

RAFAELLEN CAROLINE STORCK

Sombreamento, ácido giberélico e extrato de alga no desenvolvimento e produção de óleos essenciais em Patchouli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Deschamps

CURITIBA

2008

Dedico

*Aos meus
pais*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente pelas bênçãos recebidas e por todas as pessoas especiais que o Senhor tem colocado em meu caminho.

Qualquer frase escrita aqui seria pouco para agradecer aqueles que sempre me proporcionaram tudo, no mais amplo sentido da palavra, meus pais, Bruno e Ragnit, pelas oportunidades que me proporcionaram para que eu pudesse estar hoje aqui, pelo amor, carinho e dedicação.

As minhas amadas irmãs Susan e Bruna pelos momentos compartilhados, ao meu namorado Elton que sempre me ajudou e incentivou a realizar todos meus objetivos.

Ao meu orientador professor Dr. Cícero Deschamps pela sua orientação, seus ensinamentos e sua dedicação.

Aos colegas de laboratório Rodrigo Monteiro, Andressa G. Costa, Isabel Cristina Dabague e Magda Mazzetto pela ajuda nos experimentos e pelas experiências compartilhadas.

A todos os professores em especial as professoras Katia Zuffellato-Ribas, Nilce e Márcia (Departamento de Farmácia – UFPR).

Ao professor Atila pela ajuda nos experimentos.

Aos técnicos do Laboratório de Fitotecnia, Maria Emilia e Sr. Rainierio, pela ajuda nos experimentos conduzidos em casa de vegetação.

Aos responsáveis pelo LACAUT (Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos) professores Agnes de Paula Scheer e Carlos Yamamoto, pela realização das análises de óleo essencial.

A Universidade Federal do Paraná pelo crescimento profissional, a Capes pela bolsa concedida e a Empresa Herbia Óleos Essenciais Ltda, pelos recursos financeiros empregados neste trabalho.

Aos amigos e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	12
2. CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA.....	16
2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS	16
2.2.1 Estruturas de armazenamento e biossíntese de óleos essenciais em <i>Pogostemon cablin</i>	18
2.2.2 Fatores que afetam a biossíntese de óleos essenciais.....	21
3. CAPITULO II – DESENVOLVIMENTO DE <i>Pogostemon cablin</i> Benth., RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL SOB DIFERENTES NÍVEIS DE SOMBREAMENTO E GA ₃	27
3.1 INTRODUÇÃO	29
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.2.1 Material Vegetal	30
3.2.2 Preparo das mudas.....	30
3.2.3 Caracterização química.....	33
3.2.4 Análise estatística	33
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.3.1 Desenvolvimento vegetativo	34
3.3.3 Composição do óleo essencial.....	39
3.4 CONCLUSÕES.....	42
4. CAPÍTULO III – ASPECTOS ANATÔMICOS E BIOQUÍMICOS EM <i>Pogostemon cablin</i> Benth. SOB DIFERENTES NÍVEIS DE SOMBREAMENTO E APLICAÇÃO DE GA ₃	46

4.1 INTRODUÇÃO	48
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.2.1 Análise anatômica	50
4.2.2 Análises bioquímicas.....	51
4.2.2.1 Extração e dosagem de proteínas solúveis totais	51
4.2.2.2 Determinação de aminoácidos totais	52
4.2.2.3 Extração e dosagem de açúcares solúveis totais.....	52
4.2.2.4 Extração e dosagem de açúcares redutores.....	53
4.2.2.5 Determinação de clorofilas e carotenóides	53
4.2.3 Análise estatística	54
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.3.1 Análise anatômica	54
4.3.2 Análises Bioquímicas	56
4.3.2.1 Teores de proteínas solúveis totais.....	56
4.3.2.2 Teores de aminoácidos totais	57
4.3.2.3 Teores de açúcares solúveis totais	58
4.3.2.4 Teores de açúcares redutores	59
4.3.2.5 Teores de pigmentos.....	59
4.4 CONCLUSÕES	63
5. CAPITULO IV - DESENVOLVIMENTO DE <i>Pogostemon cablin</i> Benth., RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL APÓS A APLICAÇÃO DE GA ₃ E EXTRATO DE ALGA MARINHA COMO FONTE DE CITOCININAS.....	69
5.1 INTRODUÇÃO.....	71
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	73
5.2.1 Material Vegetal	73
5.2.2 Preparo das mudas.....	73
5.2.3 Caracterização química.....	74
5.2.4 Análise estatística	75
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.3.1 Desenvolvimento vegetativo	75
5.4 CONCLUSÕES.....	81
6. CAPÍTULO V - CONSIDERAÇÕES FINAIS	85

ANEXOS	87
--------------	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características químicas do solo utilizado no experimento. Curitiba-PR, 2007.	31
TABELA 2- Níveis de radiação ($\mu \text{ mol. s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) e sombreamento (%) em condições de casa de vegetação, em dias ensolarados e nublados. Curitiba-PR, 2007.	32
TABELA 3 - Altura (cm), número de folhas e ramos de <i>Pogostemon cablin</i> em diferentes níveis de sombreamento e $200 \text{ mg.L}^{-1} \text{GA}_3$. Curitiba-PR, 2007.	35
TABELA 4 - Altura (cm), número de folhas e ramos de <i>Pogostemon cablin</i> em diferentes níveis de sombreamento, com e sem aplicação de $200 \text{ mg.L}^{-1} \text{GA}_3$. Curitiba-PR, 2007.	36
TABELA 5- Massa seca (g) de folhas e ramos de <i>Pogostemon cablin</i> aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de $200 \text{ mg.L}^{-1} \text{GA}_3$. Curitiba-PR, 2007.	37
TABELA 6 - Área foliar (cm^2) de plantas de <i>Pogostemon cablin</i> aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de $200 \text{ mg.L}^{-1} \text{GA}_3$. Curitiba-PR, 2007.	38
TABELA 7- Rendimento do óleo essencial ($\mu\text{L.g}^{-1}$ de massa seca foliar) de <i>Pogostemon cablin</i> aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de $200 \text{ mg.L}^{-1} \text{GA}_3$. Curitiba-PR, 2007.	39
TABELA 8- Produtividade (L.ha^{-1}) de óleos essenciais de <i>Pogostemon cablin</i> aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de $200 \text{ mg.L}^{-1} \text{GA}_3$. Curitiba-Pr, 2007.	39
TABELA 9 – Constituintes do óleo essencial de <i>Pogostemon cablin</i> aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento e $200 \text{ mg.L}^{-1} \text{GA}_3$. Curitiba-PR, 2007.	41
TABELA 10 – Concentração de proteínas solúveis totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca), em tecidos foliares de <i>Pogostemon cablin</i> aos 120 dias sob diferentes níveis de sombreamento e aplicação de $200 \text{ mg.L}^{-1} \text{GA}_3$. Curitiba-PR, 2007.	57
TABELA 11 - Concentração de aminoácidos ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ massa fresca) em <i>Pogostemon cablin</i> aos 120 dias, em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de $200 \text{ mg.L}^{-1} \text{GA}_3$. Curitiba-PR, 2007.	58

TABELA 12 - Concentração de açúcares solúveis totais ($\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em <i>Pogostemon cablin</i> , aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento, com e sem aplicação de $200 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$ GA ₃ . Curitiba-PR, 2007.....	58
TABELA 13 - Concentração de açúcares redutores ($\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em <i>Pogostemon cablin</i> , aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de $200 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$ GA ₃ . Curitiba-PR, 2007.	59
TABELA 14 - Concentração de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e clorofila total ($\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em <i>Pogostemon cablin</i> aos 120 dias, em diferentes níveis de sombreamento. Curitiba-PR, 2007.....	60
TABELA 15 - Concentração clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em <i>Pogostemon cablin</i> aos 120 dias, com e sem aplicação de $200 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$ GA ₃ . Curitiba-PR, 2007.	60
TABELA 16 - Concentração carotenóides ($\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em <i>Pogostemon cablin</i> aos 120 dias, em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de $200 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$ GA ₃ . Curitiba-PR, 2007.....	61
TABELA 17 - Relação clorofila <i>b</i> / clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g}.\text{mg}$ massa fresca) em <i>Pogostemon cablin</i> aos 120 dias e aplicação de $200 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$ GA ₃ . Curitiba-PR, 2007.....	62
TABELA 18 - Características do solo utilizado no experimento. Curitiba-PR, 2007..	74
TABELA 19- Altura (cm) de <i>Pogostemon cablin</i> aos 75 dias após aplicação de $200 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$ GA ₃ . Curitiba-PR, 2007.....	76
TABELA 20 - Altura (cm), número de ramos, número de folhas e área foliar (cm ²) de <i>Pogostemon cablin</i> aos 75 dias após aplicação de extrato de alga marinha e $200 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$ GA ₃ . Curitiba-PR, 2007.	77
TABELA 21 – Massa seca de folhas e de ramos de <i>Pogostemon cablin</i> aos 75 dias após aplicação de extrato de alga marinha e $200 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$ GA ₃ . Curitiba-PR, 2007.	77
TABELA 22 - Rendimento do óleo essencial ($\mu\text{L}.\text{g}^{-1}$ de massa seca foliar) de <i>Pogostemon cablin</i> aos 75 dias após aplicação de extrato de alga marinha e $200 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$ GA ₃ . Curitiba-PR, 2007.	78
TABELA 23 - Produtividade (L.ha ⁻¹) de óleos essenciais em <i>Pogostemon cablin</i> aos 75 dias após aplicação de extrato de alga marinha e $200 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$ GA ₃ . Curitiba-Pr, 2007.....	79
TABELA 24- Composição do óleo essencial de <i>Pogostemon cablin</i> após 75 dias de cultivo, com aplicação de GA ₃ e extrato de alga marinha e $200 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$ GA ₃	80

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- Biossíntese dos compostos do óleo essencial de *Pogostemon cablin* a partir do farnesil difosfato (DEGUERRY, et al. 2006, adaptada de Croteau et al., 1987).....20
- FIGURA 2- Períodos de avaliação e aplicação de regulador vegetal em plantas de patchouli.....32
- FIGURA 3- Tricoma não glandular (tector) multicelular (TT) e tricoma glandular peltado (TGP), aumento de 40X, em folhas de *Pogostemon cablin*.....55
- FIGURA 4 - Corte transversal de tecidos foliares de *Pogostemon cablin* desenvolvidas em ambiente não sombreado (A), aumento de 10X e (B) de 40X, no detalhe parênquima paliçádico (PP) e parênquima lacunoso (PL).....56
- FIGURA 5 - Corte transversal de tecidos foliares de *Pogostemon cablin* submetidos a 54% de sombreamento (A), aumento de 10X e (B) de 40X, no detalhe parênquima paliçádico (PP) e parênquima lacunoso (PL).....56

RESUMO

Pogostemon cablin Benth., popularmente conhecido como patchouli, possui óleo essencial no tecido foliar com atividades farmacológicas, sendo suas propriedades terapêuticas relacionadas à composição deste. A nível mundial, o óleo essencial de *P. cablin* é utilizado amplamente pela indústria de perfumes. Os fatores que influenciam a concentração de constituintes químicos do óleo essencial de plantas aromáticas devem ser avaliados, visando obter uma matéria-prima de melhor qualidade. As giberelinas são freqüentemente associadas à promoção do crescimento caulinar e o nível de radiação ao qual as plantas são expostas pode afetar as características morfológicas e fisiológicas das folhas interferindo diretamente em seu desenvolvimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do sombreamento e da aplicação de GA₃ e extrato de alga marinha, sobre o desenvolvimento vegetativo, rendimento de óleos essenciais e metabolismo em plantas de *P. cablin*. O presente trabalho foi realizado a partir de dois experimentos em delineamento experimental inteiramente casualizado comparando o efeito de níveis de sombreamento (0, 54, 77%) e GA₃ (200 mg.L⁻¹) (experimento 1), e comparando GA₃(200 mg.L⁻¹) e extrato de alga marinha (15 e 30 mg.L⁻¹) (experimento 2). A aplicação dos reguladores foi realizada aos 30 dias após o plantio. Os resultados obtidos demonstraram que plantas em condições de 77% de sombreamento e tratadas com GA₃ aos 120 dias apresentaram altura significativamente superior. De forma contrária, as médias de números de folhas foram superiores após 75 dias da aplicação de GA₃ em plantas desenvolvidas em condições não sombreadas. O número de ramos foi também significativamente superior nestas condições de sombreamento, porém, sem aplicação de GA₃. A aplicação do regulador vegetal aos 75 dias promoveu maior número de ramos com 54% de sombreamento. Houve interação significativa entre os fatores para concentração de proteínas, aminoácidos, carotenóides e para o rendimento de óleo essencial. A aplicação de GA₃ resultou em maior produtividade do óleo essencial em 54% de sombreamento. Entretanto, não houve diferença significativa para os níveis de sombreamento nos tratamentos que não receberam a aplicação do regulador vegetal. Quando houve aplicação de GA₃ os teores de proteínas foram superiores em condições de sombreamento (54 e 77%), sendo que na ausência do regulador, maiores médias foram observadas em condições não sombreadas. Maiores teores de aminoácidos foram observados em plantas tratadas com GA₃ e desenvolvidas sem sombreamento. De forma contrária, maiores concentrações de clorofilas foram observadas em plantas sombreadas. Plantas tratadas com GA₃ apresentaram maiores teores de açúcares solúveis totais também quando submetidas a sombreamento. A aplicação de extrato de alga marinha em 15 mg.L⁻¹ também resultou em maior rendimento e produtividade do óleo essencial, entretanto, quando o extrato de alga marinha foi combinado a 200 mg.L⁻¹ de GA₃ houve decréscimo da produtividade do óleo essencial.

