

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

**Influência de níveis de sombreamento sobre o crescimento,  
produção de pigmentos fotossintéticos e assimilação de nitrogênio  
em mil-folhas (*Achillea millefolium* L.)**

**Milene Conceição Lima**

Pelotas, 2009

**MILENE CONCEIÇÃO LIMA**

**INFLUÊNCIA DE NÍVEIS DE SOMBREAMENTO SOBRE O  
CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS E  
ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM MIL-FOLHAS (*Achillea  
millefolium* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas/UFPel, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luciano do Amarante.

**Pelotas, 2009**

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

L732i      Lima, Milene Conceição

Influência de níveis de sombreamento sobre o crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e assimilação de nitrogênio em mil-folhas (*Achillea millefolium* L.) / Milene Conceição Lima; Orientador Luciano do Amarante. – Pelotas, 2009. – 83f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2009.

1.Fisiologia vegetal. 2.*Achillea millefolium* L. 3.Níveis de sombreamento. 4.Doses de nitrogênio. 5.Nutrição mineral. 6.Metabolismo das plantas. I.Amarante, Luciano do. II.Título.

CDD: 581.13

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Márcio Paim Mariot

---

Prof. Dr. Dario Munt de Moraes

---

Prof. Dr. Luciano do Amarante  
(Orientador)

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

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos pelo amor que sempre demonstraram em todos os momentos.

Ao meu noivo, pelo companheirismo e compreensão nos momentos de conquistas e perdas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano do Amarante pela orientação, experiência e ensinamento.

Aos professores Dr. Dario Munt de Moraes e Dr. Márcio Paim Mariot pela valiosa participação na banca examinadora.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Antonieta Décio da Costa, da Universidade Católica de Pelotas pelo auxílio na identificação da espécie vegetal.

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

Aos amigos de laboratório, Rosana Serpa, Denis Carvalho, Cristiane Martins, Priscila Moraes, Marciabela Corrêa, Marcel Durigon, Ana Claudia Langaro, Lea Schneider, Pablo Badinelli, Rose Tessmer, Ivan Zenzen, Lizandra Bretanha e Daniela Gouvêa pela amizade, força e auxílio.

Aos professores, funcionários e alunos do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça – CAVG pela ajuda incansável.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos e experiências transmitidos durante o curso.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Suzi Braga pelo carinho e disposição em todos os momentos.

À Deus, pela vida, pela qual neste momento estou trilhando meu caminho em busca de sabedoria.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	09
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE ANEXOS .....	12
RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	14
1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE <i>Achillea millefolium</i> L. ....	17
2.1.1. Aspectos botânicos e agronômicos .....	17
2.1.2. Aspectos químicos .....	20
2.1.3. Aspectos etnofarmacológicos .....	21
2.2. PRODUÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS .....	22
2.3. INFLUÊNCIA DA LUZ NA FISIOLOGIA DAS PLANTAS .....	25
2.4. ASSIMILAÇÃO PRIMÁRIA DE NITROGÊNIO EM PLANTAS .....	27
2.4.1. Principais formas de nitrogênio disponíveis às plantas .....	27
2.4.2. Absorção e transporte de nitrogênio inorgânico em plantas .....	28
2.4.3. Redução e assimilação do nitrato em plantas .....	28
2.4.4. Redução e assimilação do amônio em plantas .....	31
3. OBJETIVOS .....	34
3.1. GERAL .....	34
3.2. ESPECÍFICOS .....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	35
4.1. MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	35
4.2. TRATAMENTOS EMPREGADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	36
4.3. CONDIÇÕES CLIMATOLÓGICAS DURANTE A CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS .....	38
4.4. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	39
4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS .....	40
4.5.1. Análise de crescimento .....	40
4.5.2. Extração e quantificação de pigmentos fotossintetizantes .....	40

4.5.3. Extração e dosagem da atividade da enzima nitrato redutase (EC 1.6.6.1) .....	41
4.5.4. Extração e dosagem da atividade da enzima glutamina sintetase (EC 6.3.1.2) .....	42
4.5.5. Extração de aminoácidos solúveis totais, nitrato e amônio em folhas e raízes .....	43
4.5.6. Dosagem de aminoácidos solúveis totais em folhas e raízes .....	44
4.5.7. Dosagem de nitrato em folhas e raízes .....	45
4.5.8. Dosagem de amônio em folhas e raízes .....	45
4.5.9. Dosagem de nitrogênio total em folhas e flores .....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
5.1. Influência do nitrogênio e do sombreamento sobre o acúmulo de massa seca e a produção de pigmentos fotossintéticos em <i>Achillea millefolium</i> L. ....	47
5.2. Assimilação de nitrogênio em <i>Achillea millefolium</i> L. cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento .....	52
6. CONCLUSÕES .....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia da espécie <i>Achillea millefolium</i> L. ....	18
Figura 2. Redução do nitrato em amônio .....	29
Figura 3. Enzimas que participam na assimilação do amônio .....	33
Figura 4. Mudanças de <i>Achillea millefolium</i> L. com três meses de idade .....	35
Figura 5. Plantas de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo no campo experimental .....	36
Figura 6. Plantas de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento vegetativo no campo experimental .....	37
Figura 7. Plantas de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo (A) e vegetativo (B) .....	37
Figura 8. Precipitação pluviométrica (mm) no período de novembro/2007 a outubro/2008 no município de Pelotas, RS .....	38
Figura 9. Radiação solar ( $\text{cal cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ ) no período de novembro/2007 a outubro/2008 no município de Pelotas, RS .....	39
Figura 10. Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) média mínima, média e média máxima no período de novembro/2007 a outubro/2008 no município de Pelotas, RS .....	39
Figura 11. Esquema de extração de aminoácidos solúveis totais, nitrato e amônio em tecidos vegetais .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa seca da parte aérea, caule, folhas e flores de <i>Achillea millefolium</i> L. submetida a níveis de sombreamento em diferentes estádios de desenvolvimento .....	47
Tabela 2. Massa seca de folhas de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento .....	48
Tabela 3. Massa seca da parte aérea, caule, folhas e flores de <i>Achillea millefolium</i> L. cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio em diferentes estádios de desenvolvimento .....	49
Tabela 4. Teores de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , total, razão clorofila <i>a/b</i> , teores de carotenóides e razão clorofila total/carotenóides em <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, submetida a níveis de sombreamento .....	50
Tabela 5. Teores de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , total, razão clorofila <i>a/b</i> , teores de carotenóides e razão clorofila total/carotenóides em <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, submetida a níveis de sombreamento .....	50
Tabela 6. Teores de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , total, razão clorofila <i>a/b</i> , teores de carotenóides e razão clorofila total/carotenóides em <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio .....	52
Tabela 7. Teores de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , total, razão clorofila <i>a/b</i> , teores de carotenóides e razão clorofila total/carotenóides em <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio .....	52
Tabela 8. Atividade da enzima nitrato redutase em folhas de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo em diferentes horários do dia .....	53
Tabela 9. Atividade da enzima nitrato redutase em folhas e raízes de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo e vegetativo, submetida a níveis de sombreamento .....	54

Tabela 10. Atividade da enzima nitrato redutase em folhas e raízes de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo e vegetativo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio ....	56
Tabela 11. Atividade da enzima glutamina sintetase em folhas e raízes de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, submetida a níveis de sombreamento .....	57
Tabela 12. Atividade da enzima glutamina sintetase em folhas e raízes de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio .....	58
Tabela 13. Teor de aminoácidos solúveis totais em folhas e raízes de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, submetida a níveis de sombreamento .....	58
Tabela 14. Teor de aminoácidos solúveis totais em folhas e raízes de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, submetida a diferentes concentrações de nitrogênio .....	59
Tabela 15. Teor de aminoácidos solúveis totais em raízes de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento .....	60
Tabela 16. Teor de nitrato nas folhas e raízes de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento	61
Tabela 17. Teor de nitrato nas folhas e raízes de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, submetida a níveis de sombreamento .....	62
Tabela 18. Teor de amônio nas folhas e raízes de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento	63
Tabela 19. Teor de nitrogênio total em flores de <i>Achillea millefolium</i> L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento	64

## LISTA DE ANEXOS

Anexo I. Análise do solo .....	78
Anexo II. Análise de variância .....	80

## RESUMO

LIMA, MILENE CONCEIÇÃO. Universidade Federal de Pelotas, março de 2009. **Influência de níveis de sombreamento sobre o crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e assimilação de nitrogênio em mil-folhas (*Achillea millefolium* L.)**. Orientador: Prof. Dr. Luciano do Amarante.

A espécie medicinal *Achillea millefolium* L., conhecida como mil-folhas, pertencente à família Asteraceae, é nativa da Europa, América do Norte, Sul da Austrália e Ásia. É uma planta herbácea, rizomatosa, aromática, possui folhas compostas e suas flores são brancas. A multiplicação ocorre por divisão de touceiras e é utilizada na medicina tradicional brasileira por suas atividades antibacterianas, antitumorais e antiinflamatórias. O presente trabalho teve como objetivo analisar a resposta de *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e doses de nitrogênio, quanto ao crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e assimilação de nitrogênio em dois estádios fenológicos, reprodutivo e vegetativo. Mudanças de mil-folhas cultivadas em estufa e transferidas para o campo experimental, foram cultivadas sob três doses de nitrogênio (0, 75 e 150 kg uréia ha<sup>-1</sup>) e submetidas a dois níveis de sombreamento 0 (luz plena) e 75% (sombrite 75%). Adotou-se o delineamento experimental de blocos casualizados com 4 repetições em esquema fatorial 3 x 2 (doses de nitrogênio x níveis de sombreamento). Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. O sombreamento influenciou a maioria das variáveis estudadas, causando redução significativa no acúmulo de massa seca da parte aérea, caule, folhas e flores, aumento nos teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides e decréscimo da assimilação de nitrogênio. Os teores de nitrogênio total foram maiores em folhas do que em flores, o amônio foi semelhante em tecidos radiculares e foliares e os aminoácidos solúveis totais e o nitrato foram maiores nas raízes do que em folhas. A atividade total das enzimas glutamina sintetase e nitrato redutase foram superiores nas folhas. Os resultados indicam ser os tecidos foliares o sítio preferencial de assimilação de nitrogênio. Os resultados obtidos mostram que a espécie medicinal *Achillea millefolium* L. possui elevada adaptação à baixa intensidade luminosa.

**Palavras-chave:** *Achillea millefolium* L., níveis de sombreamento, doses de nitrogênio.

## ABSTRACT

LIMA, MILENE CONCEIÇÃO. Federal University of Pelotas, march 2009. **Influence of levels of shading on growth, production of photosynthetic pigments and nitrogen assimilation in yarrow (*Achillea millefolium* L.)**. Adviser: Prof. Dr. Luciano do Amarante.

*Achillea millefolium* L. is a medicinal species, known as yarrow, of the Asteraceae family, is native from Europe, North America, Australia South and Asia. It is herbaceous, rhizomatous, aromatic, has composed leaves and white flowers. It is propagated by tussocks division and in traditional Brazilian medicine is used due to antibacterial, antitumoral and anti-inflammatory activities. This study present to examine the response of *Achillea millefolium* L. grown under different levels of shading and nitrogen levels, considering growth, production of photosynthetic pigments and nitrogen assimilation in two phenological stages, vegetative and reproductive. Seedlings of yarrow grown in greenhouse conditions were transferred to the experimental field and cultivate under three nitrogen levels (0, 75 and 150 kg urea ha<sup>-1</sup>) and subjected to two levels of shading 0 (full light) and 75% (75% black). The experimental design was delineated in randomized blocks with 4 replicates in a factorial 3 x 2 (levels of nitrogen x levels of shading). The data were submitted to variance analysis and comparison between means was performed by Tukey's test at 5% level of probability. The shading influenced most variables studied, causing significant reduction in the accumulation of dry mass of shoots, stems, leaves and flowers, increase in levels of chlorophyll *a*, *b*, total and carotenoids and decrease of nitrogen assimilation. The levels of total nitrogen were higher in leaves than in flowers, the ammonium was similar in leaf and root tissues and the total soluble amino acids and nitrate were higher in roots than in leaves. The total activitie of the enzymes glutamine synthetase and nitrate reductase were higher in leaves. The results indicate the leaf tissues are the preferential site of nitrogen assimilation. The results analyzed showed that the medicinal species *Achillea millefolium* L. has pronouced adaptation to low light intensity.

**Key words:** *Achillea millefolium* L., levels of shading, levels of nitrogen.

## 1. INTRODUÇÃO

A qualidade das plantas medicinais deve ser obtida durante todo o processo de produção, desde o plantio até a coleta do material vegetal, de modo a garantir o máximo de acúmulo de substâncias de interesse, propriedades terapêuticas e produtividade.

Um estudo sistematizado de todas as etapas pertinentes ao cultivo de plantas medicinais é de extrema importância, visto que um determinado fator abiótico ou biótico pode determinar a qualidade final do produto vegetal.

Uma variedade de mecanismos de adaptação a modificações ambientais, como adaptações fisiológicas e químicas para o crescimento e sobrevivência em condições desfavoráveis a diversos tipos de ambientes, foram desenvolvidos pelas plantas medicinais.

A luz é um dos fatores ambientais necessário para a regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal. A adaptação das plantas à luminosidade depende do ajuste do seu mecanismo fotossintético, de modo que a intensidade luminosa disponível seja utilizada de maneira mais eficiente possível.

O sombreamento artificial é um método empregado no estudo das necessidades luminosas de diferentes espécies vegetais. As variações na quantidade, qualidade, presença ou ausência de luz irão influenciar fortemente o desenvolvimento das plantas medicinais.

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

A espécie medicinal *Achillea millefolium* L., conhecida como mil-folhas, pertencente à família Asteraceae, é nativa da Europa, América do Norte, Sul da Austrália e Ásia. É uma planta herbácea, rizomatosa, aromática, de 30-50 cm de altura, possui folhas compostas e suas flores são brancas reunidas em capítulos. A

multiplicação, na flora brasileira, ocorre por divisão de touceiras e é utilizada na medicina tradicional por suas atividades antibacterianas, antitumorais e antiinflamatórias.

Ainda são incipientes os estudos e as informações da influência de condições ótimas de cultivo e fatores ambientais sobre o crescimento, produção e assimilação de nitrogênio das plantas medicinais.

Portanto, com base nesses fatores, o presente trabalho foi idealizado e executado com o objetivo de analisar a resposta de *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e doses de nitrogênio, quanto ao crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e assimilação de nitrogênio.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE *Achillea millefolium* L.

#### 2.1.1. Aspectos botânicos e agronômicos

A espécie *Achillea millefolium* L. tem como origem, o nome do gênero *Achillea* em homenagem ao herói da mitologia grega Aquiles que utilizou suas folhas em uma de suas batalhas para curar seu rei e o epíteto específico *millefolium* que significa mil-folhas é alusivo ao grande número de folíolos que a planta possui (LORENZI; MATOS, 2008). Tem como nome popular mil-folhas, mil-ramas, aquiléa-mil-folhas, aquiléa, erva-de-cortadura, erva-do-carpinteiro e erva-dos-carreiros (PEROZIN; FRANCISCO, 1990).

A planta, pertencente à família Asteraceae, é considerada como sendo a espécie mais conhecida do gênero *Achillea*, sendo originária da Europa, norte da Ásia e sul da Austrália e introduzida nas Américas, tendo sido aclimatada no Brasil (JUNIOR *et al.*, 2005).

O gênero *Achillea* é representado por cerca de 85 espécies encontradas principalmente na Europa, Ásia e América do Norte. Só na Turquia são encontradas 40 espécies do gênero (CANDAN *et al.*, 2003).

Segundo Cronquist (1981) a espécie possui o seguinte enquadramento taxonômico: Divisão – Magnoliophyta, Classe – Magnoliopsida, Subclasse – Asteridae, Ordem – Asterales, Família – Asteraceae, Subfamília – Asteroideae, Tribo – Anthemideae, Gênero – *Achillea* e Espécie – *Achillea millefolium* L.

Caracteriza-se por ser uma planta perene, rústica, herbácea, com rizoma rastejante e estolonífera, glabra ou pouco lanuginosa e com caules eretos, ramosos na parte superior, alcançando de 20-60 cm de altura. Suas folhas são alternas longas, estreitas, do tipo oblongo-lanceoladas e subdivididas em numerosos segmentos lineares bem finos, sendo esta a razão de ser chamada de mil-folhas

(Figura 1). Elas apresentam de 60-100 mm de comprimento total, 20-40 mm de largura e coloração verde-brilhante com odor aromático característico (CHANDLER *et al.*, 1982; PENNA, 1946).



Figura 1. Morfologia da espécie *Achillea millefolium* L.  
Fonte: <[http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/thome/band4/tafel\\_121\\_small.jpg](http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/thome/band4/tafel_121_small.jpg)>

A inflorescência é do tipo corimbo, formada de pequenos capítulos florais dispostos em grupos aplanados. As flores são pedunculadas, pequenas, dimorfas e distribuem-se em capítulos densamente corimbosos e reunidos em uma cacho terminal de 5 mm de altura por 3 mm de diâmetro, com brácteas brancas marginais. Os frutos são do tipo aquênio, compridos, oblongos, glabros, de 1,5-2 mm de comprimento e desprovidos de cálice (CHANDLER *et al.*, 1982).

É uma planta de clima temperado quente a subtropical, tolerando condições climáticas extremas como o sol pleno, geada, seca, frio intenso (até -15°C) e não se adapta a regiões com excesso de precipitações (CORRÊA JR *et al.*, 1994). Prefere a luz plena para seu crescimento e desenvolvimento, podendo suportar o sombreamento parcial (MARTINS *et al.*, 2000). Essa planta é mais pronunciadamente aromática quando encontrada em maiores altitudes (CORRÊA JR *et al.*, 1994).

