. 2008.

KANG, Z. et al. Photosynthetic and physiological analysis of the rice high-chlorophyll mutant *Gc*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 60, p. 81-87, Nov. 2012.

KIM, H. H. et al. Green-light supplementation for enhanced lettuce growth under red-and blue-light-emitting diodes. **HortScience**, Alexandria, v. 39, n. 7, p. 1617-1622, Dec. 2004.

KOKOTKIEWICZ, A. et al. Micropropagation of *Cyclopia genistoides*, an endemic South African plant of economic importance. **Zurich Naturforsch Scientiae**, Tubingen, v. 67, n. 1-2, p. 65-76, Jan./Feb. 2012.

LIU, X. Y. et al. Growth and photosynthesis of cherry tomato seedling exposed to different low light of LED light quality. **Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica**, Peiping, v. 4, p. 20, 2010.

MAHESHWARI, P.; KOVALCHUK, I. Efficient shoot regeneration from internodal explants of *Populus angustifolia*, *Populus balsamifera* and *Populus deltoids*. **News Biotechnology**, Amsterdam, v. 28, n. 6, p. 778-87, Oct. 2011.

MASSA, G. D. et al. Plant productivity in response to LED lighting. **HortScience**, Alexandria, v. 43, n. 7, p. 1951-1956, Dec. 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

NAZ, R.; ANIS, M.; AREF, I. M. Assessment of the potentiality of TDZ on multiple shoot induction in *Bauhinia tormentors* L.; a woody legume. **Acta Biologica Hungarica**, Budapest, v. 63, n. 4, p. 474-82, Dec. 2012.

NIST SPEECH GROUP WEBSITE. Topic detection and tracking evaluation. 2008. Disponível em: <<http://www.nist.gov/spech/test/tdt/>>. Acesso em: 03 jul. 2012.

PALÚ, E.G. et al. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 587-592, 2011.

POSPÓŠILOVÁ, J. et al. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. **Biologija Plantarum**, Dordrecht, v. 42, n. 4, p. 481-497, Dec. 1999.

PRATHANTURARUG, S. et al. Rapid micropropagation of *Curcuma longa* using bud explants pre-cultured in thidiazuron-supplemented liquid medium. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 347-351, 2005.

SCRAVONI, J. et al. Rendimento e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* L. submetida a aplicações de giberelina e citocinina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v: 8, n.1, p 40-43, 2006.

SIDDIQUE, I.; ANIS, M. Rapid micropropagation of *Ocimum basilicum* using shoot tip explants pre-cultured in thidiazuron supplemented liquid medium. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 51, n. 4, p. 787-790, Dec. 2007.

SINGH, V.; et al. Effects of growth regulator application on growth, flower, oil yield, and quality of clary sage (*Salvia sclera* L.) **Journal of Herbs, Spices Medicinal Plants**, Birmingham, v.14, p. 29-36, 2008.

SOONTORNCHAINAKSAENG, P. et al. *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L'Herit) Bl. and *Vanda coerulea* Giff. **Science Asia**, Shanghai, v. 27, p. 233-237, 2001.

THOMAS, T.D. Pretreatment in thidiazuron improves the *in vitro* shoot induction from leaves in *Curculigo orchoides* Gaertn. an endangered medicinal plant. **Acta Physiologiae Plantarum**, New York, v, 29, n. 5, p. 455-461, Oct. 2007.

TROUWBORST, G. et a. The response of light interception, photosynthesis and fruit yield of cucumber to LED-lighting within the canopy. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 138, n. 3, p. 289-300, Mar. 2010.

VICTÓRIO, C.P.; KUSTER, R.M.; LAGE, C.L.S. Production of rutin and kaempferol-3-O-glucuronide by tissue cultures of *Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 28, n. 4, p. 613-6, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho é uma contribuição para o estudo do cultivo *in vivo* e *in vitro* da espécie, fornecendo subsídios para otimização do processo produtivo da planta, seja pelo cultivo convencional ou através de cultura de tecidos.

A partir dos resultados observados pode-se fazer um manejo adequado e preciso da irrigação, permitindo maiores produtividades de matéria prima vegetal, além disso, o estudo dos constituintes químicos permite avaliar como a planta altera seu metabolismo de terpenoides sob a influencia hídrica.

Com o estudo da omissão macro e micronutrientes, pode-se observar quais elementos são mais limitantes para a espécie, a partir desse conhecimento, pode-se adequar os níveis dos nutrientes mais limitantes, em um solo de cultivo ou mesmo uma solução nutritiva, bem como a resposta de produção de óleo essencial e dos constituintes voláteis.

O trabalho contribui para o cultivo *in vitro*, fornecendo informações importantes sob o aspecto de qualidade, intensidade de luz e TDZ, permitindo uma micropropagação rápida e eficiente da espécie, bem como as variações ocorridas nos constituintes voláteis, sob o aspecto da cultura de tecidos vegetais.

Assim, com os resultados observados, podem-se elaborar regimes de manejo, *in vitro* e *in vivo*, considerando os aspectos de disponibilidade hídrica, nutrição mineral, qualidade, intensidade de luz e TDZ na produção em larga escala da espécie, com qualidade e eficiência do uso dos recursos.