Palavras-chave: *Pogostemon cablin*, níveis de sombreamento, reguladores vegetais.

ABSTRACT

Pogostemon cablin, commonly known as patchouli, has essential oil in leaves with pharmacological activities, and its therapeutical properties are related with it. Around the world, the essential oil of *P. cablin* is widely used by the perfume industry. The factors that influence the chemical constituent concentrations of essential oils must be analyzed, to improve the quality raw material. The gibberellins are often associated to the promotion of stem growth, and the radiation level to which plants are exposed can affect the leaves at morphological and physiological levels, interfering directly in their development. The purpose of this work was to evaluate the influence of shading levels, GA₃ and seaweed extract applied during the vegetative development on essential oil yield and composition as well as on *P. cablin* metabolism. The experimental design was completely randomized comparing the shading levels (0, 54 and 77%) and GA₃ (200 mg.L⁻¹) (experiment 1) and comparing GA₃ (200 mg.L⁻¹) and seaweed extract (15 and 30 mg.L⁻¹). The plant growth regulators were applied at 30 days after planting. The results showed that plants under 77% of shading conditions and treated with GA₃, on the 120th day, presented significantly superior height. Otherwise, the leaf number means were superior 75 days after GA₃ had been applied in plants under no shading conditions. The number of branches was significantly superior also under no shading and no GA₃. After 75 days of applying the plant growth regulator, a larger number of branches under 54% of shading was observed. A significant interaction between the factors was observed for protein, aminoacid and carotenoid concentrations and for essential oil yield. The GA₃ also result in great essential oil productivity under 54% of shading. However, no significant difference for the shading levels in those treatments without growth regulators administration was found. When GA₃ was used, the protein yields were superior under 77 and 54% of shading conditions, while with no growth regulator, higher levels were observed in no shading conditions. Greater yields of aminoacids were observed in plants treated with GA₃ and developed without shading. Otherwise higher concentrations of chlorophylls were observed in plants under shading conditions. Plants treated with GA₃ showed greater levels of total soluble sugars also when subjected to shading level. The use of seaweed extract in 15 mg.L⁻¹ also resulted a larger productivity and essential oils yield in *P. cablin*, however, when the seaweed extract was combined at 200 mg.L⁻¹ of GA₃ was decrease in productivity of the essential oil.

Key-words: *Pogostemon cablin*, essential oil, plant growth regulators, shading.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais também conhecidos como óleos voláteis ou etéreos, são provenientes do metabolismo secundário de plantas aromáticas (SILVA e CASALI, 2000) e conferem a estas, grande importância econômica. No que diz respeito ao óleo essencial do patchouli sua importância econômica está relacionada principalmente a sua capacidade de fixação à pele e a sua fragrância amadeirada (SUGIMURA et al., 2005), sendo amplamente utilizado pelas indústrias de perfumarias (HSU et al., 2006).

Os componentes dos óleos essenciais pertencem a duas classes quimicamente distintas, terpenóides e fenilpropanóides. Estes são sintetizados a partir de diferentes precursores metabólicos primários e são produzidos a partir de rotas biossintéticas diferentes. Os óleos essenciais são sintetizados, armazenados e liberados por meio de estruturas do mesofilo ou da epiderme (SANGWAN et al., 2001).

A partir da década 1980, o Brasil impulsionou suas pesquisas em relação a plantas aromáticas (PIMENTEL et al., 2006), conseqüentemente tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais por meio de avaliação do potencial terapêutico de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, entre outros (CECHINEL e YUNES, 1998).

A biossíntese de óleos essenciais em plantas aromáticas está condicionada a fatores ambientais e fisiológicos que interagem entre si e podem levar à produção de diferentes metabólitos secundários (CASTRO, 2004). Deste modo, fatores como temperatura, radiação (FAROOQI et al., 1999), fotoperíodo, ontogenia da planta e a aplicação de reguladores vegetais podem alterar a produção de óleos essenciais em plantas aromáticas (SHUKLA e FAROOQI, 1990; SANGWAN ET AL., 2001).

Devido à importância econômica do óleo essencial produzido pelo patchouli, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da radiação e da aplicação de GA₃ e extrato de alga marinha como fonte citocinina sobre o desenvolvimento

vegetativo, rendimento de óleos essenciais, metabolismo e alterações anatômicas em plantas de *Pogostemon cablin*.

Para atingir-se este objetivo foram realizados dois experimentos em casa-de-vegetação, cujos resultados são apresentados em capítulos para melhor compreensão.

No capítulo I é apresentada a revisão da literatura com a descrição botânica da espécie e aspectos da biossíntese de óleos essenciais.

O capítulo II teve como objetivo avaliar o efeito aplicação da giberelina GA₃ na concentração de 200 mg.L⁻¹ e do sombreamento em 54 e 77% sobre o desenvolvimento vegetativo das plantas e rendimento do óleo essencial, de forma semelhante no capítulo III são descritos os aspectos bioquímicos e as alterações anatômicas das plantas submetidas a estes tratamentos. No capítulo IV são apresentados os resultados da aplicação de GA₃ 200 mg.L⁻¹ e extrato de alga marinha *Ascophyllun nodosum* (EAM) 15 e 30 mg.L⁻¹ com sombreamento de 54 %, e finalmente, no capítulo V são apresentadas as considerações finais deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. CASTRO, H. G.; FERREIRA, A. F.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**, 2 ed. Viçosa: Gráfica Suprema e Editora, 2004. p. 48-66.
2. CECHINEL FILHO. V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais; conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p. 99-103, 1998.
3. FAROOQI, A. H. A; SANGWAN, N. S.; SANGWAN, R. S. Effect of differnt photoperiodic regimes on growth, flowering and essential oil in *Mentha* species. **Plant Growth Regulation**, v.29, p 181-187, 1999.
4. HSU, H. C.; YANG, W. C.; TSAI, W. J.; CHEN, C.C.; HUANG, H. Y.; TSAI, Y. C. a-Bulnesene, a novel PAF receptor antagonist isolated from *Pogostemon cablin*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p.1033–1038, 2006.
5. PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; *et al.* A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, v. 29, n. 2 , p. 373-375, 2006.
6. SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SFIABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.

7. SHUKLA, A.; FAROOQI, A. H. A. E. review article: Utilization of plant growth regulators in aromatic plants production. **Current Research Medicinal & Aromatic Plants**, v.12, n.3, p.152- 157, 1990.
8. SILVA, F. da; CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: Pós-colheita e óleos essenciais**. Viçosa, UFV/DFT, 2000. 135 p.
9. SUGIMURA, Y.; KADOTANI, N.; UEDA, Y.; SHIMA, K.; KITAJIMA, S.; FURUSAWA, O.; IKEGAMI, M. Transgenic patchouli plants produced by Agrobacterium-mediated Transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p.251–257, 2005.

2. CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA

A família Lamiaceae compreende cerca de 300 gêneros, entre eles *Pogostemon*, com aproximadamente 7.500 espécies distribuídas em todo o mundo. No Brasil ocorrem cerca de 26 gêneros e aproximadamente 350 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005). São plantas freqüentemente, herbáceas ou arbustivas, com folhas opostas cruzadas, inteiras e com cheiro intenso. Flores pequenas ou grandes, em geral vistosas, reunidas em densas inflorescências quase sempre axilares (JOLY, 1996).

Pogostemon cablin Benth, popularmente conhecido como patchouli, é originário das Filipinas podendo ser encontrado também na Malásia, Índia, Singapura (JOY et al., 1998) e em algumas regiões da China. (HU et al., 2005). Possui hábito perene, sua altura pode variar entre 0,6 a 1,0 m de comprimento, possui filotaxia oposta e folhas ovaladas. Em geral se desenvolve bem em ambientes semi-sombreados e em temperaturas entre 24 e 28°C, possui exigência por solos corrigidos e bem supridos de nutrientes (EPAGRI, 2004).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Muitos vegetais apresentam misturas de monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, chamados óleos essenciais, os quais conferem aroma característico as suas folhas (TAIZ e ZEIGER, 2004). Diversas espécies vegetais são capazes de armazenar estes óleos essenciais em células especializadas (RIZZINI e MORS, 1995), os quais são provenientes do metabolismo secundário e conferem às plantas grande importância econômica, principalmente no que diz respeito à indústria alimentícia e farmacêutica (PIMENTEL et al., 2006).

A presença de óleos essenciais determina a utilização de diversas espécies da família Lamiaceae para fins medicinais, na qual estão incluídas muitas ervas aromáticas cultivadas no Brasil (SOUZA e LORENZI, 2005).

Os óleos voláteis são constituídos predominantemente por terpenos, entretanto, muitos destes óleos podem ser constituídos, também, por fenilpropenos que quando presentes agregam sabor e odor ao óleo essencial. Grande parte destes compostos apresentam uma composição extremamente complexa relacionada a uma grande variedade e funcionalidade química das diversas classes de compostos tais como, monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, entre outros (SANGWAN et al., 2001). A volatilidade de alguns terpenos faz com que estes compostos sejam facilmente perceptíveis nos aromas das plantas e prontamente obtidos por destilação de órgãos vegetais. (CASTRO et al., 2004 a).

O óleo essencial produzido por *Pogostemon cablin* contribui em muitas atividades farmacológicas, sendo suas propriedades terapêuticas diretamente relacionadas à qualidade e a quantidade deste (HU et al., 2005). Os óleos voláteis do patchouli também são amplamente utilizados pelas indústrias de cosméticos, higiene oral e de perfumarias (ZHAO et al., 2005), devido sua fragrância amadeirada e sua capacidade de fixação à pele (SUGIMURA et al., 2005). Além destas propriedades, pesquisas recentes demonstraram atividade antifúngica, anti-helmintica e anti-tripanosossoma (ZHAO et al., 2005). No Brasil *Pogostemon cablin* é utilizado amplamente pela indústria de perfumes (HSU et al., 2006).

O particionamento do carbono fixado fotossinteticamente é um importante mecanismo fisiológico para a produção de óleos essenciais.

Os terpenos são biossintetizados a partir de metabólitos primários por meio de duas rotas metabólicas distintas, na rota do ácido mevalônico, três moléculas de acetil - CoA são ligadas formando o ácido mevalônico, um importante intermediário utilizado na geração do isopentenil difosfato (IPP) sendo o IPP, a unidade ativa básica na formação de terpenos. Entretanto, o IPP também pode ser formado a partir de intermediários da glicólise ou do ciclo de redução fotossintética do carbono através da rota do metileritriol fosfato (MEP) (SANGWAN et al., 2001).