A espécie é uma planta perene e invasora, que se adapta bem em solos areno-argilosos, permeáveis, férteis, bem drenados, ensolarado e não ácidos, tolerando solos pobres em nutrientes, mas não suporta solos encharcados (HERTWIG, 1991).

Quando cultivada floresce na primavera. A coleta é realizada de 4 a 5 meses após o plantio, as folhas são coletadas adultas e as sumidades floridas logo que desabrocham, podendo ser secas juntos (SARTÓRIO *et al.*, 2000). Quando nativa floresce duas vezes ao ano, nos meses de maio e setembro. Na Europa e nos EUA floresce nos meses de maio e junho e em Curitiba, floresce geralmente de novembro a janeiro (CORRÊA JR *et al.*, 1994).

A planta geralmente multiplica-se assexuadamente, pois a formação de frutos e sementes é rara. A propagação ocorre por estacas ou por divisão de touceiras, podendo as partes obtidas serem plantadas diretamente no local, tendo-se apenas o cuidado de cortar pelo menos a metade das folhas, para reduzir a transpiração (MARTINS *et al.*, 2000). Este tipo de multiplicação vegetativa garante um desenvolvimento mais homogêneo e uniforme, pois elimina problemas com cruzamentos indesejáveis (LORENZI; MATOS, 2008). Essa espécie é plantada a campo no espaçamento de 20 x 40 cm e é companheira de outras plantas medicinais em hortas e jardins, pois parece estimular a produção de óleos essenciais nas plantas próximas (MARTINS *et al.*, 2000).

### 2.1.2. Aspectos químicos

As investigações sobre o conteúdo químico de *Achillea millefolium* L. têm sido numerosas, estendendo-se por mais de 200 anos e foram com a destilação de um óleo volátil azul em 1719 por Hoffman, que tiveram início as análises químicas da espécie (FALK *et al.*, 1975).

O óleo volátil da planta é composto majoritariamente pelo óleo essencial apresentando os monoterpenos (30-80%), os sesquiterpenos (8-62%) e em menor quantidade por outros compostos (1-3%), como álcoois, ésteres, aldeídos e carotenóides (HOFMANN *et al.*, 1992). Os principais constituintes do óleo essencial da espécie são: sabineno,  $\beta$ -pineno, eucaliptol, cânfora, borneol, 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, óxido de bisabolol, camazuleno, cariofileno, linalool e eugenol (HOFMANN *et al.*, 1992; KOKKALOU *et al.*, 1992; CANDAN *et al.*, 2003).

Lourenço *et al.* (1999) determinaram um rendimento de 0,05-10% de óleo nas raízes, apesar de não serem consideradas fontes de óleo essencial. Os sesquiterpenos do tipo hidrocarbonetos são os mais abundantes (64%), com pequenas quantidades de outros tipos de sesquiterpenos (HOFMANN *et al.*, 1992).

As lactonas sesquiterpênicas são do tipo proazulenos e não azulenogênicas. As lactonas sesquiterpênicas têm sido pesquisadas ativamente, pois são estruturas novas que podem possibilitar a identificação de cada subespécie e são precursoras do azuleno (KUBELKA *et al.*, 1999). O primeiro e principal proazuleno natural do gênero *Achillea* a ser isolado e elucidado foi a aquilicina, na qual foi identificada como 8-acetoxiartabsina (CUONG *et al.*, 1979).

A cor azul do óleo é devido à presença do azuleno e compostos relacionados, como o camazuleno, e muitos estudos se focam sobre os azulenos e proazulenos (lactonas sesquiterpênicas) da planta. A maior quantidade de proazuleno tem sido encontrada nas inflorescências no início da floração e as folhas produzem uma grande quantidade de proazuleno no mesmo estágio, mas é mais baixa do que nas flores (MOCKUTE; JUDZENTIENE, 2003).

Além da parte da planta usada, outros fatores influenciam na concentração e composição do óleo essencial e dos proazulenos, como a estação, o estágio de desenvolvimento em que foi coletada, as condições ambientais, o período de estocagem e o subtipo da planta (VERZÁR-PETRI; CUONG, 1977).

Outra classe de componentes que recebeu considerável atenção foram os flavonóides que são compostos polifenólicos e são classificados em flavonóis, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides (GUÉDON *et al.*, 1993; GUARDIA *et al.*, 2001).

Chandler *et al.* (1982) relataram à presença de esteróis, triterpenos e saponinas. Entre os esteróis estão o  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, colesterol, triterpenos,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, taraxasterol e pseudotaraxasterol.

Outros componentes também foram isolados como alcaloides (estaquidrina, betonicina, betaina, colina), aminoácidos (alanina, histidina, leucina, lisina), ácidos graxos (ácidos linoléico, palmítico, oléico), ácidos fenólicos (ácidos caféico, salicílico), açúcares (dextrose, glicose, manitol, sacarose) e cumarinas (BLUMENTHAL *et al.*, 2000).

### **2.1.3. Aspectos etnofarmacológicos**

O uso medicinal de *Achillea millefolium* L. é antigo, sendo relatada a utilização das suas folhas pelo herói da mitologia grega Aquiles durante a guerra de Tróia (CHANDLER *et al.*, 1982). Com os mesmos fins, a planta já foi usada durante a guerra civil americana, na qual o emprego das folhas e flores secas era preconizado oficialmente como tônico, estimulante e emenagogo segundo a farmacopéia dos Estados Unidos (ALONSO, 1998). Várias comunidades aborígenes norte-americanas a empregavam para tratar quadros gastrointestinais, enquanto outras utilizavam o chá para o tratamento de resfriados, febre e quadros respiratórios e a aplicação local da planta para a cura de feridas e inflamações (BLUMENTHAL *et al.*, 2000).

Na Alemanha, a planta compõe vários medicamentos para o tratamento de dispepsias e sintomas gastrointestinais, sendo indicada como colerética, antiespasmódica, adstringente e bactericida (BLUMENTHAL *et al.*, 2000).

Bradley (1992) ressalta as ações espasmolíticas, emenagoga e colerética da planta. Outros usos populares da espécie citados por vários autores são: antiséptica, anestésica, diurética, carminativa, reguladora menstrual, sendo utilizada contra dor de dente, reumatismo, cálculos renais, gastrite, úlcera gástrica, dispepsia nervosa e diarreia (TORRES; CHÁVEZ, 2001; CANDAN *et al.*, 2003).

Além dos usos medicinais, a planta também é empregada para realçar o sabor de cervejas, vinhos e outras bebidas. Tanto as folhas como as flores são utilizadas como tempero e com as folhas também são feitas saladas (TORRES; CHÁVEZ, 2001).

Estudos anteriores demonstraram ação farmacológica do extrato aquoso da planta frente à gastroproteção, na qual foi observada uma redução da secreção ácida do estômago, o que favorece a recuperação de indivíduos que sofrem de problemas gástricos (BAGGIO, 2004).

As investigações sobre as ações da espécie tiveram início sobre as atividades biológicas e farmacológicas atribuídas ao óleo essencial. Pesquisas demonstraram que o óleo apresenta ação fungistática principalmente contra *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* e ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (KEDZIA *et al.*, 1990). Candan *et al.* (2003) demonstraram a atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Candida albicans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Acinetobacter lwoffii* e *Candida krusei*, além da atividade antioxidante.

Della Loggia *et al.* (1992) demonstraram a atividade antiinflamatória da fração clorofórmica (rica em proazuleno). Os ácidos aquimílicos A, B e C do extrato metanólico das flores da planta exibiram atividade antitumoral (TOZYU *et al.*, 1994). Gadgoli e Mishra (1995) demonstraram a atividade antihepatotóxica do extrato aquoso e frações clorofórmica, metanólica e aquosa da espécie no modelo de lesão hepática induzida por tetracloreto de carbono e por paracetamol.

## **2.2. PRODUÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS**

O valor das plantas medicinais, aromáticas e condimentares é determinado pelos compostos químicos especiais elaborados por elas, que são chamados de princípios ativos. Há diversos fatores que influenciam na elaboração dos princípios ativos, como os de ordem genética que são transmitidos de geração em geração. Existem os fatores externos como a temperatura, água, solo, altitude e latitude, que também interferem de maneira significativa na elaboração dos princípios ativos (CORRÊA JR *et al.*, 2006).

O estudo sobre as plantas medicinais é bastante complexo e, por isso, multidisciplinar, polarizando a atenção de agrônomos, botânicos, biólogos,

bioquímicos, químicos e farmacêuticos. A qualidade das plantas medicinais e aromáticas é obtida durante todo o processo produtivo, desde a identificação botânica, a escolha do material vegetal, época e local de plantio, tratos culturais, determinação da época e cuidados na colheita, de modo a garantir o máximo de integridade das propriedades terapêuticas que essas espécies possuem (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005).

Ao longo do processo de evolução, as plantas medicinais desenvolveram uma variedade de mecanismos de adaptação a mudanças ambientais, destacando-se as adaptações anatômicas, fisiológicas e químicas para o crescimento e sobrevivência em condições desfavoráveis a vários tipos de condições ambientais. Segundo Larcher (2004) em cada fase do ciclo de vida, as plantas estão expostas a diferentes influências ambientais e reagem de diferentes formas, desde a semente até a planta com frutos.

Segundo Corrêa Jr *et al.* (2006) os fatores técnicos também merecem destaque. A forma de plantio, os tratos culturais e os aspectos fitossanitários determinam o estado geral de desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, sua maior ou menor produtividade. Os recursos fitotécnicos utilizados durante o cultivo de plantas medicinais podem ser caracterizados como fonte de estímulo para a produção de metabólitos secundários, que por certas vezes são capazes de causar estresse cujo efeito pode ser favorável ou não no que se refere ao acúmulo de substâncias de interesse. Nesse contexto, o estresse pode estar relacionado ao excesso ou déficit de algum fator de produção para o vegetal. Assim, uma vez que o vegetal possui capacidade genética para produzir princípios ativos, a concentração pode ser alterada por fatores bióticos e abióticos de meio ambiente onde se encontra (RODRIGUES, 2007).

Verifica-se que o estudo sistematizado de todas as etapas pertinentes ao cultivo de plantas medicinais e aromáticas é de inestimável importância, visto que um fator ou mais podem determinar a qualidade final do produto (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005).

Um elemento fundamental a ser considerado no cultivo de plantas medicinais é a necessidade de se associar à produção de biomassa a qualidade da planta, enquanto matéria-prima, para a fabricação de medicamentos fitoterápicos. Nesse sentido é preciso almejar uma produtividade ótima, não só de biomassa, mas

também dos princípios ativos que tornam a planta uma espécie medicinal (REIS *et al.*, 2003).

Com relação aos tratamentos culturais, irrigação e adubação são os principais fatores que interferem no rendimento das substâncias bioativas e, por consequência, a qualidade das plantas medicinais e aromáticas (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005). A agricultura praticada de forma orgânica deve ser sempre considerada para a produção de plantas medicinais (REIS *et al.*, 2003).

A cultura de plantas medicinais, para utilização na produção de fitoterápicos, bem como a obtenção de seus metabólitos isolados, está sujeita a variações do clima, da disponibilidade de nutrientes do solo para semear, doenças, métodos variados de seleção e secagem, os quais influenciam a qualidade e quantidade, e variação inerente de componentes ativos que surgem de plantas das mesmas espécies com características genéticas diferentes (CORRÊA JR *et al.*, 2006).

No plantio das espécies medicinais deve ser verificado o espaçamento entre plantas, que pode favorecer ou não a produtividade em termos de biomassa e também de princípios ativos. Acredita-se que exista um espaçamento ótimo para cada espécie (ANDRADE; CASALI, 1999).

O material vegetal seco é empregado devido à sua maior estabilidade química, no entanto, exige cuidados especiais, a fim de interromper os processos metabólicos que ocorrem após a colheita da planta (SIMÕES; SPITZER, 1999). Assim, cada passo do processamento deve ser visto sob dois pontos de vista. O primeiro como a atitude que faz parte do conjunto de ações e, o segundo, como a atitude que pode ser otimizada, objetivando preservar a qualidade do produto, através de um planejamento adequado da secagem e armazenamento do material vegetal.

Normalmente a temperatura de secagem varia entre 35 e 45°C. Temperaturas acima de 45°C danificam os órgãos vegetais, pois proporcionam cocção das plantas, ou seja, a secagem é superficial e internamente a planta continua seu processo metabólico acelerado, apesar de inativarem maior quantidade de enzimas, há perda significativa na qualidade dessas plantas (MARTINS *et al.*, 2000).



### 2.3. INFLUÊNCIA DA LUZ NA FISILOGIA DAS PLANTAS

A luz é um fator ambiental de fundamental importância para as plantas, pela ação direta ou indireta na regulação de seu crescimento e desenvolvimento. As respostas morfofisiológicas das plantas não dependem apenas da presença, atenuação ou ausência da luz, mas também da variação em qualidade luminosa. Toda a vida na Terra é mantida por um fluxo de energia proveniente da luz do sol, que por meio do processo fotossintético é fixada em energia química e utilizada para realizar processos vitais em todos os componentes da cadeia alimentar (LARCHER, 2004).

De acordo com Taiz e Zeiger (2004) a luz é um recurso crítico para as plantas, que pode limitar seu crescimento e reprodução. A radiação não é para as plantas somente uma fonte de energia (efeito fotoenergético), mas também um estímulo que governa o condicionamento do desenvolvimento (efeito fotocibernético) e, às vezes, funciona como um fator estressante (efeito fotodestrutivo). Todos esses efeitos ocorrem por meio da absorção dos quantas de luz, a qual é mediada por fotorreceptores específicos (LARCHER, 2004).

A luz, fração visível da energia solar, que contém a radiação fotossinteticamente ativa compreendida na faixa espectral de 400-700 nm, tem importância em vários processos fisiológicos que ocorrem nas plantas e, segundo Larcher (2004) 45% da radiação proveniente do sol se encontram dentro dessa faixa espectral.

Para otimizar a captação da energia luminosa para a fotossíntese, as plantas desenvolveram uma série de fotorreceptores que regulam seu crescimento e desenvolvimento em relação a presença, quantidade, qualidade, direção e duração da radiação luminosa incidente (MORINI; MULEO, 2003). A adaptação das plantas à luminosidade ambiental depende do ajuste do seu aparelho fotossintético, de modo que a energia radiante disponível seja utilizada de maneira mais eficiente possível (ENGEL; POGGIANI, 1991).

Para inferir a contribuição de diferentes processos fisiológicos no crescimento vegetal, a análise de crescimento ainda é o meio mais simples e preciso, sendo útil no estudo de variações entre plantas sob diferentes condições de luminosidade. Segundo Benincasa (1988) por meio da análise de crescimento é possível conhecer a cinética de produção de biomassa das plantas, sua distribuição e eficiência ao

longo da ontogenia. Diversas variáveis de crescimento têm sido utilizadas para avaliar o comportamento das espécies vegetais em relação à luz, sendo a altura, a produção de massa seca, a área foliar e as relações entre a biomassa da parte aérea e radicular as variáveis mais freqüentemente utilizadas.

Diversos estudos de crescimento de plantas têm sido realizados na busca pelo conhecimento da ecofisiologia de diferentes espécies submetidas a diferentes condições de luminosidade, seja pelo controle da radiação incidente, por meio do emprego de lâmpadas de diferentes comprimentos de ondas ou câmaras de crescimento (COOLEY *et al.*, 2000; MUSIL *et al.*, 2002) ou pelo uso de telas ou plásticos redutores da radiação (FARIAS, 1997; MUROYA *et al.*, 1997).

O sombreamento artificial é um método utilizado no estudo das necessidades luminosas de diferentes espécies, pois isola e quantifica o efeito da intensidade luminosa e fornece às parcelas experimentais condições uniformes de iluminação, quando comparada aos estudos em condições naturais. As variações na quantidade, qualidade, presença ou ausência de luz irão influenciar fortemente o desenvolvimento que a planta irá apresentar (ENGEL, 1989).

As respostas apresentadas pelas plantas à variação na disponibilidade de luz costumam envolver alterações nas características das folhas relacionadas ao teor de clorofila. Diversos fatores externos e internos afetam a biossíntese de clorofilas e por isso, os seus conteúdos foliares podem variar de maneira significativa (WHATLEY; WHATLEY, 1982).

A clorofila está sendo constantemente sintetizada e destruída (foto-oxidação) em presença de luz, porém sob intensidades luminosas mais elevadas ocorre maior degradação e o equilíbrio é estabelecido a uma concentração mais baixa. Portanto, folhas de sombra possuem concentração maior de clorofila ( $\text{mg g}^{-1}$ ) do que as folhas de sol (KRAMER; KOZLOWSKI, 1979).

As alterações na disponibilidade de radiação solar em um ambiente podem alterar não somente a quantidade de clorofila total, como também a fração de clorofila *a* em relação à clorofila *b*. Uma maior proporção relativa de clorofila *b* em plantas sombreadas é uma característica importante, pois possibilita a captação de energia de outros comprimentos de onda e transferência para uma molécula específica de clorofila *a*, que efetivamente toma parte das reações fotoquímicas da fotossíntese (WHATLEY; WHATLEY, 1982). Este aumento relativo pode estar ligado a um aumento da proporção do complexo coletor clorofila *a/b*, associado ao

fotossistema I, em relação ao complexo P<sub>700</sub> do fotossistema II nos tilacóides e que é facilmente foto-oxidado (THORNER, 1975).

De acordo com Larcher (2004) a absorção na faixa do visível para todas as plantas depende dos pigmentos presentes no cloroplasto. Desta forma, a curva do espectro de absorção da folha para a banda do visível tem seu valor máximo coincidente com o valor da clorofila e dos carotenóides, evidenciando a importância da qualidade da luz na eficiência do processo fotossintético.

Os carotenóides são tetraterpenos de cores vermelha, amarela e laranja que agem como pigmentos acessórios na fotossíntese e protegem os tecidos fotossintéticos contra a fotoxidação. Além de sua função como pigmento acessório, pela capacidade em absorver radiação a comprimentos de onda diferentes dos captados pela clorofila, os carotenóides desempenham um papel essencial na fotoproteção (TAIZ; ZEIGER, 2004).

## **2.4. ASSIMILAÇÃO PRIMÁRIA DE NITROGÊNIO EM PLANTAS**

### **2.4.1. Principais formas de nitrogênio disponíveis às plantas**

As respostas metabólicas e de crescimento de determinada espécie de planta, frente às formas de nitrogênio, podem estar associadas às diferentes etapas da aquisição e assimilação, envolvendo processos metabólicos distintos e níveis de organização. O desempenho ecológico das espécies resulta da interação entre o genoma, os recursos disponíveis (nutrientes) e as condições ambientais (MENDONÇA, 2002).

O nitrogênio é o elemento mineral mais abundante nas plantas e é considerado um dos principais fatores limitantes para seu crescimento e desenvolvimento (TAIZ; ZEIGER, 2004). As plantas apresentam a capacidade de assimilar o nitrogênio a partir da solução do solo através das raízes, na forma de íons inorgânicos como o amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou a partir do nitrogênio atmosférico via associação simbiótica (KERBAUY, 2004). Por outro lado, também são capazes de utilizar eficientemente formas orgânicas como a uréia e aminoácidos (PABBY *et al.*, 2001).

Os íons nitrato e amônio são utilizados pela planta, embora, na maioria dos solos, o amônio seja rapidamente oxidado a nitrato por ação de bactérias

nitrificadoras. O amônio encontra-se em solos ácidos e inundados ou em áreas com vegetação cujos tecidos radiculares exsudam inibidores do processo de nitrificação e resulta principalmente da mineralização de matéria orgânica (MATTISON; SCHJOERRING, 2002).

#### **2.4.2. Absorção e transporte de nitrogênio inorgânico em plantas**

Um aspecto que influencia de modo significativo a disponibilidade dos íons inorgânicos para as plantas é a sua mobilidade no solo. O amônio é frequentemente a forma preferencial de absorção de nitrogênio pelas plantas. Quando a concentração externa de amônio é baixa, esse íon é absorvido pelos tecidos radiculares através do processo ativo e, é captado por processo passivo quando ele for encontrado em concentrações altas. O processo ativo é mediado por uma proteína transportadora localizada na membrana celular. Após a absorção, o íon é rapidamente assimilado na forma orgânica, tendo em vista que o acúmulo de amônio pode prejudicar a planta. O cultivo com elevada concentração de amônio pode levar à morte das plantas, porém, as concentrações toleradas variam de espécie para espécie (MATTISON; SCHJOERRING, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2004).

O nitrato, ao contrário do amônio, é absorvido pelas raízes apenas por processo ativo e a absorção desse íon é mediada por uma proteína transportadora localizada na membrana celular. Esse íon absorvido nas células das raízes pode ser armazenado temporariamente no vacúolo ou reduzido a amônio, que neste caso é usado principalmente para síntese de glutamina e asparagina. Estes dois aminoácidos podem ser transportados às folhas pelo fluxo transpiratório nos vasos do xilema. Em várias espécies, quando a capacidade de assimilação do nitrato pelas raízes está saturada, o amônio liberado dos tecidos radiculares aos vasos do xilema, é carregado pelo fluxo transpiratório aos tecidos foliares. Grandes quantidades de nitrato podem ser armazenadas nos vacúolo de folhas (HELDT, 1997).

#### **2.4.3. Redução e assimilação do nitrato em plantas**

Os tecidos foliares e radiculares são os principais locais para a redução do nitrato nas plantas. A maioria das plantas possui a atividade da enzima nitrato redutase localizada nas folhas. Entretanto, a importância relativa das raízes e das

folhas na assimilação do nitrato depende da atividade da enzima nitrato redutase nos tecidos radiculares e da disponibilidade de nitrato no meio (KERBAUY, 2004).

As espécies com capacidade muito baixa em assimilar o nitrato nas raízes enviam todo o íon absorvido, via xilema, para a assimilação nos tecidos foliares (HOPKIS, 1999). Já as espécies com alta capacidade em assimilar o nitrato nas raízes dificilmente têm essa capacidade superada pelo nitrato absorvido, e, conseqüentemente, a importância da folha na assimilação do íon é pequena. Porém, a maioria das espécies são intermediárias em termos de capacidade de assimilar o nitrato nas raízes. Nesses casos, a folha torna-se importante apenas quando o nitrato no meio estiver em concentração suficiente para superar a capacidade de redução da raiz (PATE, 1973).

A redução completa do nitrato em amônio (Figura 2) requer oito elétrons e ocorre em duas etapas, cada uma envolvendo doadores de elétrons específicos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

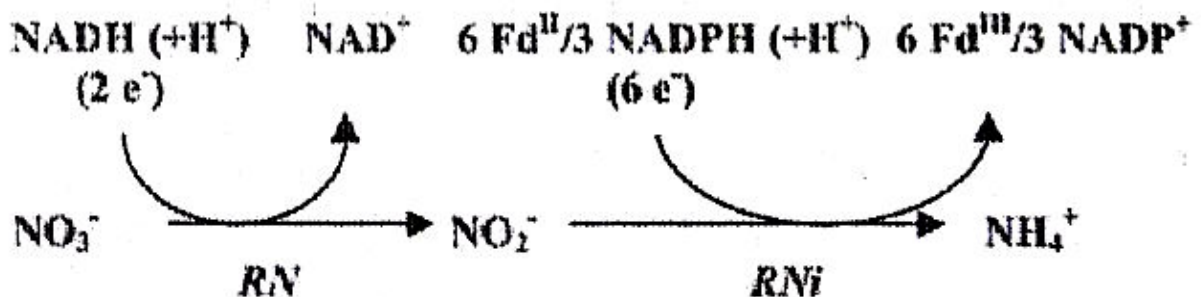


Figura 2. Redução do nitrato em amônio.  
 Fonte: SODEK; SILVA, 1996.

A primeira etapa é catalisada pela enzima nitrato redutase (RN), localizada no citoplasma, enquanto a nitrito redutase (RNi) está localizada nos cloroplastos (tecidos verdes) ou plastídeos (tecidos não-verdes). Na maioria das espécies, a enzima nitrato redutase tem NADH como doador específico de elétrons. Entretanto, em algumas espécies a enzima utiliza tanto NADH como NADPH e ela é biespecífica, pois pode ocorrer isoladamente ou junto com a enzima monoespecífica. A estrutura molecular da enzima nitrato redutase é bastante complexa, sendo a enzima constituída de duas subunidades idênticas de 110 a 115 kDa. Cada subunidade é composta de regiões distintas envolvidas na transferência de elétrons do NADH até o nitrato (SODEK; SILVA, 1996; TAIZ; ZEIGER, 2004).

A enzima nitrato redutase tem uma função importante no metabolismo do nitrogênio em plantas, porque constitui uma porta de entrada do nitrogênio no metabolismo da planta. É natural que existam vários mecanismos de controle da sua atividade. Os dois principais pontos de regulação ocorrem a nível de transcrição (indução) e pós-tradução. A primeira é mais lenta (leva algumas horas) e é responsável por algumas das mudanças diárias de atividade, como, por exemplo, o aumento na atividade durante as primeiras horas de luz do dia, quando o fluxo transpiratório leva o nitrato até o tecido foliar, resultando na indução da enzima (SODEK; SILVA, 1996; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Outro importante mecanismo de controle ocorre a nível de pós-tradução. Esse processo de ativação/desativação é bem mais rápido (leva alguns minutos) e pode ser importante, por exemplo, para “desligar” a enzima quando a planta passa da luz para o escuro, pois havendo falta de ferredoxina reduzida, evita-se o acúmulo de nitrito, na qual é tóxico para as plantas. O processo de ativação/desativação envolve a transformação da enzima de uma forma inativa para ativa e vice-versa pelo mecanismo de fosforilação e desfosforilação (KERBAUY, 2004).

A luz influencia indiretamente na atividade da enzima nitrato redutase na folha, provocando mudanças em uma série de íons e metabólitos envolvidos nesse mecanismo de regulação. Com a fotossíntese, ocorre um aumento no teor de açúcares fosforilados (como triose P) e queda em um fosfato inorgânico (em função do aumento de ATP), proporcionando condições favoráveis para a ativação da enzima. A luz também está envolvida na regulação da enzima nitrato redutase a nível de transcrição (via fitocromo). A oscilação diária de atividade entre os períodos de luz e escuro se mantém quando a planta é transferida para luz contínua, comprovando que a enzima obedece a um ritmo circadiano. Outros fatores que influem na síntese da enzima são o gás carbônico, a sacarose e alguns metabólitos nitrogenados, estando o nitrato entre os mais importantes (KERBAUY, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).

O nitrato tem forte influência sobre todos os componentes da sua assimilação. Além da própria enzima nitrato redutase, o nitrato regula as proteínas de transporte (absorção de nitrato) e as enzimas nitrito redutase, glutamina sintetase e glutamato sintase dependente de ferredoxina [GOGAT(Fd)]. No caso do tecido foliar, é importante ressaltar que não é o teor de nitrato presente que é importante na

indução da enzima, mas a quantidade trazida pelo fluxo transpiratório (KERBAUY, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).

A segunda enzima do processo de assimilação do nitrato, a nitrito redutase, está localizada nos cloroplastos das folhas e nos plastídeos das raízes. A enzima do cloroplasto é melhor caracterizada, pois possui ferredoxina como co-fator e, portanto os elétrons são fornecido pelas reações fotoquímicas. Sua estrutura é constituída por um único polipeptídeo de 60-70 kDa, que contém um grupo tetra-hidro porfirina contendo ferro (siro-heme) e um agrupamento 4Fe-4S no centro ativo, responsável pela transferência de seis elétrons da ferredoxina ao nitrito até a sua redução em amônio. A enzima localizada nos tecidos radiculares é menos conhecida e aparentemente, recebe elétrons de uma proteína semelhante à ferredoxina que por sua vez é reduzida por NADPH gerado na via das pentoses-fosfato (KERBAUY, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).

#### **2.4.4. Redução e assimilação do amônio em plantas**

A enzima glutamina sintetase é a chave envolvida na transformação de nitrogênio inorgânico em formas orgânicas assimiláveis, em plantas superiores. Essa enzima catalisa a condensação de amônio ATP-dependente com glutamato para produzir glutamina, que fornece grupos nitrogenados, diretamente ou via glutamato, para a biossíntese de todos os compostos nitrogenados na planta (FORDE; CULLIMORE, 1989).

Foram identificadas em plantas superiores dois grupos de isoenzimas de glutamina sintetase, a plastídica (GS<sub>2</sub>) e a citosólica (GS<sub>1</sub>) (CREN; HIREL, 1999). Na maioria de plantas, a GS<sub>2</sub> é predominante em tecidos clorofilados, sendo localizada no estroma do cloroplasto (PEREIRA *et al.*, 1992). O isolamento do cDNA codificando GS<sub>2</sub> permitiu a demonstração que em muitas espécies esta isoenzima é codificada por um gene nuclear único. Estudos prévios demonstraram que esta isoenzima é indispensável para a reassimilação de amônio liberado do ciclo de nitrogênio da fotorrespiração. A importância fisiológica da GS<sub>2</sub> foi mais tarde demonstrada usando plantas transgênicas superexpressando a GS<sub>2</sub> nas folhas. Estas plantas podem incrementar a capacidade fotorrespiratória quando crescem sob estresse osmótico e alta intensidade de luz (HOSHIDA *et al.*, 2000).

A conversão da glutamina em outros aminoácidos envolve inicialmente a ação da glutamato sintase que catalisa a transferência do grupo  $\delta$ -amino da glutamina para a posição  $\alpha$ -ceto do  $\alpha$ -cetoglutarato, produzindo duas moléculas de glutamato, à custa do poder redutor fornecido pelo NADH ou ferredoxina (LEA; MOROT-GAUDRY, 2001).

A assimilação de amônio em glutamato e glutamina é prontamente distribuída no metabolismo da planta, pois estes aminoácidos são doadores de nitrogênio na biossíntese de aminoácidos, ácidos nucleicos e outros compostos contendo nitrogênio (SALISBURY; ROSS, 1991).

Uma vez que o amônio foi assimilado, o glutamato pode ser rapidamente convertido em outros aminoácidos pela ação das transaminases. Uma dessas enzimas é essencial para a formação de aspartato, necessário para a síntese de asparagina que envolve a transaminação entre glutamato e oxaloacetato pela ação da glutamato oxaloacetato transaminase, produzindo aspartato e  $\alpha$ -cetoglutarato. A asparagina é formada via ação da enzima asparagina sintetase, a partir de asparagina e glutamina, com hidrólise simultânea de ATP em AMP (Figura 3). Neste caso, a glutamina tem o papel de doador de nitrogênio para formar o grupo amida (LEA; MOROT-GAUDRY, 2001).



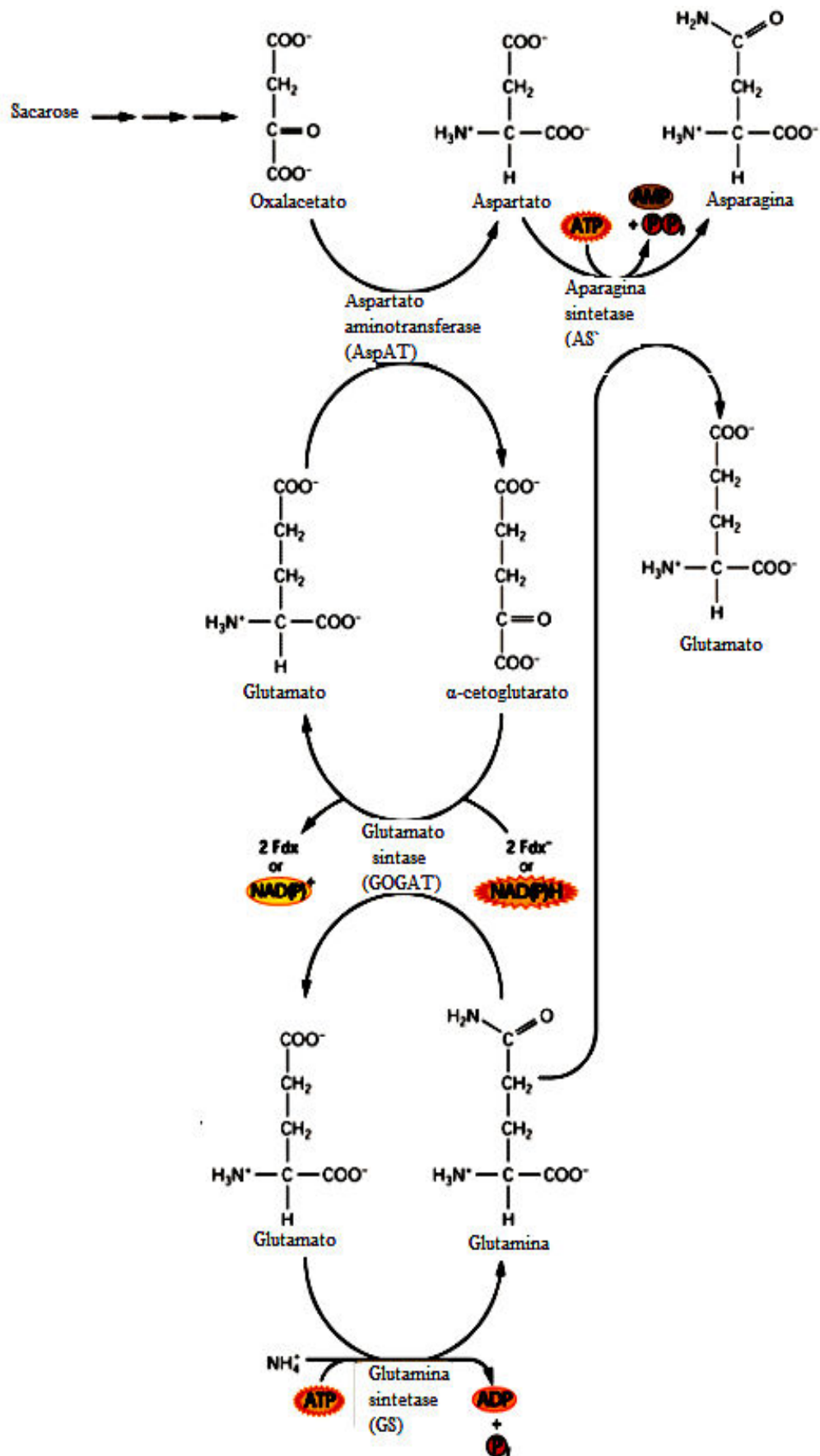


Figura 3. Enzimas que participam na assimilação do amônio.  
 Fonte: BUCHANAN, 2001, modificado.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. GERAL**

Analisar a resposta de *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e doses de nitrogênio, quanto ao crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e assimilação de nitrogênio.

#### **3.2. ESPECÍFICOS**

Com as plantas de *Achillea millefolium* L. submetidas a diferentes níveis de sombreamento e adubação nitrogenada, objetivou-se:

- Verificar o acúmulo de massa seca da parte aérea, caule, folhas e flores de *Achillea millefolium* L. em diferentes estádios de desenvolvimento;
- Avaliar os teores de clorofila *a*, *b*, total, razão clorofila *a/b*, teores de carotenóides e razão clorofila total/carotenóides;
- Examinar a assimilação primária do nitrogênio por meio da determinação das atividades das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase em tecidos foliares e radiculares;
- Investigar os teores de aminoácidos solúveis totais, nitrato e amônio em folhas e raízes;
- Quantificar os teores de nitrogênio total em folhas e flores em diferentes estádios de desenvolvimento.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O cultivo do material vegetal e condução dos experimentos foram realizados nas áreas experimentais do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça - CAVG, UFPel, Pelotas, RS (31°42'44.52" sul e 52°18'46.70" oeste).