Vários trabalhos têm demonstrado a presença de alguns sesquiterpenos na composição dos óleos voláteis de *Pogostemon*, os quais apresentam várias atividades biológicas (HSU et al., 2006), entre outros componentes, tais como o patchoulol, patchouleno, bulneseno, guaieno, cariofileno (SUGIMURA et al., 2005).

Muitas atividades biológicas dos terpenóides estão relacionadas com a dos óleos essenciais, desta forma tem sido empregados por suas propriedades farmacológicas, sendo utilizados como antimicrobianos, antiinflamatórios e analgésicos (CASTRO et al., 2004 b). Por outro lado, alguns terpenos possuem função bem caracterizada no desenvolvimento vegetal, podendo ser algumas vezes caracterizados como metabólitos primários, como por exemplo, as giberelinas formadas por diterpenos e os carotenóides formados por tetraterpenos (CROTEAU, 2000).

2.2.1 Estruturas de armazenamento e biossíntese de óleos essenciais em *Pogostemon cablin*

Os óleos voláteis de plantas aromáticas são sintetizados, armazenados e liberados para o ambiente por meio de estruturas presentes na epiderme ou no mesofilo, as quais possuem características relacionadas a grupos taxionômicos. Estas estruturas podem estar presentes nas folhas, raízes, caules, flores e frutos, e incluem células, glândulas secretoras ou tricomas (SANGWAN et al., 2001).

Estudos anatômicos demonstram a presença de glândulas e reservatórios no espaço subcuticular foliar em Lamiaceae (GERSHENZON et al., 2000) podendo haver também tricomas glandulares e peltados, onde a presença destes pode variar entre as espécies da família (GERSBACH, 2001). Em *Pogostemon cablin* estão presentes dois tipos de tricomas, tectores, em maior quantidade, e tricomas glandulares presentes em menor quantidade. A concentração de tricomas nas folhas pode aumentar em até 10 vezes quando comparado a ramos e pecíolos, podendo haver também células internas especializadas em acumular óleo (HENDERSON et al., 1970).

Segundo Deguerry et al. (2006), os componentes do óleo essencial do patchouli são formados a partir do farnesil-difosfato que sofre alterações estruturais dando origem a dois intermediários humulil cátion e E,E – germacradienil cátion (Figura 1), este último é o responsável pela síntese do pogostol e do patchoulol, compostos majoritários no óleo essencial desta espécie. Sendo o sesquiterpeno patchoulol o responsável pela nota do óleo essencial.

Tanto a síntese do patchoulol quanto do pogostol ocorrem em presença de água, entretanto, na ausência de água os mesmos intermediários que dão origem a esses compostos originam o seicheleno e o alfa guaieno, alfa buleseno e guaia-4,11-dieno respectivamente. Nestas reações, ocorre desprotonização e a molécula de água não é utilizada como substrato, sabendo-se que a síntese destes não é dependente da quebra de uma molécula de água, sugere-se que a concentração destes constituintes no óleo essencial é diretamente dependente do balanço dos constituintes patchoulol e pogostol, tendo em vista a presença de precursores comuns. A biossíntese de patchoulol e seicheleno possui como precursor comum o intermediário número 7 da rota metabólica. Entretanto, na síntese de pogostol, alfa guaieno e alfa buleseno o precursor comum é o guaianil cátion.

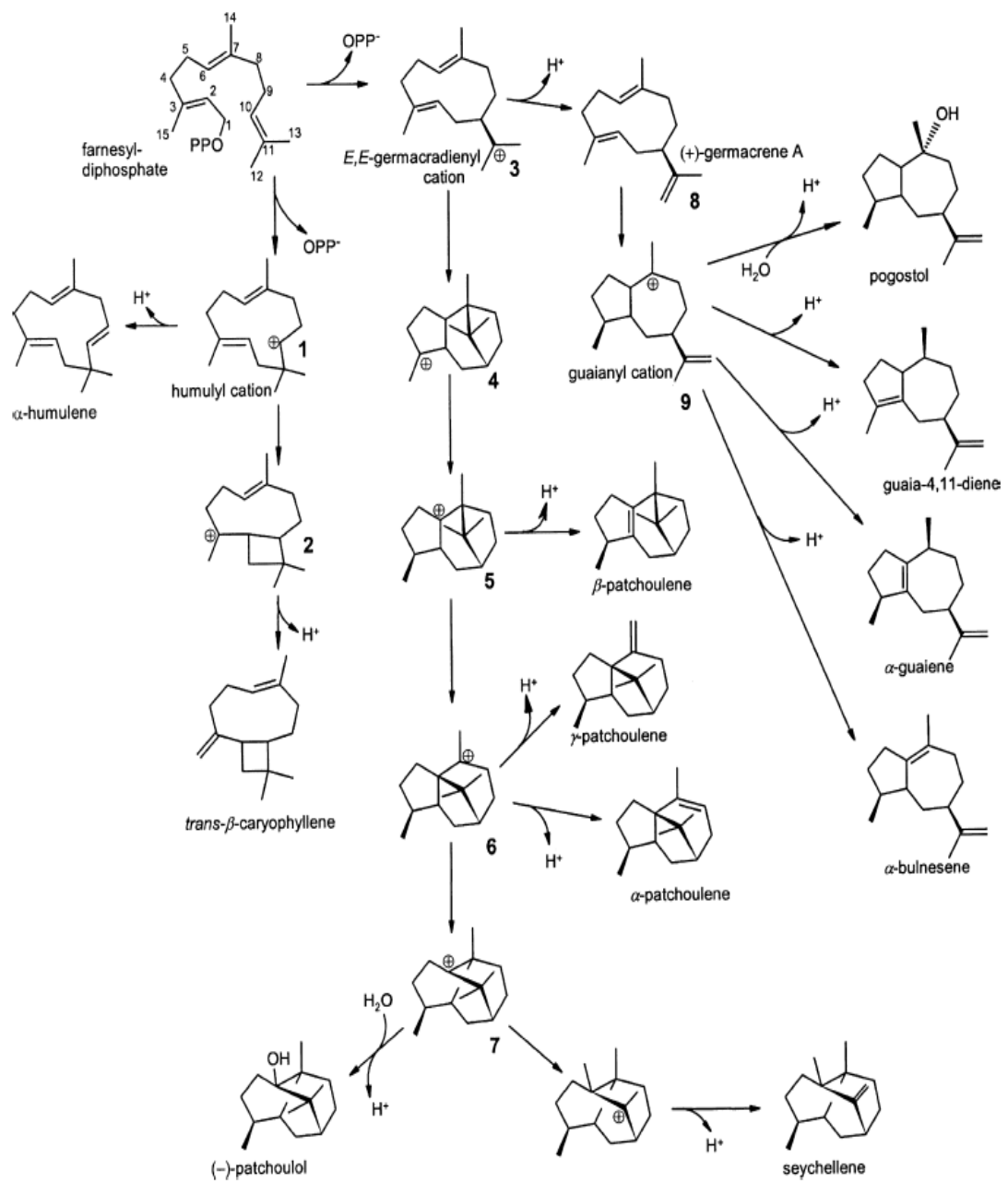


FIGURA 1- Biossíntese dos compostos do óleo essencial de *Pogostemon cablin* a partir do farnesil difosfato (DEGUERRY, et al. 2006, adaptada de Croteau et al., 1987).

2.2.2 Fatores que afetam a biossíntese de óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos provenientes do metabolismo secundário vegetal, estes não têm ação diretamente relacionada aos processos de desenvolvimento e crescimento vegetal. Porém, fatores ambientais incluindo estímulos bióticos e abióticos podem regular a biossíntese de compostos secundários em plantas (ZHI-LIN et al., 2007). Deste modo, a biossíntese de óleos essenciais não está condicionada somente ao estado metabólico da planta, fatores como crescimento vegetativo, idade foliar, temperatura, intensidade e duração da radiação solar podem alterar a produção de óleos essenciais (FAROOQI et al., 1999).

Um dos principais fatores que afetam a produção de óleos essenciais é o estágio de desenvolvimento do vegetal, das células e dos tecidos. A relação entre o nível de ontogenia e o acúmulo de óleos essenciais pode ser observada em diversas espécies aromáticas, onde o maior rendimento destes pode ser verificado no início do desenvolvimento vegetal (SANGWAN et al., 2001). A ontogenia pode também afetar a composição de óleos voláteis (DURYAPAN et al., 1986).

A radiação é um importante fator que pode interferir na produção e na qualidade dos óleos essenciais através da fotossíntese, da modulação do fotoperíodo e da qualidade da luz (SANGWAN et al., 2001).

Pode-se verificar em *Mentha*, que plantas submetidas a tratamentos de dias curtos apresentaram menor biomassa, porém, acumularam maiores concentrações de óleos essenciais. Entretanto, plantas de dias longos e normais apresentaram diferentes biomassas, e concentrações de óleos essenciais semelhantes (FARROQI et al., 1999).

Conforme observado em *Pogostemon cablin* cultivado em consórcio com *Carica papaya*, o nível de sombreamento das plantas também interfere no rendimento de óleos essenciais, onde o rendimento destes foi maior cultivado em consórcio quando comparado aos teores das plantas cultivadas em monocultura (MUNI-RAN et al., 1999).

Segundo Shukla e Farooqi (1990), a aplicação exógena de reguladores vegetais pode alterar o metabolismo secundário aumentando ou diminuindo o teor do óleo essencial e seus constituintes.

Sangwan et al. (2001) sugere que estes afetam favoravelmente a produção de óleos essenciais em Lamiaceae, conforme observado no gênero *Mentha* a aplicação de reguladores de vegetais tais como citocininas promoveram maiores concentrações de óleos essenciais em *M. arvensis* e *M. spicata*, de forma semelhante à aplicação da giberilina GA₃ aumentou o rendimento de óleos essenciais em *M. citrata*. Entretanto, Bosabalidis e Exarchou (1995) observaram que a aplicação de GA₃ em *Origanum x intercedens* resultou em decréscimo nas concentrações de clorofilas e de tricomas glandulares na superfície foliar.

Deste modo, esforços na busca de novas substâncias ativas que possam levar a uma maior biossíntese de óleos essenciais são de grande importância, considerando-se principalmente a dependência da indústria farmacêutica nacional, onde a importação de matéria prima nesse setor chega a 80% (STEFANINI, 2002).

REFERÊNCIAS

1. BOSABALIDIS, A. M.; EXARCHOU, F. Effect of NAA and GA₃ on leaves and glandular trichomes of *Origanum x Intercedens* rech.: Morphological and anatomical features. **International Journal of Plant Sciences**, v. 156, n. 4, p. 488-495, 1995.
2. CASTRO, H. G.; FERREIRA, A. F.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**, 2 ed. Viçosa: Gráfica Suprema e Editora, 2004a. p. 48-66.
3. CASTRO, H.G. de; OLIVEIRA, L.O. de; BARBOSA, L.C. de A.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H. da; MOSQUIM, P.R.; NASCIMENTO, E.A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 55-87, 2004b.
4. CECHINEL FILHO. V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais; conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p. 99-103, 1998.
5. CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. In: BUCHANAN, B. GRUISSSEN, W.; JONES, R. E. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, 2000.
6. DEGUERRY, F.; PASTORE, L.; WU, S.; CLARK, A.; CHAPPELL, J.; SCHALK, M. The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 37, p. 123-136, 2006.