As mudas de mil-folhas (*Achillea millefolium* L.) obtidas por divisão de touceiras, segundo Martins *et al.* (2000), foram cultivadas em estufa e após transferidas para condições de campo. A divisão de touceira foi realizada a partir de uma planta matriz, obtendo-se pequenas mudas que foram transplantadas em sacos de polietileno preto (Figura 4) com capacidade de 1 kg de substrato (esterco de aves curtido + areia + solo) na proporção 1:1:1. As mudas foram irrigadas por aspersão e a retirada das plantas invasoras foi conduzida manualmente.



Figura 4. Mudas de *Achillea millefolium* L. com três meses de idade.  
Fonte: Milene Lima, 2008.

As mudas com quatro meses de idade foram transplantadas para canteiros no campo experimental e foram irrigadas através de um sistema de gotejamento

utilizando um sistema de fitas gotejadoras. A retirada das plantas invasoras foi realizada por meio de capina manual.

As plantas foram identificadas taxonomicamente pela Profa. Dra. Maria Antonieta Décio da Costa, do Laboratório de Botânica, da Universidade Católica de Pelotas/UCPel e as exsicatas foram depositadas no herbário PEL, do Departamento Botânica, da Universidade Federal de Pelotas/UFPel com o número 24.600.

#### 4.2. TRATAMENTOS EMPREGADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As mudas de mil-folhas foram cultivadas sob três doses de nitrogênio (0, 75 e 150 kg uréia ha<sup>-1</sup>) durante cinco meses. Em fevereiro de 2008, ao atingirem o estágio de desenvolvimento reprodutivo caracterizado pela floração plena, foram submetidas a dois níveis de sombreamento: 0% (luz plena) e 75% (sombrite 75%) (Figura 5). As plantas permaneceram sombreadas por 56 dias e em abril de 2008 foi realizada a primeira coleta. Nessa ocasião, foram corrigidos os teores de fósforo e potássio do solo com superfosfato triplo e cloreto de potássio na proporção de 35 kg ha<sup>-1</sup> e 15 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente. A adubação foi realizada com base em resultado de análise do solo (Anexo I).



Figura 5. Plantas de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo no campo experimental.

Fonte: Milene Lima, 2008.

Após a primeira coleta, o sombrite foi retirado e realizou-se uma adubação nitrogenada de cobertura dividida em três etapas (junho/2008, julho/2008 e agosto/2008), nas mesmas quantidades empregadas no primeiro experimento. As plantas cresceram por um período de quatro meses e em agosto de 2008, ao



atingirem o estágio de desenvolvimento vegetativo, caracterizado por touceira bastante perfilhada, foram sombreadas novamente (Figura 6). As plantas permaneceram sombreadas por 46 dias e em outubro de 2008 foi realizada a segunda coleta.

O sombreamento foi obtido por meio de sombrite preto colocado e amarrado com cordão em suportes de madeira sobre as plantas.



Figura 6. Plantas de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo no campo experimental.  
Fonte: Milene Lima, 2008.

O estágio de desenvolvimento reprodutivo das plantas foi caracterizado pela presença de flores brancas desenvolvidas em capítulos e o estágio vegetativo pela presença de folhas compostas expandidas e ausência de flores (Figura 7) (LORENZI; MATOS, 2008).



Figura 7. Plantas de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo (A) e vegetativo (B).  
Fonte: Milene Lima, 2008.

Os experimentos foram conduzidos sob um delineamento experimental em blocos inteiramente casualizados em esquema fatorial 3 x 2 (doses de nitrogênio e níveis de sombreamento) com quatro repetições e a unidade experimental consistiu de dez plantas.

As coletas e as análises foram realizadas em dois estádios de desenvolvimento: reprodutivo e vegetativo.

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

#### 4.3. CONDIÇÕES CLIMATOLÓGICAS DURANTE A CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

As figuras 8, 9 e 10 mostram os dados climatológicos dos meses de novembro/2007 a outubro/2008 do município de Pelotas, RS, fornecidos pela Estação Agroclimatológica de Pelotas, Embrapa Clima Temperado, UFPel durante a condução dos experimentos.

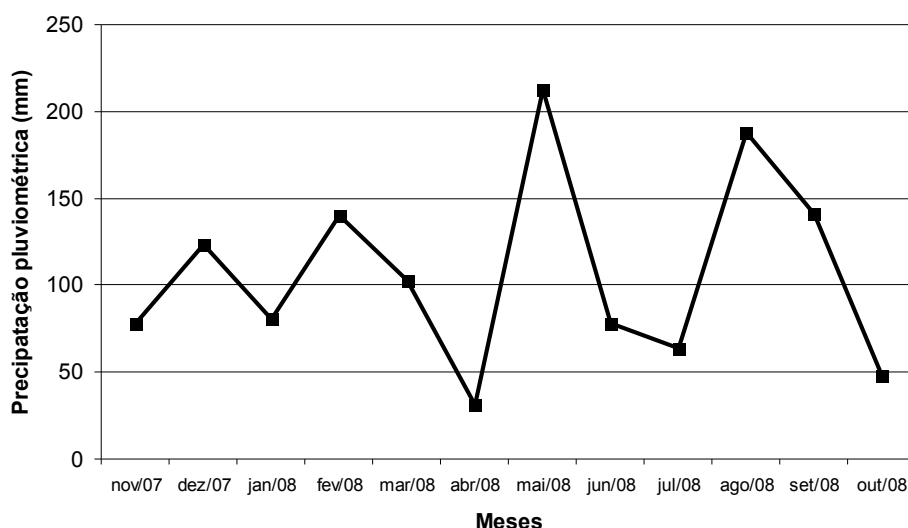


Figura 8. Precipitação pluviométrica (mm) no período de novembro/2007 a outubro/2008 no município de Pelotas, RS.

Fonte: Estação Agroclimatológica de Pelotas, Embrapa Clima Temperado, UFPel.

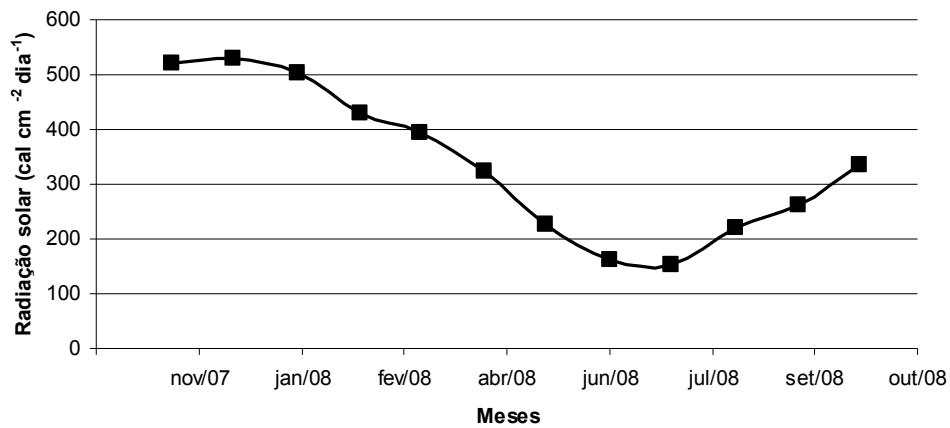


Figura 9. Radiação solar (cal cm<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>) no período de novembro/2007 a outubro/2008 no município de Pelotas, RS.  
 Fonte: Estação Agroclimatológica de Pelotas, Embrapa Clima Temperado, UFPel.

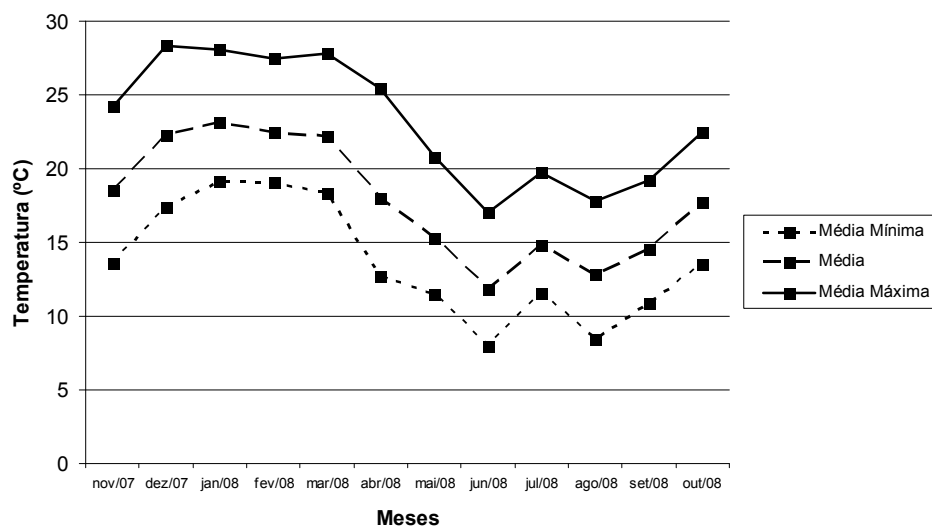


Figura 10. Temperatura (°C) média mínima, média e média máxima no período de novembro/2007 a outubro/2008 no município de Pelotas, RS.  
 Fonte: Estação Agroclimatológica de Pelotas, Embrapa Clima Temperado, UFPel.

#### 4.4. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

A análise do solo foi realizada no Laboratório de Análises de Solos, do Departamento de Solos, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas, RS.

A análise de crescimento, extração e quantificação dos pigmentos fotossintetizantes, extração e dosagem da atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase, dosagem de aminoácidos solúveis totais, nitrato, amônio e

nitrogênio total das plantas foi realizada no Laboratório de Bioquímica Vegetal, do Departamento de Bioquímica, do Instituto de Química e Geociências, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas, RS.

## **4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **4.5.1. Análise de crescimento**

O crescimento das plantas foi determinado pelo acúmulo de massa seca dos caules, folhas, flores e parte aérea e os resultados expressos em g planta<sup>-1</sup>.

As plantas colhidas foram secas inicialmente em temperatura ambiente, ao abrigo de sombra e após em estufa de circulação de ar a 35°C até peso constante. Em seguida, foram armazenadas em sacos de papel pardo e pesadas. Após a pesagem da parte aérea (caule + folha + flor) das plantas no estágio de desenvolvimento reprodutivo e da parte aérea (caule + folha) das plantas no estágio vegetativo, os caules, as folhas e as flores foram separados, armazenados em sacos de papel pardo e posteriormente pesados em balança semi-analítica (marca Marte, modelo AS 2000C).

### **4.5.2. Extração e quantificação de pigmentos fotossintetizantes**

A extração e quantificação dos pigmentos fotossintetizantes foram realizadas com base em Wellburn (1994).

Foram retiradas, ao acaso, três folhas jovens expandidas de cada parcela, que foram imediatamente acondicionadas em banho de gelo em caixa de isopor.

Inicialmente, as folhas foram cortadas em pequenos segmentos, desprezando-se a nervura central. Para cada extração dos pigmentos, foi utilizado 0,06 g de amostra fresca inserida em tubos de ensaio contendo 7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) neutralizado com carbonato de cálcio 5%. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria à temperatura de 65°C por 1 hora, ao abrigo da luz e após resfriados no escuro até atingirem temperatura ambiente para então serem realizadas as leituras das absorbâncias a 480 nm, 649 nm e 665 nm em espectrofotômetro (marca Biospectro, modelo SP-22).



Os teores de clorofila *a*, *b*, total, razão clorofila *a/b*, teores de carotenóides e razão clorofila total/carotenóides foram calculados com base nas equações: Clorofila *a* =  $(12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649})$ ; Clorofila *b* =  $(25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665})$ ; Clorofila total = clorofila *a* + clorofila *b*; Razão clorofila *a/b* = clorofila *a* / clorofila *b*; Carotenóides =  $(1000 \times A_{480}) - (1,29 \times \text{clorofila } a) - (53,78 \times \text{clorofila } b) / 220$ ; Razão clorofila total/carotenóides = clorofila total / carotenóides e os resultados foram expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  MF.

#### **4.5.3. Extração e dosagem da atividade da enzima nitrato redutase (EC 1.6.6.1)**

A extração e dosagem da atividade da enzima nitrato redutase foi obtida empregando-se o ensaio *in vivo*, de acordo com UFPR (2001).

A extração e determinação da atividade da enzima nitrato redutase foi realizada em folhas jovens expandidas e em raízes, em material recém colhido. Após testes preliminares, na qual foi avaliada a atividade da enzima ao longo do dia, escolheu-se o horário das 9 horas da manhã para a coleta.

As amostras de 0,5 g de tecido fresco de folhas e de raízes foram lavadas com água destilada gelada, secas em papel toalha e incubadas em tubos de ensaio com 4 mL de solução tampão fosfato de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,5, 0,2 mol/L contendo  $\text{KNO}_3$  100 mmol/L e propanol 1%) e foram infiltradas sob vácuo a 300 mmHg, durante 1 minuto, repetido por três vezes, com a finalidade de facilitar a penetração do substrato nos tecidos vegetais.

Após a infiltração, os tubos foram incubados em banho-maria a 30°C por 30 minutos no escuro. Retirou-se um volume de 1 mL do meio de reação para tubos com 4 mL de reagente de nitrito (sulfanilamida 1% e N-1naftil etilenodiamina hidrocloreto 0,02%), os quais foram incubados novamente em banho-maria a 30°C por 15 minutos.

A concentração de nitrito foi determinada em espectrofotômetro (marca Biospectro, modelo SP-22) a 540 nm, comparando os valores obtidos com a curva padrão de nitrito em quantidades variando de 0 a 500 nmol de  $\text{NO}_2^-$  e a atividade da enzima foi expressa em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF  $\text{h}^{-1}$ .

#### 4.5.4. Extração e dosagem da atividade da enzima glutamina sintetase (EC 6.3.1.2)

A extração e dosagem da atividade da enzima glutamina sintetase foi realizada utilizando-se o ensaio *in vivo*, segundo Cullimore *et al.* (1983).

As amostras de 2 g de folhas jovens expandidas e de raízes das plantas no estágio de desenvolvimento vegetativo, recém coletadas e previamente lavadas com água destilada gelada, foram maceradas em cadinho de porcelana com N<sub>2</sub> líquido. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com 7 mL de tampão de extração Tris (Tris-Cl 100 mM, pH 7,8, contendo 1 mM de ditioneitol-DTT, 5 mM de glutamato de sódio, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> e 10% de glicerol) e 20% de polyclar AT-PVPP. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 x g por 20 minutos a 4°C e uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante foi dessalinizada em coluna Sephadex G-25 médio, com volume total de 10 mL (PD-10, Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão de extração. O extrato dessalinizado obtido foi utilizado como fonte enzimática. Todos os procedimentos relativos à obtenção dos extratos enzimáticos foram realizados sob a temperatura de 4°C.

De acordo com Cullimore *et al.* (1983) realizou-se a medição de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato que é o produto da reação obtido quando a hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH) é utilizada como substrato alternativo para o amônio. Este método foi utilizado para a análise, devido às dificuldades em se obter uma rápida separação da glutamina do substrato glutamato.

O tempo de reação e o volume do extrato foi padronizado, de maneira a se adequar a velocidade de reação dentro da região de linearidade da curva da atividade enzimática.

Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio contendo glutamato 100 mM, hidroxilamina 80 mM, ATP 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 160 mM, Tris-Cl 100 mM com pH 7,8 e extrato enzimático em volume final de 2,1 mL. A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático ao meio de reação pré-incubado a 30°C, seguida de agitação suave dos tubos. Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 500  $\mu$ L nos tempos 20, 40 e 60 minutos e misturadas em 600  $\mu$ L de reagente paralisante (HCl 0,67 M, ácido tricloroacético 0,20 M e FeCl<sub>3</sub> 0,37 M), para interromper a reação (FERGUSON; SIMS, 1971). Em seguida realizou-se a centrifugação dessa mistura a 14.000 x g durante 5 minutos, a temperatura ambiente, para a remoção das

proteínas. Os tubos utilizados como controle incluíam o extrato enzimático e todos os reagentes do meio de reação conforme descrito acima, exceto o ATP. Para os cálculos de atividade enzimática foram consideradas as leituras observadas nesses controles.

As leituras foram determinadas em espectrofotômetro (marca Biospectro, modelo SP-22) a 535 nm, utilizando como branco uma mistura de 600  $\mu\text{L}$  do reagente paralisante e 500  $\mu\text{L}$  de tampão do ensaio. A quantidade de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato produzida foi estimada a partir da curva de calibração de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato com concentrações de 0 a 1 mM e a atividade da enzima foi expressa em  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$ .

#### **4.5.5. Extração de aminoácidos solúveis totais, nitrato e amônio em folhas e raízes**

A extração de aminoácidos solúveis totais, nitrato e amônio foi realizada conforme Bielecki; Turner (1966).

Amostras de 1 g de folhas jovens expandidas, sem a nervura central, e raízes das plantas nos estádios de desenvolvimento reprodutivo e vegetativo foram coletadas, previamente lavadas com água destilada gelada, secas em papel toalha e armazenadas em freezer para posterior extração e determinação de metabólitos.

Os tecidos vegetais foram homogeneizados em almofariz, utilizando  $\text{N}_2$  líquido e posterior adição de 10 mL de solução extratora M:C:W (metanol:clorofórmio:água na proporção de 12:5:3). As amostras foram deixadas em repouso por 24 horas à temperatura ambiente na ausência de luz e posteriormente centrifugadas a 600 x g durante 10 minutos em tubos de centrífuga reforçados (marca TPP). A cada 8 mL de sobrenadante obtido, foi acrescentado 2 mL de clorofórmio e 3 mL de água pura em tubos de ensaio, os quais foram centrifugados novamente a 600 x g durante 10 minutos para obter o extrato aquoso. Esse foi coletado e concentrado por evaporação em banho-maria a 37°C por 24 horas, com a finalidade de eliminar o excesso de metanol e resíduos de clorofórmio presentes (Figura 11). Os extratos foram então armazenados em tubos de eppendorf, em freezer, para posterior análises dos teores de aminoácidos solúveis totais, nitrato e amônio.

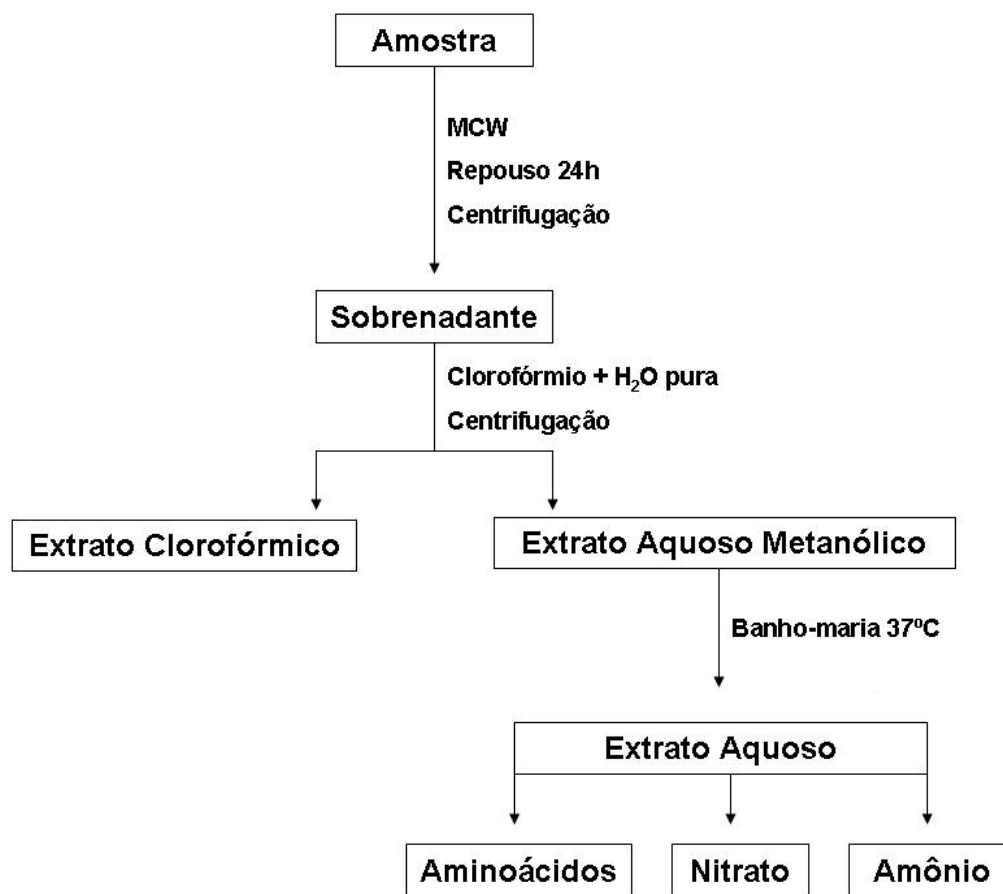


Figura 11. Esquema de extração de aminoácidos solúveis totais, nitrato e amônio em tecidos vegetais.

#### 4.5.6. Dosagem de aminoácidos solúveis totais em folhas e raízes

Os teores de aminoácidos solúveis totais foram determinados segundo Yemm; Cocking (1955).

Extratos de folhas e raízes devidamente diluídos em água pura, em um volume final de 1 mL, em tubos de ensaio, foram acrescentados de 0,5 mL de tampão citrato 0,2 M com pH 5,0, 0,2 mL de reativo de ninhidrina 5% em metilcelusolve (éter monometílico de etilenoglicol) e 1 mL de KCN 2% (v/v) em metilcelusolve (preparada a partir da solução 0,01 M de KCN em água pura). Os tubos de ensaio foram agitados, tampados com bolas de vidro e transferidos para o banho-maria a 100°C por 20 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados no escuro até atingir a temperatura ambiente e após foi acrescentado 1,3 mL de etanol 60%, completando o volume para 4 mL e feita a agitação dos tubos. A densidade ótica dos padrões de leucina (0-200 nmol) e das amostras foi medida a 570 nm, sendo feitas três

repetições para cada amostra e o teor de aminoácidos solúveis totais foi expresso em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF.

#### **4.5.7. Dosagem de nitrato em folhas e raízes**

A determinação de nitrato foi executada conforme o método de Cataldo *et al.* (1975).

O volume de 50  $\mu\text{L}$  de extratos de folhas e raízes devidamente diluídos em água pura, foi misturado a 200  $\mu\text{L}$  de reagente salicílico (ácido salicílico 5% em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado) em tubo de ensaio, seguido de agitação em vórtex. Decorridos 20 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados lentamente aos tubos 4,75 mL de NaOH 2N. Após resfriamento à temperatura ambiente, os tubos foram agitados novamente e efetuadas as leituras de absorbância a 410 nm, das amostras e dos padrões de  $\text{KNO}_3$  (0-500 nmol de  $\text{NO}_3^-$ ), sendo feitas três repetições para cada amostra e o teor de nitrato foi expresso em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF.

#### **4.5.8. Dosagem de amônio em folhas e raízes**

A determinação de amônio seguiu a metodologia estabelecida por Mccullough (1967) utilizando 500  $\mu\text{L}$  de água, amostra e padrão (0-100 nmol de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) e 2,5mL dos reagentes I e II.

Reagente I: Fenol 0,1 M + SNP 170  $\mu\text{M}$  (nitroprussiato de sódio) e Reagente II: NaOH 0,125 M +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0,15 M + NaOCl (3%  $\text{Cl}_2$ ). Após a adição de 2,5 mL do reagente I, os tubos foram agitados para depois acrescentar 2,5 mL do reagente II. Os tubos de ensaio foram agitados, tampados com bolas de vidro e transferidos para o banho-maria a 37°C, por 35 minutos.

Esperou-se até os mesmos atingirem a temperatura ambiente e a densidade ótica dos padrões e amostras contra o branco foi medida a 625 nm, sendo feitas três repetições para cada amostra e o teor de amônio foi expresso em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF.

#### **4.5.9. Dosagem de nitrogênio total em folhas e flores**

A determinação de nitrogênio total foi realizada pelo método descrito por Nelson; Sommers (1973).

Amostras de 0,3 g de material vegetal seco moído (folhas e flores das plantas no estágio de desenvolvimento reprodutivo e folhas das plantas no estágio vegetativo) foram transferidas para tubos de digestão, contendo 2 g de mistura digestora ( $K_2SO_4$  e  $CuSO_4$ ), 5 pérolas de vidro e 10 mL de  $H_2SO_4$  concentrado. Realizou-se uma prova em branco para testar a qualidade dos reagentes. Os tubos foram colocados em bloco digestor e aquecidos lentamente até  $380^\circ C$  e as amostras foram digeridas ao ponto de ebulição da mistura por aproximadamente 60 minutos, até a obtenção de um extrato incolor. Acrescentou-se 15 mL de água destilada em cada tubo, agitou-se até a dissolução e após resfriamento à temperatura ambiente, foi realizada a dosagem de nitrogênio total.

No destilador, foi adicionado cinco grânulos de pó de zinco para controlar a ebulição e 20 mL de NaOH 50%. Do destilado obtido, foi recolhido 80 mL à mistura de 30 mL de ácido bórico 4% e 10 gotas de mistura indicadora mista (0,066 g de verde de bromocresol + 0,132 g de vermelho de metila + 200 mL de etanol). A titulação do amônio formado foi realizada com auxílio de bureta, com solução de HCl 0,1 N e o teor de nitrogênio vegetal foi determinado pela fórmula: Nitrogênio total (%) =  $100 \times 0,014 \times (V_a - V_b) \times F_c \times N / P$ , onde  $V_a$  = volume de HCl 0,1 N gasto na titulação;  $V_b$  = volume de HCl 0,1 N gasto na prova do branco;  $F_c$  = fator de correção da solução de HCl 0,1 N;  $N$  = normalidade do HCl (0,1 N) e  $P$  = peso da amostra em gramas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Influência do nitrogênio e do sombreamento sobre o acúmulo de massa seca e a produção de pigmentos fotossintéticos em *Achillea millefolium* L.

Os níveis de sombreamento influenciaram significativamente o acúmulo de massa seca em ambos os estádios de desenvolvimento de *Achillea millefolium* L., não ocorrendo interação significativa entre este fator e as concentrações de nitrogênio para as características de crescimento avaliadas, com exceção de massa seca de folhas no estágio reprodutivo, conforme análise de variância para massa seca (Tabelas A e B, anexo II).

O sombreamento causou redução no acúmulo de massa seca da parte aérea, caule e flores quando aplicado no estágio reprodutivo e da parte aérea, caule e folhas no estágio vegetativo (Tabela 1). Analisando os resultados, observou-se que o crescimento desta planta é favorecido sob luz plena, embora possivelmente suporte um sombreamento parcial com baixo comprometimento da produção de fitomassa.

Tabela 1. Massa seca da parte aérea, caule, folhas e flores de *Achillea millefolium* L. submetida a níveis de sombreamento em diferentes estádios de desenvolvimento

Níveis de sombreamento	Massa seca (g planta <sup>-1</sup> )					
	Estádio reprodutivo			Estádio vegetativo		
	Parte aérea	Caule	Flores	Parte aérea	Caule	Folhas
Sombrite 75%	125,60 b	75,76 b	8,83 b	98,02 b	29,26 b	71,34 b
Luz plena	247,59 a*	121,92 a	38,43 a	195,43 a	36,53 a	158,90 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em *Artemisia vulgaris* L., pertencente à família Asteraceae, a luz plena induziu maior acúmulo de massa seca da parte aérea, comparada com o sombreamento a 50% (OLIVEIRA, 2006), o que concorda com os resultados obtidos com *Achillea millefolium* L.

A luz controla o acúmulo de massa seca na planta, contribuindo para o crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo que a plasticidade relacionada com a adaptação a situações diferenciadas de radiação resulta em modificações no aparato fotossintético, de forma a promover o acúmulo eficiente de massa seca e promover o crescimento (ALVARENGA *et al.*, 2003). Lopes *et al.* (1986) afirmam que a redução da intensidade luminosa pode diminuir o processo fotossintético e com isso, a produção de biomassa seca.

Costa (1996) afirma que as folhas de cacau (*Theobroma cacao*) foram responsáveis pelo maior acúmulo de massa seca em relação ao caule, com o incremento dos níveis de luz (25, 50 e 100% de radiação fotossinteticamente ativa), resultados semelhantes ao obtido com *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo.

A massa seca das folhas da planta no estágio reprodutivo foi influenciada pela interação entre os fatores principais, doses de nitrogênio e níveis de sombreamento (Tabela A, anexo II). As plantas sob luz plena apresentaram acúmulo significativo de massa seca das folhas nas concentrações 75 e 150 Kg uréia ha<sup>-1</sup> em relação às plantas sombreadas. Sob ausência da adubação nitrogenada o sombreamento não influenciou essa variável (Tabela 2).

Tabela 2. Massa seca de folhas de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento

Níveis de sombreamento	Massa seca de folhas (g planta <sup>-1</sup> )		
	0 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	75 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	150 Kg uréia ha <sup>-1</sup>
<b>Sombrite 75%</b>	40,15 Aa	25,12 Bb	28,34 ABb
<b>Luz plena</b>	57,78 Aa*	74,15 Aa	56,77 Aa

\*Os valores de médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e letra minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



De acordo com a análise de variância, as diferentes concentrações de nitrogênio influenciaram distintamente o acúmulo de massa seca da parte aérea das plantas em função do estágio de desenvolvimento (Tabelas A e B, anexo II).

A concentração de nitrogênio de 75 Kg uréia ha<sup>-1</sup> induziu um aumento significativo de massa seca da parte aérea das plantas no estágio vegetativo (Tabela 3). No entanto, o acúmulo de massa seca do caule e das folhas não foi influenciado pelas diferentes concentrações de nitrogênio. Os resultados sugerem que a concentração de nitrogênio 75 Kg uréia ha<sup>-1</sup> foi suficiente para estimular o acúmulo de fitomassa, e possivelmente a utilização dessa concentração ou próxima dessa, pode contribuir no crescimento das plantas de *Achillea millefolium* L.

Por outro lado, quando o sombreamento foi realizado no estágio de desenvolvimento reprodutivo, o acúmulo de massa seca da parte aérea, caule e flores, não foi influenciado significativamente pelas diferentes concentrações de nitrogênio.

Tabela 3. Massa seca da parte aérea, caule, folhas e flores de *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio em diferentes estádios de desenvolvimento

Concentrações de N (Kg uréia ha <sup>-1</sup> )	Massa seca (g planta <sup>-1</sup> )					
	Estádio reprodutivo			Estádio vegetativo		
	Parte aérea	Caule	Flores	Parte aérea	Caule	Folhas
0	209,13 a*	111,79 a	26,09 a	131,60 b	30,08 a	101,52 a
75	175,47 a	86,01 a	22,87 a	163,37 a	34,13 a	129,24 a
150	175,20 a	98,72 a	21,92 a	145,21 ab	34,48 a	114,60 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A análise de variância demonstrou que os teores foliares de pigmentos fotossintéticos de *Achillea millefolium* L., clorofila *a*, *b* e total, foram influenciados pelos níveis de sombreamento em ambos os estádios de desenvolvimento da planta. Já o teor de carotenóides foi afetado por este fator no estágio reprodutivo e a razão clorofila *a/b* e clorofila total/carotenóides no estágio vegetativo. As concentrações de nitrogênio influenciaram também, em ambos os estádios de desenvolvimento da planta, a razão clorofila total/carotenóides (Tabelas A e B, anexo II).

A deficiência de luz estimulou significativamente os teores de clorofila *a*, *b*, total em ambos os estádios de desenvolvimento e o teor de carotenóides no estágio

reprodutivo (Tabelas 4 e 5). No estágio vegetativo, o sombreamento causou um aumento significativo na razão clorofila total/carotenóides e redução na razão clorofila *a/b* (Tabela 5).

Tabela 4. Teores de clorofila *a*, *b*, total, razão clorofila *a/b*, teores de carotenóides e razão clorofila total/carotenóides em *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, submetida a níveis de sombreamento

Níveis de sombreamento	Teor de pigmento (mg g <sup>-1</sup> MF)					
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila Total	Razão clorofila <i>a/b</i>	Carotenóides	Razão clorofila total/carotenóides
Sombrite 75%	1,34 a*	0,44 a	1,64 a	2,82 a	0,26 a	6,41 a
Luz plena	0,97 b	0,30 b	1,13 b	3,01 a	0,21 b	6,52 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 5. Teores de clorofila *a*, *b*, total, razão clorofila *a/b*, teores de carotenóides e razão clorofila total/carotenóides em *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, submetida a níveis de sombreamento

Níveis de sombreamento	Teor de pigmento (mg g <sup>-1</sup> MF)					
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila Total	Razão clorofila <i>a/b</i>	Carotenóides	Razão clorofila total/carotenóides
Sombrite 75%	1,52 a*	0,56 a	2,08 a	2,73 b	0,27 a	7,60 a
Luz plena	1,30 b	0,43 b	1,73 b	2,98 a	0,27 a	6,44 b

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

He *et al.* (1996) observaram que os teores de clorofila são mais elevados em folhas sombreadas, aumentando dessa forma a capacidade de absorção de luz de diferentes comprimentos de onda nos picos da fotossíntese.

Os maiores teores de pigmentos cloroplastídicos (clorofila *a* e *b*) em *Aniba rosaeodora* Ducke. da família Lauraceae foram obtidos nas plantas sob sombra (10 a 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e os menores teores encontrados nas expostas a pleno sol (GONÇALVES *et al.*, 2005), o que corrobora com os resultados obtidos com *Achillea millefolium* L.

As mudas de *Passiflora edulis* (maracujá-amarelo), da família Passifloraceae, mantidas a pleno sol apresentaram menores teores de clorofila *a*, aumentando o teor em função do maior sombreamento oferecido às plantas (20%, 30%, 40%, 50%, 60% e 70%) (REGO; POSSAMAI, 2006).

A tendência de redução na razão da clorofila *a/b* à medida que se reduz a intensidade luminosa, deve-se à maior proporção de clorofila *b* em ambientes sombreados, o que está associado ao fato da sua degradação ser mais lenta do que a clorofila *a* (ENGEL; POGGIANI, 1991).

O aumento da proporção relativa de clorofila *b* em plantas com baixa luminosidade é uma resposta importante, pois a clorofila *b* capta energia de outros comprimentos de onda e a transfere para a clorofila *a*, que efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese (SCALON *et al.*, 2002). Essa resposta é adaptativa da planta, de modo a se tornar a captação de luz mais eficiente em condições ambientais de baixa intensidade luminosa. As plantas sombreadas recebem radiação mais difusa e rica em vermelho extremo, o que induziria a um aumento relativo da clorofila *b* em relação à clorofila *a* (WHATLEY; WHATLEY, 1982).

A diminuição na proporção da razão clorofila *a/b* em um ambiente sombreado devido ao aumento da proporção da clorofila *b* encontrada no estágio vegetativo assemelha-se ao que foi observado em outras espécies, como *Bauhinia forficata* da família Fabaceae (ATROCH, 1999), *Mikania glomerata* da família Asteraceae (CASTRO, 2002) e *Coffea arabica* L. da família Rubiaceae (GOMES, 2004).

Um incremento na concentração de clorofila total ocorreu em plantas de *Coffea arabica* L. (GOMES, 2004) e em plantas de *Bauhinia forficata* (ATROCH, 1999) na presença de sombreamento, assim como os resultados obtidos com *Achillea millefolium* L.

Alvarenga *et al.* (2003) observaram maiores valores de clorofila total e clorofila *a* em folhas submetidas a 50 e 70% de sombreamento em relação aos demais níveis de irradiância. Portanto, folhas de sombra possuem, geralmente, maior concentração de clorofilas em relação às crescidas sob pleno sol.