7. DURIAYAPAN, S.;BRITTEN, E. J.; BASFORD, K. E. The effect of temperature on growth, oil yield and oil quality of Japanese mint. **Annals of Botany**, v.58, p.729-736, 1986.
8. EPAGRI. **Normas técnicas para cultivo de capim-limão, citronela, palmarosa e patchuli. Florianópolis**, 2004. 58p. (Epagri. Sistemas de Produção, 37).
9. FAROOQI, A. H. A; SANGWAN, N. S.; SANGWAN, R. S. Effect of different photoperiodic regimes on growth, flowering and essential oil in *Mentha* species. **Plant Growth Regulation**, v.29, p 181-187, 1999.
- 10.GERSBACH, P. V. The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). **Annals of Botany**, v. 89, p.255-260, 2001
- 11.HSU, H. C.; YANG, W. C.; TSAI, W. J.; CHEN, C.C.; HUANG, H. Y.; TSAI, Y. C. a-Bulnesene, a novel PAF receptor antagonist isolated from *Pogostemon cablin*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p.1033–1038, 2006.
- 12.HU L.F.; LI, S.P.;CAOB, H.; LIU, J.J.; GAO J.L .; YANG, F.Q.;. WANG, Y.T. GC–MS Fingerprint of *Pogostemon cablin* in China. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. p. 1-7, 2005.
- 13.JOLY, A. B. **Introdução à Taxionomia Vegetal**. 3 ed, São Paulo: Nacional,1996.
- 14.JOY, P. P.; THOMAS, J.; MATEW, S.;GIM, J.; JONSHON, J. **Aromatic and medicinal plants research station**. Kerala : Odakkali Asamannoor, 1998.
- 15.MUNI-RAM, DASHA-RAM, SANTOSH-SINGH, NAQVI, A. A., SUSHIL-KUMAR. Studies on intercropping of patchouli (*Pogostemon patchouli*) with papaya

- (*Carica papaya*). **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science**, v. 21, n.2, p. 358-360, 1999.
16. PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; *et al.* A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 373-375, 2006.
17. RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica Econômica Brasileira**, 2 ed., Rio de Janeiro, Âmbito Cultural, 248 p., 1995.
18. SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SFIABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.
19. SHUKLA, A.; FAROOQI, A. H. A. E. review article: Utilization of plant growth regulators in aromatic plants production. **Current Research Medicinal & Aromatic Plants**, v.12, n.3, p.152- 157, 1990.
20. SOUZA, V.C; LORENZI, H. **Sistemática Botânica**. Guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 639 p., 2005.
21. STEFANINI, M. B.; RODRIGUES, S. D.; MING, L. C. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. **Horticultura brasileira**, v. 20, n. 1, p. 18-23, 2002.
22. SUGIMURA, Y.; KADOTANI, N.; UEDA, Y.; SHIMA, K.; KITAJIMA, S.; FURUSAWA, O.; IKEGAMI, M. Transgenic patchouli plants produced by Agrobacterium-mediated Transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p.251–257, 2005.

23. TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉN et. Al – 3 ed. Porto Alegre : Artemed, 2004.
24. ZHAO, Z.; LU, J.; LEUNG, K.; CHAN, C. L.; JIANG, Z. H. Determination of Patchoulic Alcohol in Herba Pogostemonis by GC-MS-MS. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n.7, p. 856-860, 2005.
25. ZHI-LIN, Y; CHUAN-CHAO, D; LIAN-QING,C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, v. 7,n. 6, p. 1266-1271, 2007.

3. CAPITULO II – DESENVOLVIMENTO DE *Pogostemon cablin* Benth., RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL SOB DIFERENTES NÍVEIS DE SOMBREAMENTO E GA₃.

RESUMO

Pogostemon cablin Benth. possui importância econômica devido ao óleo essencial que produz, o qual é amplamente utilizado pelas indústrias farmacêuticas e de perfumarias. Possui hábito perene e de um modo geral se desenvolve bem em ambientes sombreados. Dentre os fatores ambientais aos quais uma planta é exposta à luz é um recurso primordial ao desenvolvimento vegetativo, onde variações nos níveis de radiação podem promover alterações no padrão de desenvolvimento da espécie. A aplicação de giberelinas promove o alongamento celular e desta forma, também podem promover o aumento da altura das plantas nas quais são aplicadas. Deste modo, o nível de radiação e reguladores vegetais podem influenciar a concentração de constituintes químicos do óleo essencial de plantas aromáticas. O presente trabalho foi realizado na Universidade Federal do Paraná, utilizando-se estacas de plantas matrizes provenientes de Joinville-SC. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado constituído por 6 tratamentos, compostos por 3 níveis de sombreamento (0, 54 e 77%) com e sem aplicação de GA₃ (200 mg.L⁻¹). A aplicação de GA₃ iniciou-se 30 dias após o plantio das mudas. As plantas apresentaram altura significativamente superior em condições de 77% de sombreamento e com tratamento de GA₃ aos 120 dias. De forma contrária, as médias de números de folhas foram superiores em plantas desenvolvidas em condições não sombreadas e após 75 dias da aplicação de GA₃. O número de ramos foi significativamente superior em condições não sombreadas e sem aplicação de GA₃. A aplicação do regulador vegetal, também aos 75 dias, promoveu maior número de ramos com 54% de sombreamento. Entretanto, o tratamento com GA₃ proporcionou maior produtividade e maior rendimento de óleos essenciais em *P. cablin* quando submetido à níveis de sombreamento.

Palavras-chave: Patchouli, óleo essencial, reguladores vegetais

ABSTRACT

Pogostemon cablin has an economical importance due to the essential oil it produces, which is widely used in the pharmaceutical and perfume industries. It possesses perennial habit and generally develops well under shaded environments. Among the ambient factors to which a plant is exposed to, the sunlight is a primordial resource to the vegetative development, where radiation levels variations can promote alteration on the standard development of the species. The administering of gibberellin promotes the cellular elongation, thus also promoting the growth in stature of the plants where it is administered. Thus, radiation levels and growth regulators can influence the concentration of chemical constituents of the essential oil of aromatic plants. The current work was produced in the Federal University of Paraná. The experimental design used was entirely randomized with 6 treatments, consisting in 3 levels of shading (0, 54 and 77%) with and without the administering of GA₃ (200 mg.L⁻¹). The GA₃ was applied at 30 days after planting. The plants showed a significant superior height under 77% of shading and with GA₃ on the 120th day. The leaf number was superior on plants developed under no shading conditions and after 75 days of GA₃. After 75 days of applying the plant growth regulator, a larger number of branches under 54% of shading was observed. The number of branches was significantly superior also with no shading conditions and with no GA₃. When the plant growth regulator was at 75 days promoted a larger number of branches with 54% of shading. However, treatment with GA₃ provided increased productivity and greater yield of essential oils in *P. Cablin* as submitted to the levels of shading

Key-words: Patchouli, essential oil, plant growth regulators

3.1 INTRODUÇÃO

A biossíntese dos metabólitos secundários está condicionada a fatores ambientais que interagindo com características genéticas influenciam aspectos fisiológicos da espécie (CASTRO et al., 2004).

A fixação de carbono é um importante mecanismo fisiológico relacionado à produção de óleos essenciais (SANGWAN et al., 2001), onde o nível de radiação está relacionado à produção de metabólitos secundários, pois a formação destes ocorre a partir de rotas bioquímicas originadas no metabolismo primário.

Em plantas de carqueja (*Baccharis trimera* (Less). D.C) observou-se que o aumento do rendimento de óleos essenciais ocorreu com o aumento dos níveis de radiação aos quais as plantas foram expostas (SILVA et al., 2006). Plantas de *Pogostemon cablin* cultivado em consórcio com *Carica papaya*, apresentaram rendimento de óleos essenciais superior cultivadas em consórcio quando comparado aos teores das plantas cultivadas em monocultura, sugerindo melhor desempenho sob condições de sombreamento (MUNI-RAN et al., 1999).

Outro fator que pode influenciar o rendimento de óleos essenciais é a aplicação de reguladores vegetais. A aplicação destes pode alterar o metabolismo secundário aumentando ou diminuindo o teor do óleo essencial e seus constituintes (SHUKLA e FAROOQI, 1990).

Segundo Sangwan et al. (2001), os reguladores vegetais agem favoravelmente sobre o rendimento e a qualidade dos óleos essenciais, conforme observado em espécies do gênero *Mentha*, pertencente à família Lamiaceae. Ainda ao comparar o efeito da aplicação de vários reguladores vegetais, observou-se que o GA₃ promove aumento no rendimento de óleos essenciais e estimula o crescimento das plantas.

Em *Pogostemon cablin*, Misra (1995a) testou concentrações de giberelina de 10 a 500 mg.L⁻¹ e constatou que a aplicação exógena de 250 mg.L⁻¹ de GA₃ em condições de sombreamento promoveu maior número de ramos, nós por ramos, folhas verdes, área foliar e rendimento de óleo essencial. A massa fresca foliar, altura das plantas e número de folhas amarelas não foram afetados por estes tratamentos. Entretanto, Misra (1995b) observou em plantas que não foram

submetidas a ambientes sombreados que a aplicação de GA₃ resultou em plantas maiores e com maior números de nós.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do sombreamento e da aplicação de GA₃ no desenvolvimento vegetativo, na produtividade e no rendimento dos óleos essenciais em *Pogostemon cablin*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de casa-de-vegetação no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná, Curitiba- PR durante os meses- de setembro de 2006 a janeiro de 2007.

3.2.1 Material Vegetal

O material vegetal utilizado para a extração do óleo essencial constituiu-se de plantas de *Pogostemon cablin* Benth. fornecidas pela empresa Hérbia Beneficiamento de Plantas Ltda, Joinville – SC, sendo mantidas em casa-de-vegetação durante o período de setembro de 2006 a janeiro de 2007.

3.2.2 Preparo das mudas

As mudas foram obtidas por meio de estacas com 6 cm de comprimento e um par de folhas reduzidas a metade. Estas foram mantidas em tubetes de 50 cm³ contendo Plantmax HT® durante 60 dias, em condições de casa-de-vegetação, com sistema de irrigação intermitente com três turnos de rega, sendo de 15 segundos a cada 15 minutos das 08:00h às 17:00h, 15 segundos a cada hora das 17:00h às

23:00h e 15 segundos a cada 3 horas das 23:00h às 08:00h, para o enraizamento das estacas.

Após este período as estacas que apresentaram desenvolvimento vegetativo satisfatório, bem como boas condições fitossanitárias foram selecionadas para o transplante em vasos.

Para a implantação do experimento amostras do solo foram coletadas para análise química no Laboratório de Fertilidade do Departamento de Solos da UFPR (Tabela 1).

Para a correção do pH do solo, foi incorporado 8,3 toneladas. ha⁻¹ de calcário (100% PNRT) (RAIJ et al., 1996). Ainda conforme recomendação destes autores, foi incorporado 30Kg/ ha⁻¹ de N, 130Kg/ ha⁻¹ de P₂O₅ e 110 Kg/ ha⁻¹ de K₂O. Utilizou-se a recomendação para *Stevea rebaudiana* Bertone. (estévia) devido à semelhança de hábito entre as espécies.

TABELA 1 - Características químicas do solo utilizado no experimento. Curitiba-PR, 2007.

pH	Al ⁺³	H+Al ⁺³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	SB	T	P	S	C	V	m	Ca/Mg	Argila	
CaCl ₂	SMP	cmol _c /dm ³						mg/dm ³	g/dm ³	%	%		g/kg		
4,30	5,20	3,60	9,00	1,60	0,80	0,07	2,47	11,47	5,70	-	41,4	22	59	2,0	400,0

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 X 3 com 5 repetições e 5 vasos por parcela com dimensões de 17cm de altura x 23 cm de diâmetro e capacidade para aproximadamente 6 Kg de substrato. Os tratamentos incluíram diferentes níveis de sombreamento (0, 54 e 77%) utilizando-se Sombrite® e aplicação de Pro Gibb® 10% GA₃ (200 mg. L⁻¹) e testemunha. As aplicações de GA₃ foram realizadas com equipamento de pulverização pressurizado por CO₂ com vazão e pressão constante (50 Psi), aos 30 e aos 75 dias após a implantação do experimento.

Para determinar com maior precisão os níveis de sombreamento, foram feitas medições dos níveis de radiação utilizando-se o aparelho porômetro, modelo LICOR 1600, em dias ensolarados e nublados (Tabela 2).