Os teores foliares de carotenóides tendem a aumentar com a redução da intensidade luminosa (FERRAZ; SILVA, 2001) e podem ser utilizados para estimar o potencial fotossintético das plantas, pela sua ligação direta com a absorção e transferência de energia luminosa e ao crescimento e à adaptação a diversos ambientes (REGO; POSSAMAI, 2006).

A fertilização nitrogenada não influenciou significativamente os teores foliares de clorofila *a*, *b*, total, razão clorofila *a/b* e teores de carotenóides em *Achillea*

*millefolium* L. tendo, no entanto, efeito sobre a razão clorofila total/carotenóides em ambos os estádios de desenvolvimento reprodutivo e vegetativo (Tabelas 6 e 7).

Freqüentemente o teor foliar de clorofila está associado ao conteúdo de nitrogênio da planta (YODER; PETTIGREW-CROSBY, 1995). Possivelmente, o nitrogênio absorvido foi direcionado à síntese de outras moléculas nitrogenadas, sugerindo que o teor de nitrogênio presente no solo no tratamento controle, foi suficiente à produção de clorofilas em concentração compatível às necessidades metabólicas impostas por maiores doses de nitrogênio.

Tabela 6. Teores de clorofila *a*, *b*, total, razão clorofila *a/b*, teores de carotenóides e razão clorofila total/carotenóides em *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio

Concentrações de N (Kg uréia ha <sup>-1</sup> )	Teor de pigmento (mg g <sup>-1</sup> MF)					
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila Total	Razão clorofila <i>a/b</i>	Carotenóides	Razão clorofila total/carotenóides
0	1,10 a	0,37 a	1,33 a	2,78 a	0,22 a	6,89 a
75	1,14 a	0,37 a	1,46 a	2,98 a	0,24 a	6,18 b
150	1,22 a*	0,36 a	1,38 a	2,98 a	0,25 a	6,33 ab

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 7. Teores de clorofila *a*, *b*, total, razão clorofila *a/b*, teores de carotenóides e razão clorofila total/carotenóides em *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio

Concentrações de N (Kg uréia ha <sup>-1</sup> )	Teor de pigmento (mg g <sup>-1</sup> MF)					
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila Total	Razão clorofila <i>a/b</i>	Carotenóides	Razão clorofila total/carotenóides
0	1,38 a	0,50 a	1,88 a	2,74 a	0,26 a	7,31 a
75	1,44 a*	0,50 a	1,94 a	2,90 a	0,29 a	6,66 b
150	1,41 a	0,49 a	1,90 a	2,93 a	0,27 a	7,09 ab

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

## 5.2. Assimilação de nitrogênio em *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento

A atividade da enzima nitrato redutase em folhas de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo foi influenciada de maneira significativa

pelos diferentes horários de coleta, conforme mostram os resultados da análise de variância na tabela C em anexo II.

Verificou-se variação na atividade da enzima em função do horário do dia. As maiores atividades foram observadas às 8h30min e às 11h (Tabela 8). Nos horários posteriores houve diminuição sendo significativa apenas às 18h30min. O aumento na atividade da enzima nas primeiras horas de radiação está possivelmente relacionado ao efeito da luz sobre a enzima. Esse efeito pode ser direto, ativando a enzima, ou indireto, através do processo da fotossíntese, fornecendo energia para a assimilação do nitrato (SMIRNOFF; STEWART, 1985), pois a enzima nitrato redutase utiliza o NADH do citosol como cofator (MEGURO; MAGALHÃES, 1982) que se apresenta mais disponível na presença de luz.

Tabela 8. Atividade da enzima nitrato redutase em folhas de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo em diferentes horários do dia

Horários do dia	Atividade da enzima nitrato redutase ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$ )
8h30min	4,14 a*
11h	4,08 a
13h30min	3,53 ab
16h	3,00 ab
18h30min	2,56 b

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

No terceiro horário de coleta (13h30min) ocorreu uma queda na atividade da enzima. Neste horário, há, geralmente, uma maior intensidade de radiação solar e uma temperatura do ar mais elevada. Intensidade luminosa e temperatura acima do ótimo da enzima podem inibir a ação da nitrato redutase reduzindo sua atividade (MAGALHÃES, 1976).

Pereira-Netto *et al.* (1998) mostraram que variações na temperatura e na intensidade de radiação solar induziram mudanças na atividade da enzima nitrato redutase na espécie *Pueraria lobata* da família Fabaceae. Esta resposta da enzima à intensidade luminosa parece ser uma característica específica, pois em outras espécies foram verificadas respostas semelhantes (NIEVOLA; MERCIER, 2001).

O sombreamento influenciou a atividade da enzima nitrato redutase em folhas de *Achillea millefolium* L. apenas no estágio de desenvolvimento reprodutivo causando redução significativa da atividade da enzima (Tabela C, anexo II).

De acordo com a análise de variância, em raízes, a atividade não foi influenciada pelos níveis de sombreamento em ambos os estádios de desenvolvimento (Tabelas D e E, anexo II).

Analisando os dados na tabela 9, verificou-se que a atividade da enzima nitrato redutase é mais acentuada nas folhas do que nas raízes e esse resultado pode ter sido influenciado pelo processo de nitrificação do solo, uma vez que o nitrogênio foi disponibilizado às plantas na forma de amônio e sua conversão em nitrato é dependente desse processo. Com isso, sugere-se que os tecidos foliares de ambos os estádios de desenvolvimento foram os sítios de assimilação preferencial da atividade da enzima nitrato redutase.

Tabela 9. Atividade da enzima nitrato redutase em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo e vegetativo, submetida a níveis de sombreamento

Níveis de sombreamento	Atividade da enzima nitrato redutase ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$ )			
	Estádio reprodutivo		Estádio vegetativo	
	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes
Sombrite 75%	2,58 b	2,58 a	4,19 a	2,34 a
Luz plena	4,34 a*	2,35 a	3,86 a	2,52 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em muitas espécies vegetais, quando as raízes recebem pequenas quantidades de nitrato, esse é reduzido principalmente nesses órgãos. À medida que o suprimento de nitrato aumenta, uma proporção maior do nitrato absorvido é translocado para as partes aéreas onde será assimilado. Mesmo sob condições similares de disponibilidade de nitrato, o balanço do metabolismo do nitrato entre raízes e parte aérea, conforme indicado pela proporção da atividade da enzima nitrato redutase em cada um dos dois órgãos ou pelas concentrações relativas de nitrato e nitrogênio reduzido na seiva do xilema, varia de espécie para espécie (MARSCHNER, 1995).

Nas plantas como o carrapicho (*Xanthium strumarium*), o metabolismo do nitrato é restrito às partes aéreas e em outras plantas, como o tremoço branco (*Lupinus albus*), a maior parte do nitrato é metabolizado nas raízes (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A luz e o teor de nitrato são fatores importantes na indução e manutenção da atividade da enzima nitrato redutase nos tecidos vegetais (VINCENTZ *et al.*, 1993). De acordo Hipkin *et al.* (1984) a atividade da enzima nitrato redutase nas folhas de várias espécies vegetais aumenta durante as horas de luz e decresce no escuro.

A maioria das espécies reduz o nitrato a nitrito pela ação da enzima nitrato redutase nas folhas. Essa enzima requer compostos redutores, como o NAD(P)H, provenientes da fotossíntese. Dessa forma, a ação da enzima nas folhas é favorecida, já que em raízes e outros órgãos subterrâneos há a necessidade da translocação e oxidação de carboidratos para sua atividade (AIDAR *et al.* 2003).

Segundo Smirnoff *et al.* (1984) a maior atividade da enzima nitrato redutase foi verificada nas folhas de plantas lenhosas. Na espécie *Bactris gasipaes*, a atividade da enzima nitrato redutase foi significativamente maior nas folhas, quando comparada com as raízes (OLIVEIRA *et al.*, 2005). O mesmo foi observado no gênero *Phaseolus* da família Fabaceae, em contraste com a baixa atividade detectada nas raízes e nódulos (ANDREWS *et al.*, 1990), na planta medicinal *Brugmansia suaveolens* da família Solanaceae (LOPES, 2008) e em alface da cultivar 'Vera' (LIMA *et al.*, 2007).

A redução de nitrato a amônia é um processo energeticamente caro e deve ser coordenada com o fluxo de carbono assimilado de forma a manter taxas ótimas de crescimento. Teoricamente, o local mais adequado para a redução de nitrato é nos tecidos fotossintetizantes. O nitrato sendo reduzido a nitrito com um gasto de 2 elétrons é transferido para os cloroplastos e reduzido a amônia, com gasto de mais de 6 elétrons produzidos na fase fotoquímica (TISCHNER, 2000).

A ausência da influência da luz plena na redução do nitrato em tecidos foliares quando avaliadas no estágio de desenvolvimento vegetativo, pode indicar efeito da adaptabilidade da espécie à baixa intensidade luminosa, visto o elevado número de dias que as plantas permaneceram sombreadas.

As diferentes concentrações de nitrogênio não influenciaram significativamente a atividade da enzima nitrato redutase em folhas de *Achillea millefolium* L. em ambos os estádios de desenvolvimento, conforme mostram os dados da análise de variância na tabelas C e E em anexo II.

Esses resultados podem ser explicados em parte pelo fato de que a fonte de nitrogênio fornecida às plantas, disponibilizou amônio que, dependendo da atividade microbiana no solo, precipitação, disponibilidade de oxigênio e pH é convertida em

nitrito pelo processo de nitrificação, disponibilizando o íon nitrato em quantidades variadas para as plantas, o que provavelmente não tenha ocorrido em proporções suficientes a modificar significativamente a atividade da enzima nitrato redutase entre os tratamentos.

No estágio reprodutivo, as diferentes concentrações de nitrogênio não influenciaram de maneira significativa a atividade da enzima nitrato redutase em raízes, apenas no estágio vegetativo (Tabelas D e E, anexo II).

Houve um aumento sob o tratamento com 75 Kg de uréia ha<sup>-1</sup> e redução significativa na concentração 150 Kg de uréia ha<sup>-1</sup>, o que pode estar relacionado à grande disponibilidade de amônio em relação ao nitrato neste tratamento (Tabela 10).

Tabela 10. Atividade da enzima nitrato redutase em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo e vegetativo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio

Concentrações de N (Kg uréia ha <sup>-1</sup> )	Atividade da enzima nitrato redutase (µmol g <sup>-1</sup> MF h <sup>-1</sup> )			
	Estádio reprodutivo		Estádio vegetativo	
	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes
0	3,54 a	2,68 a	4,55 a	2,27 ab
75	3,03 a	2,49 a	3,74 a	3,12 a
150	3,83 a*	2,22 a	3,77 a	1,90 b

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Conforme observado na tabela E em anexo II, referente aos resultados da análise de variância, os níveis de sombreamento influenciaram a atividade da enzima glutamina sintetase em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, sendo observado redução significativa da atividade da enzima em ambos os órgãos das plantas sombreadas (Tabela 11).

Nos tecidos foliares houve forte efeito estimulatório da luz na atividade da enzima glutamina sintetase. Esse comportamento da atividade enzimática indica a importância da luz na geração de energia para a assimilação do amônio, seja proveniente do nitrato transportado das raízes à parte aérea ou ao aquele proveniente da fotorrespiração. A menor atividade da enzima glutamina sintetase encontrada nas raízes das plantas sombreadas, sugere também a importância da luz na atividade enzimática, o que pode estar relacionado à geração de açúcares via



fotossíntese, necessários à produção de energia para assimilação do amônio nos tecidos radiculares.

Tabela 11. Atividade da enzima glutamina sintetase em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, submetida a níveis de sombreamento

Níveis de sombreamento	Atividade da enzima glutamina sintetase ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$ )	
	Folhas	Raízes
Sombrite 75%	4,83 b	1,79 b
Luz plena	10,46 a*	2,88 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os valores obtidos para a atividade da enzima glutamima sintetase em mudas de *Coffea arabica* L. (café) foram maiores nas plantas expostas à radiação solar (100% de luz) em comparação às plantas a meia sombra (50% luz) (NETO, 2005).

As folhas apresentaram atividade superior às raízes, sugerindo ser o sítio preferencial de assimilação de nitrogênio. Grande parte da atividade da glutamina sintetase foliar corresponde à isoenzima cloroplastídica, GS<sub>2</sub>, que desempenha um papel fundamental na assimilação do amônio gerado na fotorrespiração (FUENTES *et al.*, 2001). Já a isoenzima citossólica, GS<sub>1</sub>, encontra-se em maior concentração nos tecidos radiculares, para auxiliar na mobilização e transporte de nitrogênio na planta (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A atividade da enzima glutamina sintetase foi superior nas folhas em relação às raízes na espécie medicinal *Brugmansia suaveolens* da família Solanaceae (LOPES, 2008), em *Crotalaria juncea* L. da família Fabaceae (MENDONÇA, 2002) e em plantas jovens de seringueira (LEMOS *et al.*, 1999), o que corrobora com os resultados obtidos com *Achillea millefolium* L.

Conforme observado na tabela E em anexo II, referente aos dados da análise de variância, a atividade da enzima glutamina sintetase em folhas de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, foi influenciada de maneira significativa pelas concentrações de nitrogênio.

Houve um aumento significativo da atividade enzimática nos tecidos foliares sob o tratamento com 75 Kg de uréia ha<sup>-1</sup> e uma redução na ausência de adubação nitrogenada e na concentração 150 Kg de uréia ha<sup>-1</sup> (Tabela 12). Nos tecidos

radiculares de *Achillea millefolium* L. a atividade da enzima glutamina sintetase não foi influenciada significativamente pelas concentrações de nitrogênio.

Tabela 12. Atividade da enzima glutamina sintetase em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio

Concentrações de N (Kg uréia ha <sup>-1</sup> )	Atividade da enzima glutamina sintetase (µmol g <sup>-1</sup> MF h <sup>-1</sup> )	
	Folhas	Raízes
0	7,19 b	2,09 a
75	10,05 a*	2,47 a
150	5,70 b	2,44 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os níveis de sombreamento não influenciaram significativamente o teor de aminoácidos solúveis totais em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, já as concentrações nitrogenadas influenciaram os teores radiculares (Tabela D, anexo II).

Os tecidos radiculares apresentaram um teor de aminoácidos solúveis totais aproximadamente cinco vezes maior em relação às folhas (Tabela 13). Esses resultados analisados conjuntamente com a atividade elevada da enzima glutamina sintetase nas folhas sugere uma atividade do metabolismo nitrogenado diferenciado entre os dois órgãos, podendo-se atribuir o teor elevado de aminoácidos nas raízes à transferência do nitrogênio assimilado nas folhas ao sistema radicular via floema.

Tabela 13. Teor de aminoácidos solúveis totais em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, submetida a níveis de sombreamento

Níveis de sombreamento	Teor de aminoácidos solúveis totais (µmol g <sup>-1</sup> MF)	
	Folhas	Raízes
Sombrite 75%	3,41 a	18,21 a
Luz plena	3,67 a*	17,35 a

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O aumento nos teores de aminoácidos solúveis totais nas folhas de *Coffea arabica* L. (café) foi acompanhado pela radiação solar (GONÇALVES, 2007), diferente do observado com *Achillea millefolium* L.

Marchetti (2006) verificou na espécie de *Memora peregrina* da família Bignoniaceae, uma concentração de aminoácidos solúveis totais maior em rizomas quando comparada com as folhas, assim como observado com *Achillea millefolium* L. O teor de aminoácidos é expressivo nos rizomas de *Memora peregrina* durante seu percurso entre floema e xilema, podendo ocorrer a introdução de mais aminoácidos no sistema vascular, sendo estes, produtos dos processos de assimilação de nitrogênio.

O teor de aminoácidos solúveis totais nas raízes de plantas jovens de seringueira cultivada na presença de amônio foi maior quando comparado com o das folhas (SHAN *et al.*, 2007).

Na tabela 14 constam os teores de aminoácidos solúveis totais em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio.

Os tecidos foliares não sofreram influência significativa das concentrações de nitrogênio testadas. Já as raízes foram influenciadas, apresentando teores significativamente menores na presença de adubação nitrogenada. A presença do íon amônio deveria estimular a formação de aminoácidos elevando o seu teor. É possível que nesses tratamentos, a maior disponibilidade de nitrogênio tenha estimulado a produção de outros compostos nitrogenados a partir dos aminoácidos, como proteínas e ácidos nucleicos, necessários ao crescimento da planta, diminuindo o seu teor.

Tabela 14. Teor de aminoácidos solúveis totais em folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, submetida a diferentes concentrações de nitrogênio

Concentrações de N (Kg uréia ha <sup>-1</sup> )	Teor de aminoácidos solúveis totais (µmol g <sup>-1</sup> MF)	
	Folhas	Raízes
0	3,69 a*	20,96 a
75	3,26 a	16,19 b
150	3,66 a	16,19 b

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Conforme observado na tabela E em anexo II, referente aos resultados da análise de variância, o teor de aminoácidos solúveis totais em raízes *Achillea*

*millefolium* L., dosado no estágio de desenvolvimento vegetativo, foi influenciado pela interação significativa entre os fatores principais, doses de nitrogênio e níveis de sombreamento.

O sombreamento induziu um aumento do teor de aminoácidos solúveis totais nas raízes em todas as concentrações de nitrogênio avaliadas (Tabela 15). A adubação nitrogenada causou elevação significativa do teor de aminoácidos solúveis totais, sendo este efeito mais pronunciado nas plantas sombreadas, o que pode caracterizar um processo adaptativo à baixa intensidade luminosa. Os teores mais elevados podem ser reflexo do maior acúmulo de nitrogênio disponível para a síntese desses compostos associado à sua menor utilização devido à condição limitante para o crescimento.