TABELA 2- Níveis de radiação ($\mu \text{ mol. s}^{-1} \text{ m}^{-2}$) e sombreamento (%) em condições de casa de vegetação, em dias ensolarados e nublados. Curitiba-PR, 2007.

Ambiente	Ensolarado		Nublado	
	Radiação	Sombreamento	Radiação	Sombreamento
Externo	1770		330	
Interno	869 (100%)	0%	144 (100%)	0%
30% Sombreamento	400 (46,29%)	53,71%	69 (47,91%)	52,09%
70% Sombreamento	200 (23,01%)	76,99%	38 (26,38%)	73,72%

O desenvolvimento vegetativo do material foi avaliado aos 30, 75 e 120 dias após a o plantio (Figura 2) a partir da determinação da área foliar, altura (cm) considerando-se a altura do ramo principal a partir do substrato, número de folhas e número de ramos.

A área foliar das plantas de patchouli foi determinada a partir de discos foliares de área conhecida em posições específicas do limbo foliar, evitando-se a nervura central. Foram coletadas folhas apicais, basais e medianas as quais foram pesadas. Retirou-se 50 discos com área conhecida de $0,7854 \text{ cm}^2$ de cada folha. Após este procedimento os discos retirados foram pesados e a área foliar foi calculada (FERNANDES, 2000).

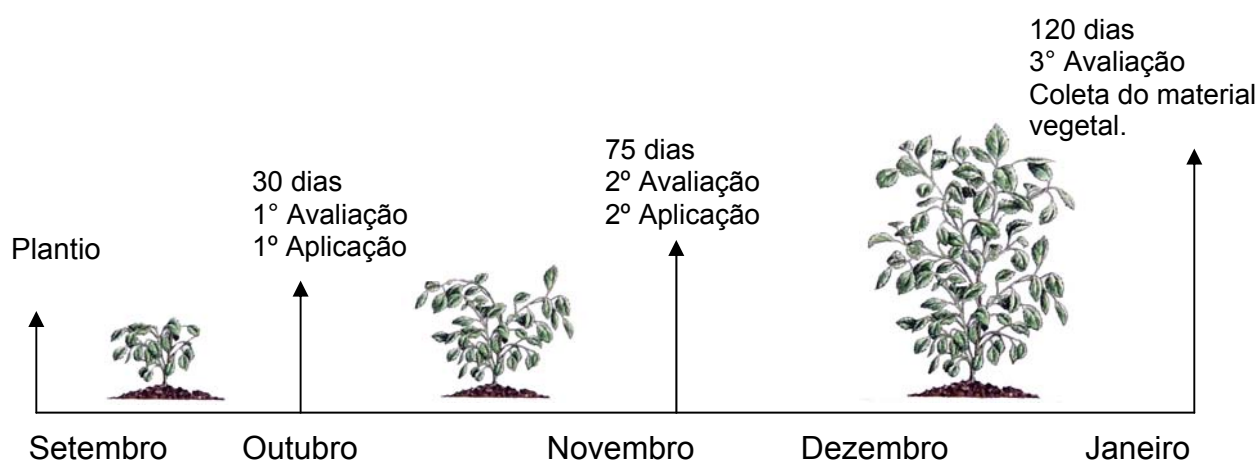


FIGURA 2- Períodos de avaliação e aplicação de regulador vegetal em plantas de patchouli

A extração do óleo essencial de *Pogostemon cablin* foi realizada no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal do Departamento de Fitotecnia e

Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná. Utilizou-se 30g de tecido foliar com 120 dias de cultivo e aproximadamente 20% de umidade para hidrodestilação durante 5 horas em aparelho graduado Clevenger e balão volumétrico de 2L, conforme testes preliminares realizados em laboratório com a mesma espécie.

3.2.3 Caracterização química

As amostras do óleo essencial de *Pogostemon cablin* foram analisadas por meio de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) no Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos, no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná. Utilizou-se cromatógrafo gasoso Varian, modelo CP 3800 com detector FID (CG_FID), coluna capilar Chrompack de sílica fundida CP-SIL 8 CB, 0.25mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e 0,25 µm de filme líquido. Temperatura do injetor: 250 °C, split 1:300, Volume de amostra injetada: 1,0 µl. Gás de arraste: hélio 1mL/min constante. Gás de make up: ar sintético, nitrogênio e hidrogênio. Temperatura do detector FID: 300°C. Programação de temperatura do forno: temperatura inicial de 50°C, elevação de temperatura a 180°C na razão de 10°C permanecendo por 20 minutos; elevação de temperatura a 200°C na razão de 20°C permanecendo por 1 minuto. Tempo total da corrida: 35 minutos.

3.2.4 Análise estatística

As análises de variâncias foram realizadas utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT versão 7.4 beta (SILVA e AZEVEDO, 2006). As variâncias dos tratamentos foram testadas quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Desenvolvimento vegetativo

Houve interação significativa entre os fatores sombreamento e giberelina para a altura de plantas de *Pogostemon cablin* após 120 dias de cultivo em casa-de-vegetação, onde os tratamentos submetidos a 54 e 77% de sombreamento e na ausência de GA₃ proporcionaram a maior altura das plantas. Após a aplicação de GA₃, a altura de plantas submetidas a 77% de sombreamento foi significativamente superior que plantas em ambiente não sombreado e com 54% de sombreamento (Tabela 3). Entretanto, houve efeito do fator sombreamento aos 30 e 75 dias (Tabela 4), onde os tratamentos submetidos à de 54 e 77% de sombreamento foram superiores. Ainda aos 75 dias, a aplicação de GA₃ promoveu aumento na altura das plantas quando comparadas as que não receberam aplicação do regulador vegetal (Tabela 4).

Entre os diversos fatores ambientais, a radiação é primordial ao desenvolvimento das plantas e alterações nos níveis de radiação aos quais uma espécie está adaptada podem levar a alterações em suas características anatômicas, bioquímicas e conseqüentemente no desenvolvimento (ATROCH et al., 2001). Por outro lado, a aplicação de giberelinas também pode promover o aumento da altura média das plantas, pois estas promovem o alongamento celular (SCAVRONI, 2006). Em artemísia (*Tanacetum parthenium* (L.) Shultz – Bip), o aumento do nível de sombreamento também promoveu altura superior, quando comparadas às plantas mantidas em pleno sol (CARVALHO et al., 2006). Os resultados obtidos neste experimento estão de acordo com estes autores, pois houve influência do fator sombreamento tanto na presença como na ausência do regulador vegetal.

TABELA 3 - Altura (cm), número de folhas e ramos de *Pogostemon cablin* em diferentes níveis de sombreamento e 200 mg.L⁻¹GA₃. Curitiba-PR, 2007.

Desenvolvimento Vegetativo	Sombreamento (%)		
	0	54	77
Altura (30 dias)			
Sem GA ₃	6,84 ns	10,24 ns	9,48 ns
Com GA ₃	7,63 ns	9,78 ns	10,28 ns
Altura (75 dias)			
Sem GA ₃	19,20 ns	26,86 ns	26,80 ns
Com GA ₃	22,61 ns	29,56 ns	30,06 ns
Altura (120 dias)			
Sem GA ₃	38,04 Bb	50,70 Aa	55,64 Ab
Com GA ₃	49,67 Ba	48,40 Ba	65,22 Aa
Número de folhas (30 dias)			
Sem GA ₃	14,12 ns	14,52 ns	12,52 ns
Com GA ₃	13,68 ns	14,16 ns	12,32 ns
Número de folhas (75 dias)			
Sem GA ₃	42,40 Ab	28,96 Bb	28,96 Ba
Com GA ₃	69,08 Aa	40,76 Ba	29,28 Ca
Número de folhas (120 dias)			
Sem GA ₃	65,60 ns	43,84 ns	43,84 ns
Com GA ₃	78,96 ns	55,52 ns	58,40 ns
Número de ramos (30 dias)			
Sem GA ₃	2,12 ns	2,44 ns	2,12 ns
Com GA ₃	2,12 ns	2,36 ns	2,24 ns
Número de ramos (75 dias)			
Sem GA ₃	2,92 Aa	2,64 ABa	2,20 Ba
Com GA ₃	2,12 Bb	2,64 Aa	2,44 ABa
Número de ramos (120 dias)			
Sem GA ₃	2,92 ns	2,68 ns	2,28 ns
Com GA ₃	3,16 ns	2,64 ns	2,52 ns

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Para o número de folhas, também houve interação entre os fatores aos 75 dias, onde o tratamento não submetido a condições de sombreamento promoveu as maiores médias independente da aplicação do regulador (Tabela 3). Entretanto, aos 120 dias houve influência dos fatores de forma isolada sobre o número de folhas, onde novamente o tratamento não submetido à condição de sombreamento resultou médias superiores (Tabela 4). Em relação à aplicação do regulador vegetal, este também promoveu aumento no número de folhas aos 120 dias (Tabela 4). Da mesma forma, Bora e Sarma (2006), constaram em plantas de ervilha (*Pisum*

sativum L.) que a aplicação de GA₃ promove o aumento do número de folhas quando aplicada em concentrações até 250 mg.L⁻¹.

De modo semelhante ao número de folhas, houve interação entre os fatores sombreamento e giberelina para o número de ramos aos 75 dias, onde o tratamento não sombreado foi superior ao tratamento com 77% de sombreamento quando o regulador não foi aplicado. Com a aplicação do regulador vegetal o maior número de ramos foram encontrados nos tratamentos com 54 e 77% de sombreamento em relação ao tratamento não sombreado (Tabela 3). Misra (1995 a) observou em plantas de patchouli e que a aplicação deste regulador na concentração de 250 mg.L⁻¹ promoveu maior número de ramos quando as plantas foram mantidas em condições de sombreamento, os resultados obtidos neste trabalho para o número de ramos não concordam com este autor, pois em plantas submetidas a sombreamento não houve diferença significativa entre os tratamentos com e sem aplicação do regulador vegetal.

Após 120 dias de cultivo observou-se efeito isolado do fator sombreamento, onde plantas não submetidas às condições de sombreamento apresentaram maior número de ramos (Tabela 4).

TABELA 4 - Altura (cm), número de folhas e ramos de *Pogostemon cablin* em diferentes níveis de sombreamento, com e sem aplicação de 200 mg.L⁻¹ GA₃. Curitiba-PR, 2007.

Desenvolvimento Vegetativo	Sombreamento (%)			Regulador Vegetal	
	0	54	77	Sem GA ₃	Com GA ₃
Altura (30 dias)	7,23 B	10,01 A	9,88 A	-	-
Altura (75 dias)	20,90 B	28,21 A	28,43 A	24,28 B	27,41 A
Número de folhas (120 dias)	72,28 A	49,68 B	51,12 B	51,09 B	64,29 A
Número de ramos (120 dias)	3,04 A	2,66 B	2,40 B	-	-

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Para os teores de massa seca foliar os tratamentos não sombreados e sem aplicação de GA₃ apresentaram as maiores médias. Entretanto, Alvarenga et al., (2003) observou maiores teores de massa seca foliar em plantas de *Croton*

urucurana Baill. submetidas à limitação de 70% de radiação quando comparadas as que foram mantidas em condições de radiação plena.

As plantas tratadas ou não com GA₃ apresentaram maior massa seca foliar no tratamento não sombreado. Nesta condição, a aplicação de giberelina reduziu o acúmulo de massa seca foliar. Em condição de sombreamento, no entanto, médias significativamente superiores para massa seca foliar foram obtidas com a aplicação do regulador vegetal (Tabela 5). Entretanto, para os teores de massa seca de ramos o tratamento com 54% de sombreamento foi estatisticamente superior aos demais independente da aplicação do regulador vegetal. Após aplicação da giberelina foi possível observar em todos os níveis de sombreamento maiores teores de massa seca de ramos destes tratamentos quando comparados aos mesmos níveis de sombreamento sem aplicação de GA₃.

TABELA 5- Massa seca (g) de folhas e ramos de *Pogostemon cablin* aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de 200 mg.L⁻¹GA₃. Curitiba-PR, 2007.

Desenvolvimento Vegetativo	Sombreamento (%)		
	0	54	77
Massa Seca de Folhas			
Sem GA ₃	69,55 Aa	56,00 Bb	47,29 Cb
Com GA ₃	62,72 Ab	58,78 Ba	52,75 Ca
Massa Seca de Ramos			
Sem GA ₃	30,96 Bb	39,08 Ab	30,12 Cb
Com GA ₃	42,43 Ba	44,11 Aa	39,59 Ca

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A área foliar das plantas de *Pogostemon cablin* foi superior em condição de sombreamento independente da aplicação de giberelina. No entanto, quando aplicada, médias superiores foram obtidas em todas as condições sombreamento (Tabela 6). Aguilera (2004), observou em plantas de *Siegesbeckia orientalis* (botão-de-ouro), que plantas mantidas em 50% de sombreamento apresentaram área foliar cerca de três vezes maior que plantas cultivadas sem limitação da radiação. Misra (1995 a) relatou que a aplicação de giberelina combinada ao sombreamento

promove aumento da área foliar de *Pogostemon cablin*. Deste modo, os resultados obtidos concordam com estes autores.

TABELA 6 - Área foliar (cm²) de plantas de *Pogostemon cablin* aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de 200 mg.L⁻¹GA₃. Curitiba-PR, 2007.

Área foliar	Sombreamento (%)		
	0	54	77
Sem GA ₃	42,25 Cb	80,67 Bb	108,61 Ab
Com GA ₃	58,37 Ca	96,60 Ba	132,64 Aa

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

3.3.2 Rendimento e produtividade do óleo essencial

Assim como para maioria das características de desenvolvimento, houve interação significativa entre os fatores no rendimento de óleo essencial. Embora o rendimento de óleo essencial não tenha diferenciado estatisticamente nos diferentes níveis de sombreamento, quando o regulador foi aplicado houve aumento significativo de rendimento em condições de sombreamento (Tabela 7). O uso de reguladores vegetais pode alterar o comportamento de algumas plantas através da sua produtividade bem como do seu metabolismo secundário. Desta forma é possível obter-se um aumento no teor do óleo essencial em algumas espécies (SHUKLA e FAROOQUI, 1990). Misra (1995a; 1995b) relatou em seus trabalhos com patchouli que a concentração de GA₃ em 250 mg.L⁻¹ em condições de sombreamento promove maior rendimento de óleo essencial e aumento do número de folhas verdes. Este maior rendimento de óleo essencial nestas condições pode ser explicado pelo aumento do número de folhas, pois as estruturas que armazenam óleo essencial no patchouli estão presentes em maior quantidade nas folhas (HENDERSON et al., 1970). Pode-se observar que resultados semelhantes a este autor foram obtidos nas condições deste experimento mesmo utilizando-se uma concentração inferior de giberelina.

TABELA 7- Rendimento do óleo essencial ($\mu\text{L.g}^{-1}$ de massa seca foliar) de *Pogostemon cablin* aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de $200 \text{ mg.L}^{-1}\text{GA}_3$. Curitiba-PR, 2007.

Rendimento de óleo essencial	Sombreamento (%)		
	0	54	77
Sem GA_3	58.26 Aa	44.04 Ab	52.96 Ab
Com GA_3	51.10 Ba	86.41 Aa	85.15 Aa

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ao verificar os efeitos da aplicação de GA_3 em *Artemisia pallens* Wall, Farooqi et al. (1993) observou que a concentração 200 mg.L^{-1} promoveu diferença na produtividade do óleo essencial.

De modo semelhante ao rendimento à alteração nos níveis de sombreamento não promoveu diferença significativa na produtividade do óleo essencial nos tratamentos sem aplicação do regulador vegetal. Por outro lado, as plantas tratadas com regulador vegetal apresentaram maior rendimento de óleo essencial em 54 e 77% de sombreamento (Tabela 8).

TABELA 8- Produtividade (L.ha^{-1}) de óleos essenciais de *Pogostemon cablin* aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de $200 \text{ mg.L}^{-1}\text{GA}_3$. Curitiba-Pr, 2007.

Produtividade óleo essencial	Sombreamento (%)		
	0	54	77
Sem GA_3	15,92 Aa	14,16 Ab	10,47 Ab
Com GA_3	15,99 Ba	24,95 Aa	21,84 ABa

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.3.3 Composição do óleo essencial

Tanto a síntese do patchoulol quanto do pogostol ocorrem em presença de água (DEGUERRY et al., 2006), isto explicaria a tendência das amostras mantidas em 54% de sombreamento sem aplicação do regulador vegetal apresentarem

maiores concentrações destes compostos (Tabela 9), pois em ambientes onde a radiação não incidiu diretamente, a retenção de água no substrato foi superior. Por outro lado, a tendência apresentada pelos constituintes minoritários, os quais apresentaram maiores concentrações em condições não sombreadas, pode estar relacionada com reação de síntese. Nestas reações, ocorre desprotonização e a molécula de água não é utilizada como substrato, sabendo-se que a síntese destes não é dependente da quebra de uma molécula de água, estes resultados sugerem que a concentração destes constituintes no óleo essencial é diretamente dependente do balanço dos constituintes patchoulol e pogostol, tendo em vista a presença de precursores comuns. No caso da síntese de patchoulol e seicheleno, estes possuem como precursor comum o intermediário número 7 da rota metabólica, e na síntese de pogostol, alfa guaieno e alfa buleseno o precursor comum é o guaianil cátion.

Conforme referência supracitada, o patchoulol e o pogostol são formados em presença de água, entretanto, na ausência de água os mesmos intermediários que dão origem a esses compostos originam o seicheleno e alfa guaieno, respectivamente. Esta tendência também pode ser observada na tabela 9, onde sem sombreamento houve uma diminuição nos teores de patchoulol e um acréscimo nos teores de seicheleno, a mesma relação pode ser observada entre o pogostol e o alfa guaieno.

TABELA 9 – Constituintes do óleo essencial de *Pogostemon cablin* aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento e 200 mg.L⁻¹GA₃. Curitiba-PR, 2007.

Sombreamento	0%	54	77%	0%	54%	77%
Composto (%)	Sem GA₃			Com GA₃		
Beta patchouleno	1,29	1,10	0,99	1,07	1,08	1,16
Cariofileno	3,00	2,34	2,5	2,34	2,27	2,64
Alfa guaieno	8,09	6,16	6,43	6,09	6,03	6,93
Gama patchouleno	5,36	4,19	4,44	4,09	4,09	4,70
Alfa patchouleno	3,38	2,62	2,77	2,57	2,54	2,94
Seicheleno	1,36	1,07	1,11	1,02	1,03	1,16
Beta guaieno	0,94	0,59	0,63	0,57	0,59	0,77
Alfa selineno	1,77	1,36	1,52	1,34	1,30	1,52
Alfa bulneseno	12,10	9,28	10,65	9,28	8,80	10,43
Pogostol	4,26	4,80	4,57	4,63	4,74	4,36
Patchoulol	49,40	55,99	54,60	57,41	57,30	54,50

3.4 CONCLUSÕES

O nível de sombreamento e a aplicação de GA₃ altera o desenvolvimento vegetativo das plantas de *Pogostemon cablin*, influenciando a altura, número de folhas, de ramos e área foliar.

O sombreamento combinado à aplicação de giberelina resulta em plantas maiores e com número de folhas reduzido. O número de ramos é superior em ambiente não sombreado, porém, quando o GA₃ é aplicado, o aumento no número de ramos é favorecido pelo sombreamento.

Plantas mantidas em ambientes não sombreados apresentam maiores teores de massa seca foliar e menor área foliar.

A aplicação de GA₃ promove aumento da área foliar.

O sombreamento e a aplicação de GA₃ resulta em maior rendimento e produtividade do óleo essencial de *Pogostemon cablin*.

REFERÊNCIAS

1. AGUILERA, D. B.; FERREIRA, F. A.; CECON, P. R. . Crescimento de *Siegesbeckia orientalis* sob diferentes condições de luminosidade. **Planta Daninha**, v. 22, n.1. p. 43-51, 2004.
2. ALVARENGA. A. A.; CASTRO, E. M.; CASTRO, E. C. L. J., 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, n.1, p. 53-57, 2003.
3. ATROCH, E. M. A. C.; SOARES, A. M.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forficata* Link submetidas à diferentes condições de sombreamento. **Ciência Agrotecnologia**, v.25, n.4, p.853-862, 2001.
4. BORA, R. K.; SARMA, C. M. Effect of gibberellic acid and cycocel on growth, yield and protein content of pea. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 39, n.2, p. 324-330, 2006.
5. CASTRO, H. G.; FERREIRA, A. F.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**, 2 ed. Viçosa: Gráfica Suprema e Editora, 2004. p. 48-66.
6. DEGUERRY, F.; PASTORE, L.; WU, S.; CLARK, A.; CHAPPELL, J.; SCHALK, M. The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 37, p. 123-136, 2006.

7. FAROOQI, A.A.; DEVIAH, K.A; VASUNDRA, M. Effect of some growth regulators and pinching on growth, yield and essential oil content of davana (*Artemisia pallens* Wall.) **Indian Perfumer**, v.37, p.19-23, 1993.
8. FERNANDES, P. D. **Análise de crescimento e desenvolvimento vegetal**. Campina Grande: UFPB, Departamento de Engenharia Agrícola, 2000. 22p.
9. FREITAS, M.S.M.; MARTINS, M. A.; VIEIRA. I. J. C. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.9, p.887-894, set. 2004.
10. HENDERSON, W.; JAMES, W. H.; HOW, P.; JUDGE, J. Chemical and morphological studies on sites of sesquiterpene accumulation in *Pogostemon cablin* (Patchouli). **Phytochemistry**, v. 9, p. 1219-1228, 1970.
11. MISRA, M. The effect of gibberellic acid (GA₃) on the growth, photosynthetic pigment content and oil yield of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) plants grown in shade condition. **Biologia Plantarum**, v.17, n. 4, p. 367-370, 1995 a.
12. MISRA, M. Application of gibberellin to *Pogostemon cablin* plants – growth, photosynthetic pigment content and oil, yield. **Biologia Plantarum**, v.37, n. 4, p. 635-639, 1995 b.
13. MUNI-RAM, DASHA-RAM, SANTOSH-SINGH, NAQVI, A. A., SUSHIL-KUMAR. Studies on intercropping of patchouli (*Pogostemon patchouli*) with papaya (*Carica papaya*). **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science**, v. 21, n.2, p. 358-360, 1999.
14. RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Instituto Agrônomo e Fundação IAC, Campinas, 285p., 1996.

15. SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SFIABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.
16. SCAVRONI, J.; VASCONCELLOS, M. C.; VALMORBIDA, J.; FERRI, A. F.; MARQUES, M. O. M.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J. D. Rendimento e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* L. submetida a aplicações de giberilina e citocinina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.4, p. 40-43 , 2006
17. SHUKLA, A.; FAROOQI, A. H. A. E. review article: Utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. Current Research **Medicinal & Aromatic Plants**, v 12, n 3, p 152-7, 1990.
18. SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. A new version of the assistat-statistical assistance software. In: World Congress on Computers in Agriculture, 4. Orlando-FL-USA: Anais: Orlando: **American Society of Agricultural Engineers**, p.393-396, 2006.
19. SILVA, F. G.; PINTO. J. E. P.; CARDOSO. M. G. et al. Influence of radiation level on plant growth, yield and quality of essential oil in carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 1, p. 52-57, 2006
20. SUGIMURA, Y.; KADOTANI, N.; UEDA, Y.; SHIMA, K.; KITAJIMA, S.; FURUSAWA, O.; IKEGAMI, M. Transgenic patchouli plants produced by Agrobacterium-mediated Transformation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**,. v. 82, p.251–257, 2005.