Tabela 15. Teor de aminoácidos solúveis totais em raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento

Níveis de sombreamento	Teor de aminoácidos solúveis totais ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)		
	0 Kg uréia $\text{ha}^{-1}$	75 Kg uréia $\text{ha}^{-1}$	150 Kg uréia $\text{ha}^{-1}$
<b>Sombrite 75%</b>	16,08 Ba*	24,40 Aa	22,73 Aa
<b>Luz plena</b>	6,88 Ba	8,77 Bb	14,86 Ab

\*Os valores de médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e letra minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os níveis de sombreamento e as diferentes concentrações de nitrogênio não influenciaram significativamente o teor de aminoácidos solúveis totais em folhas de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo (Tabela E, anexo II). Os tecidos radiculares apresentaram um teor de aminoácidos solúveis totais três vezes maior em relação às folhas.

A análise de variância do teor de nitrato nas folhas e raízes de plantas de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo submetida a doses de nitrogênio e níveis de sombreamento, resultaram em interação significativa entre esses fatores, conforme tabela D em anexo II.

Em tecidos foliares das plantas sombreadas, nutridas com a concentração mais elevada de nitrogênio, foi registrado um teor significativamente mais elevado de nitrato, o que deve ter sido resultado da baixa intensidade de luz, necessária para

redução do íon, combinado provavelmente à maior disponibilidade do íon amônio fornecido pela adubação nitrogenada (Tabela 16).

Tabela 16. Teor de nitrato nas folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento

Níveis de sombreamento	Teor de nitrato ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)					
	Folhas			Raízes		
	0 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	75 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	150 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	0 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	75 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	150 Kg uréia ha <sup>-1</sup>
<b>Sombrite 75%</b>	14,80 Ba	11,72 Ca	17,55 Aa	37,36 Ab	40,87 Ab	42,89 Ab
<b>Luz plena</b>	16,74 Aa*	12,60 Ca	13,18 Bb	57,04 Aa	50,67 Ba	58,16 Aa

\*Os valores de médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e letra minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O maior teor de nitrato encontrado nas raízes de plantas não sombreadas pode estar relacionado à maior nitrificação do solo, pois neste tratamento, a menor umidade e maior temperatura podem ter favorecido a atividade microbiana em relação ao solo sombreado, disponibilizando assim, maior quantidade de nitrato às raízes. Não pode ser descartada também a condição energética favorecida das plantas sob luz plena, favorecendo dessa forma a absorção de nitrato, processo dependente de energia.

A capacidade da planta para reduzir nitrato é controlada por uma série de fatores, como a disponibilidade de agentes redutores e substrato no citoplasma, a concentração e o nível da atividade da enzima nitrato redutase e a disponibilidade de co-fatores e íons metálicos (MARENCO; LOPES, 2005).

Os dados obtidos com a atividade da enzima nitrato redutase sugere que o nitrato é assimilado em maior quantidade nos tecidos radiculares em relação aos tecidos foliares, pois a atividade da enzima mostrou-se mais acentuada nas folhas, o que resultaria em menor acúmulo de substrato disponível nas folhas em relação às raízes. Segundo Dose *et al.* (1997) a maioria das espécies reduz o nitrato a nitrito pela ação da enzima nitrato redutase nas folhas.

As plantas jovens de seringueira cultivadas na presença de amônio apresentaram maior concentração de nitrato nas raízes, quando comparadas com as folhas (SHAN *et al.*, 2007), semelhante ao observado em *Achillea millefolium* L.

No estágio de desenvolvimento vegetativo, os níveis de sombreamento influenciaram significativamente os teores de nitrato de folhas e raízes de *Achillea millefolium* L., conforme são mostrados na tabela E em anexo II.

O sombreamento causou um aumento do teor de nitrato nas folhas e raízes do estágio vegetativo (Tabela 17). Isto pode estar relacionado à menor utilização desse íon devido à menor intensidade de luz, que pode influenciar diretamente na ativação da enzima nitrato redutase nas folhas e indiretamente também, reduzindo o processo fotossintético em consequência da geração de poder redutor nas raízes.

Tabela 17. Teor de nitrato nas folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, submetida a níveis de sombreamento

Níveis de sombreamento	Teor de nitrato ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	
	Folhas	Raízes
Sombrite 75%	4,41 a*	8,21 a
Luz plena	1,65 b	4,67 b

\*As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Devido aos efeitos da luz na atividade da enzima nitrato redutase, plantas de sombra acumulam maiores concentrações de nitrato do que plantas em pleno sol (MARENCO; LOPES, 2005), confirmando com os resultados obtidos com *Achillea millefolium* L.

Os teores de nitrato em folhas de *Coffea arabica* L. (café) da família Rubiaceae foram maiores nas plantas com 48% de sombreamento (KHOURI, 2007).

As diferentes concentrações de nitrogênio não influenciaram de forma significativa o teor de nitrato nas folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, conforme são mostradas na tabela E em anexo II.

Os resultados da análise de variância mostrando a interação significativa entre os fatores principais, doses de nitrogênio e níveis de sombreamento, sobre o teor de amônio nas folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo são representados na tabela E em anexo II.

Nas plantas cultivadas sob luz plena, os teores de amônio encontrados nos tecidos radiculares e foliares foram relativamente próximos. Em alguns trabalhos, foi observado que o amônio é quantitativamente assimilado nas raízes e não translocado para a parte aérea (SESHLEY *et al.*, 1992). No entanto, os teores de

amônio determinados neste estudo em folhas e raízes não comprovam essa hipótese em função da baixa diferença entre esses tecidos. Plantas que deslocam grandes quantidades de amônio para a parte aérea podem encontrar dificuldades com a produção líquida associada com a assimilação do amônio (RAVEN; SMITH, 1976), e isso poderia levar à toxicidade e redução do crescimento (GERENDAS *et al.*, 1997).

Nas folhas e raízes, houve um efeito estimulatório da luz sobre o teor de amônio. Esse resultado foi mais intenso nos tecidos radiculares, o que pode ser devido à maior absorção de amônio ou redução do íon nitrato. Em folhas, o amônio liberado pelo processo fotorrespiratório pode ter contribuído significativamente nesse processo.

A temperatura e a luz podem desempenhar um papel importante no acúmulo de amônio, sobretudo influenciar na produção e disponibilidade de diversos compostos utilizados na assimilação do amônio em folhas e raízes (HUSTED *et al.*, 2000).

Em tecidos foliares das plantas submetidas à luz plena, nutridas com adubação nitrogenada, foi registrado um teor significativamente mais elevado de amônio, sendo superior na concentração de 150 kg uréia ha<sup>-1</sup>. Em raízes, esse efeito não foi observado, no entanto, em plantas sombreadas, as concentrações de nitrogênio influenciaram o acúmulo de amônio, sendo observado um teor significativamente maior na ausência de adubação nitrogenada e na concentração de 75 kg uréia ha<sup>-1</sup> (Tabela 18).

Tabela 18. Teor de amônio nas folhas e raízes de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento

Níveis de sombreamento	Teor de amônio ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)					
	Folhas			Raízes		
	0 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	75 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	150 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	0 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	75 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	150 Kg uréia ha <sup>-1</sup>
<b>Sombrite 75%</b>	0,23 Aa*	0,07 Cb	0,14 Bb	0,05 ABb	0,09 Ab	0,03 Bb
<b>Luz plena</b>	0,19 Ba	0,22 ABa	0,23 Aa	0,24 Aa	0,21 Aa	0,22 Aa

\*Os valores de médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e letra minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Conforme observado na tabela D em anexo II, referente aos resultados da análise de variância, o teor de nitrogênio total nas flores de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo foi influenciado pela interação significativa entre os fatores principais, doses de nitrogênio e níveis de sombreamento.

O teor de nitrogênio total nas flores foi superior no tratamento sob luz plena, sendo significativamente maior apenas na dose de 150 Kg uréia ha<sup>-1</sup> (Tabela 19). Nesta concentração foi identificado menor teor de nitrogênio nas flores das plantas sombreadas, não diferindo significativamente da dose de 75 Kg uréia ha<sup>-1</sup>.

Tabela 19. Teor de nitrogênio total em flores de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento

Níveis de sombreamento	Teor de nitrogênio total (%)		
	0 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	75 Kg uréia ha <sup>-1</sup>	150 Kg uréia ha <sup>-1</sup>
<b>Sombrite 75%</b>	1,25 Aa	1,16 ABa	1,05 Bb
<b>Luz plena</b>	1,27 Aa*	1,39 Aa	1,37 Aa

\*Os valores de médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e letra minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os teores de nitrogênio total em folhas de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo e vegetativo não foram influenciados pelos fatores níveis de sombreamento e concentrações de nitrogênio, conforme a análise de variância apresentada nas tabelas D e E em anexo II.

Os tecidos foliares apresentaram um teor de nitrogênio total duas vezes maior em relação às flores. O teor de nitrogênio total foi maior nas folhas de plantas de soja (MARENCO; LOPES, 2005) e em plantas jovens de seringueira (LEMOS *et al.*, 1999). De acordo com Khouri (2007), os teores de nitrogênio total foram maiores no ápice das folhas *Coffea arabica* L. (café) no estágio de desenvolvimento reprodutivo (estádio de expansão rápida do fruto).



## 6. CONCLUSÕES

A luz influencia o crescimento, produção de pigmentos fotossintéticos e assimilação de nitrogênio em mil-folhas (*Achillea millefolium* L.), enquanto que as doses nitrogenadas fornecidas na forma de amônio apresentam um menor efeito sobre esses fatores.

O sombreamento reduz o acúmulo de massa seca da parte aérea, caule, folhas e flores e estimula os teores foliares de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides.

As atividades das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase são maiores nas folhas do que em raízes, sugerindo ser os tecidos foliares o sítio preferencial de assimilação de nitrogênio. A luz plena estimula fortemente a atividade da enzima glutamina sintetase nos tecidos foliares.

Os teores de aminoácidos solúveis totais e nitrato são maiores nos tecidos radiculares do que nos tecidos foliares, enquanto que os teores de amônio não variam entre esses tecidos. Os teores de nitrogênio total são acumulados em maior proporção nas folhas quando comparados com as flores.

A espécie medicinal *Achillea millefolium* L. possui elevada adaptação à baixa intensidade luminosa, tanto nos estádios de desenvolvimento vegetativo quanto reprodutivo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDAR, M. P. M.; SCHMIDT, S.; MOSS, G.; STEWART, G. R.; JOLY, C. A. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 389-399, 2003.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina**. Buenos Aires: Isis, p. 725-729, 1998.

ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; LIMA JR, E. C.; MAGALHÃES, M. M. Effects of different light levels on the initial growth and photosynthesis of *Croton urucurana* Baill. in southeastern Brazil. **Revista Árvore**, v. 27, p. 53-57, 2003.

ANDRADE, F. M. C., CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário**. Viçosa, UFV/DFT, 1999, 139 p.

ANDREWS, M.; FARIA, S. M.; MCINROY, S. G.; SPRENT, J. Constitutive nitrate reductase activity in the leguminosae. **Phytochemistry**, v. 29, p. 49-54, 1990.

ATROCH, E. A. C. **Aspectos fisiológicos, anatômicos e biossíntese de flavonóides em plantas jovens de *Bauhinia forficata* LINK. submetidas a diferentes níveis de irradiância**. 1999. 62 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BAGGIO, C. H. **Mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do extrato aquoso das folhas de *Achillea millefolium* L.** 2004. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas (noções básicas)**. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1988. 41 p.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. Separation and estimation of aminoacids in crude plant extracts by thin-layer eletrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 17, p. 278-293, 1966.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **The complete german commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines**. Boston: Integrative Medicine Communications, p. 419-421, 2000.

BRADLEY, P. R. **British herbal compendium**. Bournemouth: British Herbal Medicine Association, v. 1, p. 190-191, 1992.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 3. ed. Maryland, USA: American Society of Plants Physiologists, 2001. 1367p.

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

CASTRO, E. M. **Alterações anatômicas, fisiológicas e fitoquímicas em *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento**. 2002. 221 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-81, 1975.

CHANDLER, R. F.; HOOPER, S. N.; HARVEY, M. J. Ethnobotany and phytochemistry of yarrow *Achillea millefolium* Compositae. **Economic Botany**, v. 36, n. 2, p. 203-223, 1982.

COOLEY, N. M.; HOLMES, M. G.; ATTRIDGE, T. H. Outdoor ultraviolet polychromatic action spectra for growth responses of *Bellis perennis* and *Cynosurus cristatus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**, v. 59, n. 1-3, p. 64-71, 2000.

CORRÊA JR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162 p.

CORRÊA JR, C.; SCHEFFER, M. C.; MING, L. C. **Cultivo agroecológico de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Brasília, DF: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2006. 76 p.

COSTA, L. C. B. **Trocas gasosas, atividade da redutase do nitrato, composição química e estrutura anatômica em plântulas de *Theobroma cacao* submetidas a diferentes irradiâncias e doses de nitrogênio**. 1996. 88 p. Dissertação (Mestrado em Biologia e Botânica) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.

CREN, M.; HIREL, B. Glutamine synthetase in higher plants: regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. **Plant Cell Physiology**, n. 40, p. 1187-1193, 1999.

CRONQUIST, A. J. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, p. 1021-1028, 1981.

CULLIMORE, J. V.; LARA, M.; LEA, P. J.; MIFLIN. Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of *Phaseolus* root nodules. **Planta**, v. 157, p. 245-253, 1983.

CUONG, B. N.; GÁCZ-BAITZ, E.; RADICS, L.; TAMÁS, J.; UJSZÁSZY, K.; VERZÁR-PETRI, G. Achillicin, the first proazulene from *Achillea millefolium*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 331-332, 1979.

DELLA LOGGIA, R. Anti-inflammatory principles from *Achillea asplenifolia* and *Achillea pratensis*. **Planta Medica**, v. 58, supp. 1, p. A641-A642, 1992.

DOSE, M. M.; HIRASAWA, M.; KLEIS-SANFRANCISCO, S.; LEW, E. L.; KNAFF, D. B. The ferredoxin-binding site of ferredoxin: nitrite oxidoreductase. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1047-1053, 1997.

ENGEL, V. L. **Influência do sombreamento sobre o crescimento de mudas de essências nativas, concentração de clorofila nas folhas e aspectos de anatomia**. 1989. 202 f. Dissertação (Mestrado) – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e no espectro de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

FALK, A. J.; SMOLENSKI, S. J.; BAUER, L.; BELL, C. L. Isolation and identification of three new flavones from *Achillea millefolium* L. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 11, p. 1838-1842, 1975.

FARIAS, V. C. C. Análise de crescimento de mudas de cedrorana (*Cedrelinga catenaeformis* Ducke) cultivadas em condições de viveiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 19, n. 2, p. 193-200, 1997.

FERGUSON, A. R.; SIMS, A. P. Inactivation in vivo of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase: Its role in the regulation of glutamine synthesis in yeasts. **Journal of General Microbiology**, v. 69, p. 423-427, 1971.

FERRAZ, K. K. F.; SILVA, D. M. Avaliação ecofisiológica do crescimento inicial de espécies florestais usadas na recuperação de áreas degradadas: II. *Calliandra calothyrsus* Meisn. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus. **Anais Ilhéus**: SBFV, 2001. CD-ROM.

FORDE, B. G.; CULLIMORE, J. V. The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. **Plant Molecular and Cell Biology**, v. 5, p. 246-296, 1989.

FUENTES, S. I.; ALLEN, D. J.; ORTIZ-LOPES, A.; HERNANDEZ, G. Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1071-1081, 2001.

GADGOLI, C.; MISHRA, S. H. Preliminary screening of *Achillea millefolium*, *Cichorium intybus* and *Capparis spinosa* for antihepatotoxic activity. **Fitoterapia**, v. 66, n. 4, p. 319-323, 1995.

GERENDAS, J.; ZHU, Z.; BENDIXEN, R.; RATCLIFFE, G.; SATTELMACHER, B. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. **Pflanzenernahr Bodenkd**, v. 160, p. 239-251, 1997.

GOMES, I. A. C. **Alterações morfofisiológicas em folhas de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) sob influência do sombreamento por leguminosas**. 2004. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GONÇALVES, G. C. **Cultivo em campo de *Coffea arabica* L. cv. Obatã a pleno sol x sombreamento parcial: avaliações bioquímicas, fisiológicas e nutricionais**. 2007. 114 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Bioquímica de Plantas) - Universidade de São Paulo, SP.

GONCALVES, J. F. C.; BARRETO, D. C. S.; SANTOS, U. M.; FERNANDES, A. V.; SAMPAIO, P. T. B.; BUCKERIDGE, M. S. Growth, photosynthesis and stress indicators in young rosewood plants (*Aniba rosaeodora* Ducke) under different light intensities. **Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 3, p. 325-334, 2005.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O.; PELZER, L. E. Antiinflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Il Farmaco**, v. 56, p. 683-687, 2001.

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

HE, J.; CHEE, C. W.; GOH, C. J. Photoinhibition of Heliconia under natural tropical conditions: the importance of leaf orientation for light interception and leaf temperature. **Plant, Cell and Environment**, v. 19, n. 4, p. 1238-1248, 1996.

HELDT, H. W. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. New York: Oxford University Press Inc. 1997. 522p.

HERTWIG, F. I. V. **Plantas aromáticas e medicinais**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 414 p.

HIPKIN, C. R.; ALCHARBI, A.; ROBERTSON, K. P. Studies on nitrate reductase in British angiosperm variation in nitrate reductase activity in natural populations. **New Phytologist**, v. 97, p. 641-651, 1984.

HOFMANN, L.; FRITZ, D.; NITZ, S.; KOLLMANNNSBERGER, H.; DRAWERT, F. Essential oil composition of three polyploids in the *Achillea millefolium* 'complex'. **Phytochemistry**, v. 31, n. 2, p. 537-542, 1992.

HOPKIS, W.G. **Introduction to Plant Physiology: plants and nitrogen**. New York: John Wiley Sons. 1999. 512p.