4. CAPÍTULO III – ASPECTOS ANATÔMICOS E BIOQUÍMICOS EM *Pogostemon cablin* Benth. SOB DIFERENTES NÍVEIS DE SOMBREAMENTO E APLICAÇÃO DE GA₃.

RESUMO

A nível mundial, o óleo essencial de *Pogostemon cablin* é utilizado amplamente pela indústria de perfumes. As giberelinas são frequentemente associadas à promoção do crescimento caulinar e o nível de radiação ao qual as plantas são expostas pode afetar as características morfológicas e fisiológicas das folhas interferindo diretamente em seu desenvolvimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do sombreamento e da aplicação de GA₃, sobre características bioquímicas e anatômicas de plantas de *P. cablin*. O presente trabalho foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado constituído por 6 tratamentos comparando o efeito de níveis de sombreamento (0, 54 e 77%) e GA₃ (200 mg.L⁻¹). A aplicação de GA₃ foi realizada aos 30 dias após o plantio. Houve interação significativa entre os fatores para concentração de proteínas, aminoácidos, carotenóides. Quando houve aplicação de GA₃ os teores de proteínas foram superiores em condições de sombreamento (77 e 54%), sendo que na ausência do regulador, maiores médias foram observadas em condições não sombreadas. Maiores teores de aminoácidos foram observados em plantas tratadas com GA₃ e desenvolvidas sem sombreamento. De forma contrária, maiores concentrações de clorofilas foram observadas em plantas sombreadas. Plantas tratadas com GA₃ apresentaram maiores teores de açúcares solúveis totais quando submetidas a sombreamento. A avaliação anatômica de tecidos foliares demonstrou diferença na disposição das células do parênquima lacunoso entre folhas de sol e sombra.

Palavras-chave: giberelina, parênquima lacunoso, metabolismo.

ABSTRACT

The essential oil of *Pogostemon cablin* is widely used by the perfume industry. Factors such as radiation levels and plant growth regulators influence the essential oil yield and composition of aromatic plants. Gibberellin promotes the cellular elongation and growth of the plants where it is applied. The level of radiation which plants are exposed also affect morphological and physiological characteristics of the leaves, affecting its development. The purpose of this work was to evaluate the influence of the shading levels and GA₃ on biochemical and anatomical characteristics of plants of *P. cablin*. The current work was carried out at Federal University of Paraná State. The experimental design was completely randomized with 6 treatments, consisting in 3 levels of shading (0, 54 and 77%) with and without GA₃ (200 mg.L⁻¹). GA₃ was applied at 30 days after planting. There was significant interaction between both factors for protein, amino acids and carotenoid concentrations. With GA₃, the levels of protein were higher in shading conditions (77 and 54%). In the absence of the plant growth regulator, great averages were observed under no shading conditions. Amino acid concentration increased in plants treated with GA₃ and developed without shading, however, chlorophyll concentration increased in plants with limited radiation. Plants treated with GA₃ showed greater levels of total soluble sugars when subject to shading. The anatomical evaluation of the leaf tissue of sun and shade levaees showed difference in the arrangement of cells in the spongy parenchyma, with great development under shading conditions.

Key-words: Gibberellin, spongy parenchyma, metabolism.

4.1 INTRODUÇÃO

Pogostemon cablin, popularmente conhecido como patchouli, possui óleo essencial rico em terpenos (SUGIMURA et al., 2005), o qual é amplamente utilizado pelas indústrias de cosméticos e de perfumarias (ZHAO et al., 2005), devido à sua fragrância amadeirada e capacidade de fixação à pele (SUGIMURA et al., 2005).

O nível de radiação pode afetar as características anatômicas, morfológicas e fisiológicas das plantas interferindo diretamente sobre desenvolvimento, estrutura e função foliar, estruturas dos cloroplastos e componentes do aparato fotossintético (NASCIMENTO et al., 2006), e o crescimento destas pode refletir a habilidade de adaptação de algumas espécies às condições de radiação do ambiente em que se desenvolvem (ALMEIDA et al., 2004).

Em resposta à disponibilidade de luz, plantas cultivadas em diferentes ambientes podem alterar suas características morfológicas, sendo uma delas a espessura da folha (REISSER JÚNIOR, 2003). Segundo Lee (2000) o espessamento foliar é efeito da intensidade luminosa, onde folhas submetidas a ambientes mais ensolarados são mais grossas, por apresentarem tecido paliçádico mais espesso (ATROCH, 2001). Lima Junior et al., (2006) constataram que a espessura do parênquima paliçádico e das epidermes das faces adaxial e abaxial são as que mais contribuem para o espessamento do limbo foliar e do parênquima lacunoso de *Cupania vernalis* cultivadas a pleno sol.

Costa (2007), observou maior densidade estomática em plantas de alfavaca (*Ocimum selloi* Benth.) mantidas a pleno sol, entretanto, o número de cloroplastos por célula do parênquima paliçádico foi significativamente maior em plantas sombreadas.

Assim como outros organismos multicelulares, as plantas utilizam sinais para se comunicar entre órgãos distantes e desta forma coordenar seu crescimento. Os hormônios vegetais têm influência em vários aspectos da regulação do crescimento vegetal, sendo as giberelinas responsáveis tanto pelo alongamento quanto pela divisão celular (COZIER et al., 2000). Deste modo, aplicação de reguladores vegetais também pode alterar características anatômicas das folhas, conforme observado em cortes transversais de folhas de ipê-amarelo (*Tabebuia alba* (Chan.)

Sandw) quando a aplicação de brassinoesteroides ou brassinoesteroides combinados com GA₃, promoveram o aumento da epiderme, das células do mesofilo e do espessamento da lâmina foliar, além da divisão das células do pecíolo (ONO et al., 2000). Por outro lado, Bosabalidis e Exarchou (1995) relataram que a aplicação de GA₃ em plantas de *Origanum x intercedens* resultou no decréscimo na densidade de tricomas glandulares na superfície foliar e na espessura da folha.

O sucesso da adaptação de uma espécie a diferentes níveis de radiação está também relacionado à eficiência desta na partição de fotoassimilados para partes da planta e na habilidade de ajustar suas características morfofisiológicas para captação de recursos primários (DIAS-FILHO, 1997). As adaptações bioquímicas das plantas a diferentes ambientes envolvem o metabolismo primário e secundário destas. Deste modo, a luz como fonte primária de energia é um dos principais fatores relacionados à produtividade fotossintética a ser considerado (CARVALHO et al., 2006).

De um modo geral variações na intensidade luminosa as quais uma planta é submetida podem alterar as concentrações de açúcares totais em folhas maduras, podendo ocorrer um decréscimo significativo nos teores destas macromoléculas durante o dia quando submetidas à limitação de radiação, conforme observado por Pystina e Danilov (2001) em folhas maduras de *Ajuga reptans* L. (Lamiaceae) submetidas a tratamentos de pleno sol e limitação de radiação. Plantas mantidas em pleno sol também apresentam maiores concentrações de rubisco, a qual é relacionada a maior concentração de proteínas nestas plantas (LAMBRES et al., 1998),

Outras alterações bioquímicas e anatômicas podem ser observadas ao comparar folhas submetidas a diferentes níveis de radiação. Plantas desenvolvidas em ambientes com limitação da radiação possuem um número inferior de cloroplastos por área em relação á plantas desenvolvidas em condições de pleno sol. Por outro lado, os cloroplastos de plantas desenvolvidas em ambientes sombreados possuem maior volume de tilacóides e maior quantidade de tilacóides por granum (LAMBRES et al., 1998). Desta forma, o maior acúmulo de moléculas de clorofilas em ambientes sombreados pode ser decorrente de um efeito compensatório da espécie a menor quantidade de radiação disponível (ALMEIDA et al., 2004).

Em relação aos efeitos da aplicação de reguladores vegetais sobre o metabolismo das plantas, Mostafa et al., (2005), ao comparar a aplicação de GA₃, benziladenina (BA) e GA₃ combinado com BA em *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) observou o acréscimo significativo nos teores de açúcares totais, proteínas e nitrogênio solúvel, quando comparado aos teores observado no tratamento controle.

O objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos anatômicos e bioquímicos de *Pogostemon cablin* quando submetido a níveis de sombreamento e aplicação de giberelina.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Análise anatômica

Para a realização da análise anatômica das folhas de *Pogostemon cablin*, foram utilizadas folhas submetidas a zero, 54 e 77% de sombreamento com aplicação de GA₃ e testemunha. Estas foram fixadas em FAA 70 (JOHANSEN, 1940) [álcool 70%, ácido acético e formol (90:5:5 v/v/v)], durante 72 horas. Após este período o FAA foi eliminado e as folhas foram mantidas em álcool 70% até a realização dos cortes anatômicos.

A análise anatômica das plantas de *Pogostemon cablin* foi realizada no laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná. Foram confeccionados cortes a mão livre, corados durante 20 segundos em Azul de Astra diluído em água (1:15 v/v), sendo o excesso de corante retirado com água. Após este procedimento, os cortes foram mantidos durante 15 segundos em Fucsina Básica 0,1% diluída em água (1:20 v/v) e após a aplicação do segundo corante, os cortes foram novamente lavados em água e dispostos em lâminas de vidro para confecção de lâminas semipermanentes.

Para o preparo das lâminas semipermanentes foram dispostos 5 cortes em cada lâmina, sobre estes foi adicionado glicerina com posterior colocação da lamínula e vedação com esmalte.

4.2.2 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas das plantas de *Pogostemon cablin* foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia da Universidade Federal do Paraná, de fevereiro a maio de 2007.

O material vegetal empregado nas análises bioquímicas constitui-se das folhas retiradas do quarto par de folhas totalmente expandidas de *Pogostemon cablin* mantidas em casa-de-vegetação durante o período de setembro de 2006 a janeiro de 2007. Todas as leituras de absorbância foram realizadas utilizando-se espectrofotômetro Shymadzu UV-1601.

4.2.2.1 Extração e dosagem de proteínas solúveis totais

Para a determinação dos teores de proteínas solúveis totais nos tecidos foliares de *Pogostemon cablin* foi utilizado o método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976), onde foram utilizados 500 mg de material vegetal fresco do quarto par de folhas totalmente expandidas, na forma de discos foliares de 0,7854 cm². Os discos foliares foram previamente lavados e secos e, após este procedimento, macerados em tampão fosfato 0,2 M pH 7,5. O extrato obtido foi então centrifugado a 20.000 g a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e as amostras mantidas em freezer a -20°C aonde permaneceram até a realização da dosagem dos teores de proteínas solúveis totais. Este procedimento foi também utilizado para a obtenção de amostras para a dosagem de açúcares solúveis totais e açúcares redutores.

A determinação dos teores de proteínas nos tecidos foliares foi realizada a partir de 40 µL das amostras transferidas para um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 460 µL de tampão fosfato e 1000µL de reagente de Bradford (Bio-Rad). A leitura das absorbâncias foi realizada no comprimento de onda de 630 nm. As concentrações de proteínas foram determinadas a partir de curva padrão de soro albumina bovina (BSA).

4.2.2.2 Determinação de aminoácidos totais

A determinação de aminoácidos foi realizada segundo metodologia descrita por Bates et al. (1973). Utilizou-se 500mg de material vegetal fresco, do quarto par de folhas totalmente expandidas, na forma de discos foliares de 0,7854 cm². Os discos foliares foram previamente lavados e secos, após este procedimento o material vegetal foi macerado em 10 mL de ácido sulfosalicílico a 3% (p/v). O extrato obtido foi então centrifugado a 20.000 x g a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e as amostras foram congeladas para a dosagem dos teores de aminoácidos solúveis totais.

Os teores de aminoácidos solúveis totais foram determinados utilizando-se 2,0 mL das amostras , 2,0 mL de ninidrina ácida e 2,0 mL de ácido acético .

A leitura das absorbâncias foi realizada no comprimento de onda de 520 nm. As concentrações de aminoácidos foram determinadas por meio de curva padrão de prolina.