HOSHIDA, A.; TANAKA, Y.; HIBINO, T.; HAYASHI, Y.; TANAKA, A.; TAKABE, T.; TAKABE, T. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. **Plant Molecular Biology**, n. 43, p. 103-111, 2000.

HUSTED, S.; HEBBERN, C. A.; MATTSSON, M.; SCHJOERRING, J. K. A critical experimental evaluation of methods for determination of NH<sub>4</sub> in plant tissue, xylem sap and apoplastic fluid. **Physiologia Plantarum**, v. 109, p. 167-179, 2000.

JUNIOR, A. A. A.; LOPES, R. C.; ARMOND, C.; SILVA, F.; CASALI, V. W. D. **Folhas de chá: plantas medicinais na terapêutica humana**. Viçosa: UFV, 2005. 233 p.

KEDZIA, B.; KRZYZANIAK, M.; HOLDERNA, E. Effect of yarrow essential oil (*Ol. Millefolli*) and its components on pathogenic microorganisms. **Herba Polonica**, v. 36, n. 3, p. 117-125, 1990.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. 452p.

KHOURI, C. R. **Atividade da nitrato redutase, teores de nitrogênio e de carboidratos em cafeeiro influenciados pelo sombreamento e estágio fenológico**. 2007. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

KOKKALOU, E.; KOKKINI, S.; HANLIDOU, E. Volatile constituents of *Achillea millefolium* in relation to their intraspecific variation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, n. 7, p. 665-670, 1992.

KRAMER, T.; KOSLOWSKI, T. T. **Physiology of woody plants**. New York: Academic Press, 1979. 811 p.

KUBELKA, W.; KASTNER, U.; GLASL, S.; SAUKEL, J.; JURENITSCH, J. Chemotaxonomic relevance of sesquiterpenes within the *Achillea millefolium* group. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 437-444, 1999.

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

LEA, P. J.; MOROT-GAUDRY, J. F. **Plant Nitrogen**. New York: Springer Verlag, 2001. 407p.

LEMOS, G. B.; FILHO, N. D.; OLIVEIRA, L. E. M.; PURCINO, A. A. C. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1999.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S.; SILVA, M. G.; IBRAHIM, F. N.; SILVA, A. C. Transporte, acúmulo de compostos nitrogenados e atividade da redutase do nitrato em alface produzida em diferentes sistemas de cultivo. **Journal of Plant Physiology**, v. 19, Gramado, 2007.

LOPES, M. R. S. **Assimilação e transporte de nitrogênio em *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl**. 2008. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

LOPES, N. F.; OLIVIA, M. O.; CARDOSO, M. I.; GOMES, M. M. S.; SOUZA, V. F. Crescimento e conversão de energia solar em *Phaseolus vulgaris* submetido a três densidades de fluxo radiante e dois regimes hídricos. **Revista Ceres**, v. 33, n. 186, p. 114-142, 1986.

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

LOURENÇO, P. M. L.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; OLIVEIRA, M. M.; DEANS, S. G.; SCHEFFER, J. J. C. Essential oils from hairy root cultures and from plant roots of *Achillea millefolium*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 637-642, 1999.

MAGALHÃES, A. C. Influência of temperature on nitrate metabolism and leaf expansion in soybean (*Glycine max* L.) seedlings. **Plant Physiology**, v. 58, p. 12-16, 1976.

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 Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 86-96, 2005.

MARCHETTI, C. R. **Taxa de crescimento e metabolismo nitrogenado de *Memora peregrina* (Miers). Sandwith (Bignoniaceae) - espécie invasora de pastagens**. 2006. 79 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Editora UFV: Viçosa, 2005.451 p.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2nd ed. Academic Press, London, 1995.

MARTINS, E. R.; CASTRO, S. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**. Viçosa: UFV, 2000. 220 p.

MATTISON, N.; SCHJOERRINHG, J. K. Dynamic and steady-state responses of inorganic nitrogen pools and NH<sub>3</sub> exchange in leaves of *Lolium perenne* and *Bromus erectus* to changes in root nitrogen supply. **Plant Physiology**, v. 128, p. 742-750, 2002.

MCCULLOUGH, H. Determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin Chim. Acta*, v. 17, p. 297-304, 1967.

MEGURO, N. E.; MAGALHÃES, A. C. Atividade da redutase de nitrato em cultivares de café. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 17, p. 249-257, 1982.

MENDONÇA, E. H. M. **Fixação e reações de assimilação de nitrogênio em *Crotalaria juncea* L.** 2002. 86 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

MOCKUTE, D.; JUDZENTIENE, A. Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium* growing wild in Lithuania. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1033-1045, 2003.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**, p. 3-35, 2003.

MUROYA, K.; VARELA, V. P.; CAMPOS, M. A. A. Análise de crescimento de mudas de jacareúba (*Calophyllum angulare* A. C. Smith - Guttiferae) cultivadas em condições de viveiro. **Acta Amazônica**, v. 27, n. 3, p. 197-212, 1997.

MUSIL, C. F.; CHIMPHANGO, S. B. M.; DAKORA, F. D. Effects of elevated ultraviolet-B radiation on native and cultivated plants of southern Africa. **Annals of Botany**, v. 90, n. 1, p. 127-137, 2002.

NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E. Determination of the total nitrogen in plant material. **Journal Agronomic**, v. 65, p. 109-112, 1973.

NETO, J. F. A. **Atividades das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em cafeeiro arábica.** 2005. 74 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de concentração Fitotecnia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

NIEVOLA, C. C.; MERCIER, H. Variações diurnas da atividade *in vivo* da redutase do nitrato em abacaxizeiro (*Ananás comosus* (L.) Merr.– Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, p. 295-301, 2001.

OLIVEIRA, M. A. J.; BOVI, M. L. A.; MACHADO, E. C.; RODRIGUES, J. D. Atividade da redutase de nitrato em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 515-522, 2005.

OLIVEIRA, M. I. **Crescimento, características estruturais e teor de óleo essencial de *Artemisia vulgaris* L. submetidas a diferentes espectros luminosos.** 2006. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PABBY, A.; DUA, S.; AHLUWALIA, A. S. Changes in ammonia-assimilation enzymes in response to different nitrate levels in *Azolla pinnata* and *A-microphylla*. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 899-903, 2001.



PATE, J. S. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 1, n. 5, p.109-119, 1973.

PENNA, M. **Dicionário brasileiro de plantas medicinais**. 3. ed. São Paulo: Livraria Kosmos, 1946. 409 p.

PEREIRA-NETTO, A. B. *et al.* Nitrate reductase activity in field-grown *Pueraria lobata* (Kudzu) in southeastern Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, p. 1971-1975, 1998.

PEREIRA, S.; CARVALHO, H.; SUNKEL, C.; SALEMA, R. Immunocytolocalization of glutamine synthetase in mesophyll and phloem of leaves of *Solanum tuberosum* L. **Protoplasma**, v. 167, p. 66-73, 1992.

PEROZIN, M. M.; FRANCISCO, N. **Revisão bibliográfica das sinonímias populares das 16 plantas medicinais selecionadas para estudos pelo Projeto de Fitoterapia do SUDS/PR**. Curitiba: SESA/FCMR, 1990. 32 p.

RAVEN, J. A.; SMITH, F. A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. **New Phytologist**, v. 76, p. 415-431, 1976.

REGO, G. M.; POSSAMAI, E. Efeito do sombreamento sobre o teor de clorofila e crescimento inicial do Jequitibá-rosa. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Embrapa Florestas, n. 53, p.179-194, 2006.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. **Diversidade e domesticação de plantas medicinais**. In. SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS, 45-74 p, 2003.

RODRIGUES, V. E. G. **Etnobotânica e florística de plantas medicinais nativas de remanescentes de floresta estacional semidecidual na região do Alto do Rio Grande, MG**. 2007. 149 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4. ed. Belmont, USA: Wadsworth Publishing Company, 1991. 682 p.

SARTÓRIO, M. L.; TRINDADE, C.; RESENDE, P.; MACHADO, J. R. **Cultivo orgânico de plantas medicinais**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2000. 260 p.

SAS Institute Inc. **SAS**. Learning Edition, getting started with the SAS Learning Edition, Cary, North Carolina: 2002.

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

SESHLEY, K. A.; YAMAYA, T.; OAKS, A. Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. **Int Rev Cytol**, v. 134, p. 85-163, 1992.

SHAN, A. Y. K. V.; SOUZA, G. A.; MESQUITA, A. C.; BONOME, L. T. S.; MACHADO, A. K. F. M.; OLIVEIRA, L. E. M. Comportamento nutricional e metabólico de plantas jovens de seringueira cultivadas em diferentes fontes de nitrogênio. In: **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, Gramado, 2007.

SIMÕES C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Eds. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. Da UFSC, 1999. 821p.

SMIRNOFF, N.; STEWART, G. R. Nitrate assimilation and translocation y higher plants: Comparative physiology and ecological consequences. **Physiology Plantarum**, v. 64, p. 133-140, 1985.

SMIRNOFF, N. *et al.* The occurrence of nitrate reduction in the leaves of woody plants. **Annals of Botany**, v. 54, p. 363-374, 1984.

SODEK, L.; SILVA, D. M. Nitrate inhibits soybean nodulation and nodule activity when applied to root regions distant from the nodulation sites. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n. 8, p. 187-191. 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

THORNBER, J. P. Chlorophyll-proteins: light-harvesting and reaction center components of plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 26, p. 127-158, 1975.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 1005-1024, 2000.

TORRES, J. M.; CHÁVEZ, A. G. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. **Avance y Perspectiva**, v. 20, p. 377-387, 2001.

TOZYO, T.; YOSHIMURA, Y.; SAKURAI, K.; UCHIDA, N.; TAKEDA, Y.; NAKAI, H.; ISHII, H. Novel antitumor sesquiterpenoids in *Achillea millefolium*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 5, p. 1096-1100, 1994.

UFPR, Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica. **Bioquímica: aulas práticas**. 6 ed. Curitiba: Ed da UFPR, 2001. 178 p.

VERZÁR-PETRI, G.; CUCONG, B. N. On the quantitative determination of chamazulene and pro-chamazulenes in essential oils and crude drugs from yarrow (*Achillea* sp – Compositae). **Science Pharmacology**, v. 45, p. 25-39, 1977.

VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M. T. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen an carbon metabolites. **The Plant Journal**, v. 3, p. 313-324, 1993.

WHATLEY, F. H.; WHATLEY, F. R. **A luz e a vida das plantas**. São Paulo: EPU-EDUSP, v. 30, 1982. 101 p.

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

YEMM, E. M.; COCKING, E. C. Estimation of amino acids by ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

YODER, B. J.; PETTIGREW-CROSBY, B. E. Predicting nitrogen and chlorophyll content and concentrations from reflectance spectra (400-2500 nm) at leaf and canopy scales. **Remote Sensing of Environment**, v. 53, p. 199-211, 1995.

# **ANEXOS**

## **ANEXO I**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL  
DEPARTAMENTO DE SOLOS  
LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE SOLOS



Solicitante: Conjunto Agrotécnico “Visconde da Graça” – CAVG – UFPEL  
Município: Pelotas/RS  
Entrada: 29/05/2007  
Saída: 30/05/2007  
Registro: 474

1. Identificação da amostra: medicinal

2. Diagnóstico para calagem do solo

pH da água	Ca	Mg	Al	Saturação (%)	
				Al	Bases
6,6	11,6	2,0	0	0	92

3. Diagnóstico para recomendação de adubação NPK

% Mat. Org. m/v	% Argila m/v	Textura	P-Mehlich Mg/dm <sup>3</sup>	CTCph7 Cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	K Mg/dm <sup>3</sup>
2,6	10	4	> 50,2	15,4	249

4. Diagnóstico para relações molares

Relações		
Ca/Mg	Ca/K	Mg/K
5,8	18,2	3,1

Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup> Renata Ferreira Peixoto  
CREA nº 92748 – 8<sup>a</sup> Região  
Responsável Técnico

## **ANEXO II**

Tabela A. Análise de variância para as variáveis massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do caule (MSC), massa seca das flores (MSFL), massa seca das folhas (MSF), clorofila *a* (Clor<sub>a</sub>), clorofila *b* (Clor<sub>b</sub>), clorofila total (Clor<sub>tot</sub>), razão clorofila *a/b* (Clor *a/b*), carotenóides (C) e razão clorofila total/carotenóides (Clor<sub>tot</sub>/C) em *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento

Quadrados Médios											
Fontes de Variação <sup>a</sup>	G.L.	MSPA	MSC	MSFL	MSF	Clor <sub>a</sub>	Clor <sub>b</sub>	Clor <sub>tot</sub>	Clor <i>a/b</i>	C	Clor <sub>tot</sub> /C
NDS	1	66.966,04*	9.586,92*	3.942,10*	4.520,67*	0,81*	0,12*	1,58*	0,22	0,01*	0,07
CDN	2	2.284,72	997,04	28,62	91,62	0,03	0,0005	0,04	0,11	0,001	1,13*
NDS x CDN	2	556,64	340,03	12,99	382,06*	0,01	0,01	0,14	0,05	0,0002	0,09
C.V. (%)		12,98	25,17	24,14	17,60	16,35	26,57	27,82	11,69	17,77	8,90

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

(<sup>a</sup>) NDS = níveis de sombreamento; CDN = concentrações de nitrogênio.

Tabela B. Análise de variância para as variáveis massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do caule (MSC), massa seca das folhas (MSF), clorofila *a* (Clor<sub>a</sub>), clorofila *b* (Clor<sub>b</sub>), clorofila total (Clor<sub>tot</sub>), razão clorofila *a/b* (Clor *a/b*), carotenóides (C) e razão clorofila total/carotenóides (Clor<sub>tot</sub>/C) em *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento

Quadrados Médios											
Fontes de Variação <sup>a</sup>	G.L.	MSPA	MSC	MSF	Clor <sub>a</sub>	Clor <sub>b</sub>	Clor <sub>tot</sub>	Clor <i>a/b</i>	C	Clor <sub>tot</sub> /C	
NDS	1	42.699,19*	237,98*	34.504,77*	0,29*	0,09*	0,71*	0,35*	0,0001	8,14*	
CDN	2	1.523,68*	35,77	1.153,83	0,008	0,0005	0,007	0,07	0,002	0,87*	
NDS x CDN	2	99,89	70,40	340,80	0,003	0,0009	0,005	0,01	0,0004	0,16	
C.V. (%)		11,42	19,56	16,67	9,04	11,79	9,28	6,13	10,08	6,78	

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

(<sup>a</sup>) NDS = níveis de sombreamento; CDN = concentrações de nitrogênio.



Tabela C. Análise de variância para a variável atividade da enzima nitrato redutase em folhas (NRF) de *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, em diferentes horários do dia, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento

Fontes de Variação <sup>a</sup>	Quadrados Médios	
	G.L.	NRF
<b>NDS</b>	1	69,64*
<b>CDN</b>	2	4,99
<b>TEMPO</b>	4	8,44*
<b>NDS x CDN</b>	2	1,53
<b>NDS X TEMPO</b>	4	3,38
<b>CDN X TEMPO</b>	8	1,31
<b>NDS X CDN X TEMPO</b>	8	3,90
<b>C.V. (%)</b>		44,20

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

(<sup>a</sup>) NDS = níveis de sombreamento; CDN = concentrações de nitrogênio.

Tabela D. Análise de variância para as variáveis atividade da enzima nitrato redutase em raízes (NRR), teor de aminoácidos solúveis totais em folhas (ASTF), teor de aminoácidos solúveis totais em raízes (ASTR), teor de nitrato em folhas (NF), teor de nitrato em raízes (NR), teor de nitrogênio total de flores (NTFL) e teor de nitrogênio total em folhas (NTF) em *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento reprodutivo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento

Fontes de Variação <sup>a</sup>	G.L.	Quadrados Médios						
		NRR	ASTF	ASTR	NF	NR	NTFL	NTF
<b>NDS</b>	1	0,33	0,31	3,33	1,21	1.001,16*	0,16*	0,09
<b>CDN</b>	2	0,43	0,34	45,52*	23,51*	35,74*	0,007	0,14
<b>NDS x CDN</b>	2	0,51	0,34	8,43	17,10*	36,70*	0,03*	0,06
<b>C.V. (%)</b>		26,80	19,24	13,91	5,52	4,85	6,50	10,45

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

(<sup>a</sup>) NDS = níveis de sombreamento; CDN = concentrações de nitrogênio.

Tabela E. Análise de variância para as variáveis atividade da enzima nitrato redutase em folhas (NRF), atividade da enzima nitrato redutase em raízes (NRR), atividade da enzima glutamina sintetase em folhas (GSF), atividade da enzima glutamina sintetase em raízes (GSR), teor de aminoácidos solúveis totais em folhas (ASTF), teor de aminoácidos solúveis totais em raízes (ASTR), teor de nitrato em folhas (NF), teor de nitrato em raízes (NR), teor de amônio em folhas (AF), teor de amônio em raízes (AR) e teor de nitrogênio total em folhas (NTF) em *Achillea millefolium* L. no estágio de desenvolvimento vegetativo, cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio e submetida a níveis de sombreamento

Quadrados Médios												
Fontes de	G.L.	NRF	NRR	GSF	GSR	ASTF	ASTR	NF	NR	AF	AR	NTF
Variação <sup>a</sup>												
<b>NDS</b>	1	0,64	0,15	142,75*	5,33*	0,06	534,42*	34,19*	56,28*	0,02*	0,12*	0,03
<b>CDN</b>	2	1,69	2,36*	29,35*	0,27	0,18	84,39*	3,75	7,85	0,007*	0,001	0,001
<b>NDS x CDN</b>	2	0,12	0,71	2,47	0,68	0,65	25,85*	1,10	4,33	0,01*	0,003*	0,05
<b>C.V. (%)</b>		37,86	22,90	15,13	21,88	11,79	15,99	60,06	26,86	9,60	14,20	13,71

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

(<sup>a</sup>) NDS = níveis de sombreamento; CDN = concentrações de nitrogênio.