4.2.2.3 Extração e dosagem de açúcares solúveis totais

Para a quantificação dos açúcares solúveis totais utilizou-se o método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) sendo utilizados 500 mg de material vegetal fresco do quarto par de folhas totalmente expandidas, na forma de discos foliares de 0,7854 cm². Para a dosagem dos teores de açúcares solúveis totais foram utilizados 10 µL das amostras as quais foram transferidas para tubos de ensaio aos quais foram adicionados 490 µL de água destilada, 500 µL de fenol a 5% (p/v) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. As leituras de absorbância foram realizadas no comprimento de onda de 490 nm e as concentrações de açúcares determinadas por meio de curva padrão de glicose.

4.2.2.4 Extração e dosagem de açúcares redutores

Os teores de açúcares redutores foram determinados pelo método DNS (ácido dinitro salicílico) (MILLER, 1959) a partir de 500 mg de material vegetal fresco do quarto par de folhas totalmente expandidas, na forma de discos foliares de 0,7854 cm². Os discos foliares foram previamente lavados e secos, após este procedimento o material vegetal foi macerado em tampão fosfato 0,2 M pH 7,5. O extrato obtido foi então centrifugado a 20.000 x g a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e as amostras foram congeladas para a dosagem dos teores de açúcares redutores. Os teores de açúcares redutores foram determinados utilizando-se 1,0 mL das amostras, 500 µL de água destilada, 1,0 mL de DNS. Os tubos de ensaio contendo as amostras foram mantidos em banho-maria em ebulição durante 5 minutos. Após este procedimento as amostras foram resfriadas em banho de gelo e o volume foi ajustado para 10 mL com água destilada.

A leitura das absorvâncias foi realizada no comprimento de onda de 540 nm. As concentrações de açúcares foram determinadas por meio de curva padrão de glicose.

4.2.2.5 Determinação de clorofilas e carotenóides

A determinação de pigmentos foi realizada a partir do método colorimétrico descrito por LICHTENTHALER (1987). Foram utilizadas duas amostras para as repetições de cada tratamentos, as quais foram lidas em espectrofotômetro, determinando-se a absorvância nos comprimentos de onda de 470 nm para carotenóides, 645 e 662 nm para a leitura de clorofilas.

A extração dos pigmentos foi realizada na ausência de luz utilizando 10 discos foliares (500 mg de massa fresca), cada disco com área correspondente a 0,7854 cm², a maceração foi realizada com auxílio de graal e pistilo sobre gelo com acetona 100% e gelada. Em seguida o extrato foi filtrado diretamente em balão

volumétrico de 50 mL, devidamente coberto com papel alumínio, adicionando-se acetona até completar o volume do balão volumétrico.

Os cálculos utilizados para a quantificação de pigmentos foram os seguintes:

$$\text{Clorofila } a = 11,24.A_{662} - 2,04.A_{645}$$

$$\text{Clorofila } b = 20,13.A_{645} - 4,19.A_{662}$$

$$\text{Clorofila } a + b = 7,05.A_{662} + 18,09.A_{645}$$

$$\text{Carotenóides} = [(1000.A_{470} - 1,9Ca - 63,14Cb)/214]$$

Onde *Ca* representa a concentração de clorofila *a*, e *Cb* representa a concentração de clorofila *b*.

4.2.3 Análise estatística

As análises de variâncias foram realizadas utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT versão 7.4 beta (SILVA e AZEVEDO, 2006). As variâncias dos tratamentos foram testadas quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Análise anatômica

Nas condições em que este experimento foi conduzido, foi possível observar a presença de tricomas glandulares e não glandulares (tectores), porém sem a diferenciação de células especializadas em acúmulo de óleo nas folhas de patchouli (Figura 3).

Os óleos voláteis de plantas aromáticas são sintetizados, armazenados e liberados para o ambiente por meio de estruturas presentes na epiderme ou no mesofilo, as quais possuem características relacionadas a grupos taxionômicos

(SANGWAN et al., 2001). Estudos anatômicos demonstram a presença de glândulas e reservatórios no espaço subcuticular foliar em Lamiaceae (GERSHENZON et al., 2000). Em *Pogostemon cablin* estão presentes dois tipos de tricomas, tectores, em maior quantidade, e tricomas glandulares presentes em menor quantidade. A concentração de tricomas nas folhas pode aumentar em até 10 vezes quando comparado a ramos e pecíolos, podendo haver também células internas especializadas em acumular óleo (HENDERSON et al., 1970).

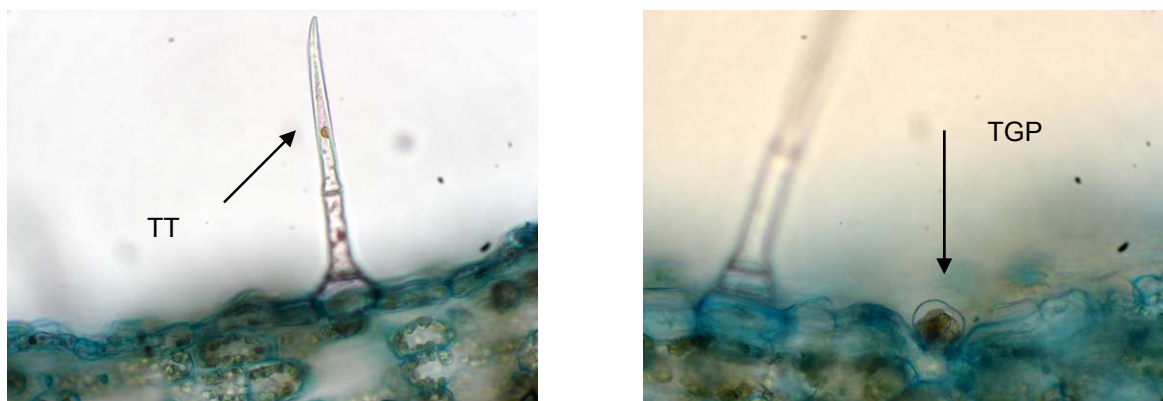


FIGURA 3- Tricoma não glandular (tector) multicelular (TT) e tricoma glandular peltado (TGP), aumento de 40X, em folhas de *Pogostemon cablin*.

Devido à técnica de corte utilizada, não foi possível observar diferenças anatômicas (forma e tamanho) das células nos diferentes tratamentos com reguladores vegetais. Entretanto, houve diferença no número e padrão de distribuição das células do parênquima lacunoso nos diferentes níveis de sombreamento.

Em folhas não submetidas a sombreamento (Figura 4), observou-se maior número de células dispostas no parênquima lacunoso. Nos tratamentos submetidos à condição de sombreamento (Figura 5), o parênquima lacunoso apresentou menor número de células com maior distância entre si. Embora não tenha sido possível observar as diferenças de tamanho e formato das células tratadas com GA_3 nos diferentes níveis de sombreamento, a maior distância entre as células do parênquima lacunoso pode estar relacionada com a maior produtividade de óleo essencial nas plantas submetidas a níveis de sombreamento e aplicação de GA_3 (Capítulo II), considerando-se que este padrão de distribuição das células facilitaria a extração do óleo essencial do tecido foliar durante o processo de hidrodestilação.

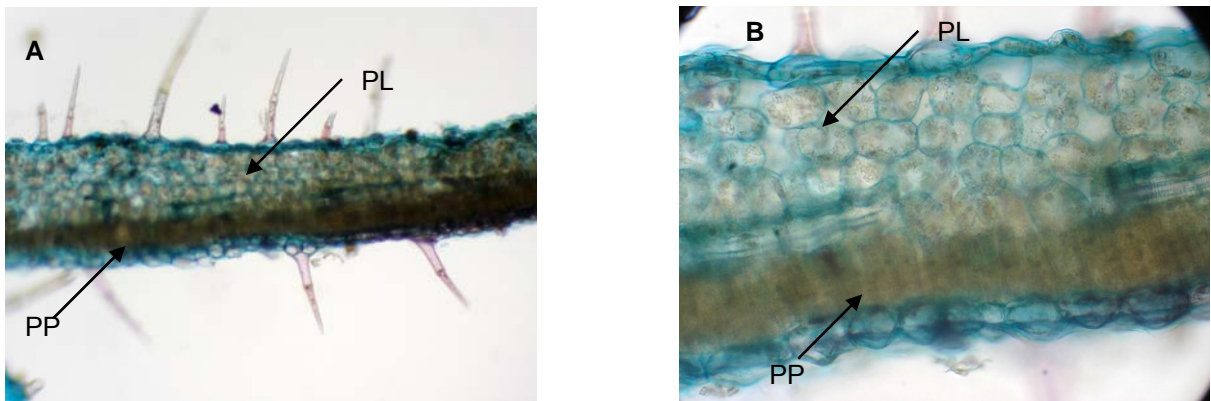


FIGURA 4 - Corte transversal de tecidos foliares de *Pogostemon cablin* desenvolvidas em ambiente não sombreado (A), aumento de 10X e (B) de 40X, no detalhe parênquima paliçadico (PP) e parênquima lacunoso (PL).

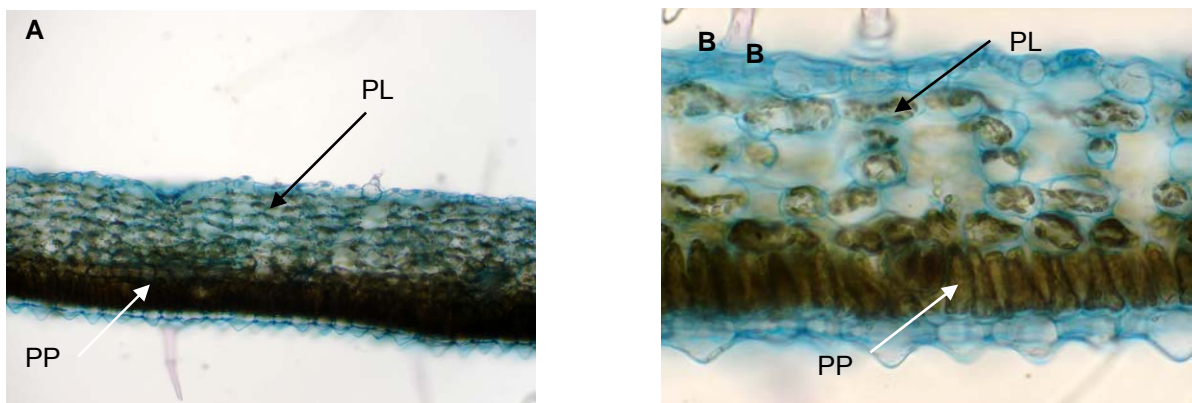


FIGURA 5 - Corte transversal de tecidos foliares de *Pogostemon cablin* submetidos a 54% de sombreamento (A), aumento de 10X e (B) de 40X, no detalhe parênquima paliçadico (PP) e parênquima lacunoso (PL).

4.3.2 Análises Bioquímicas

4.3.2.1 Teores de proteínas solúveis totais

Houve interação significativa entre os níveis de sombreamento e GA_3 nos teores de proteínas solúveis totais. Quando o regulador vegetal não foi aplicado, foi possível observar o efeito do fator sombreamento, onde o tratamento não

sombreado foi superior aos demais. Após aplicação do regulador vegetal, observou-se teores mais elevados de proteínas solúveis totais em plantas submetidas à maior condição de sombreamento, aproximadamente 49% superior em relação ao tratamento não sombreado (Tabela 10).

A maior concentração de proteínas solúveis totais em plantas não sombreadas sem aplicação de regulador vegetal pode estar relacionada à maior atividade da rubisco, quando comparada às folhas mantidas em tratamentos sombreados. Mostafa et al. (2005) observou que a aplicação de GA₃ em *Hibiscus sabdariffa* L. resulta em aumento nos teores de proteínas e açúcares solúveis. Os altos teores de proteínas encontrados em plantas tratadas com reguladores vegetais podem estar relacionados à ativação de vários mecanismos internos relacionados ao crescimento da planta e ao seu metabolismo (BORA e SHARMA, 2006).

TABELA 10 – Concentração de proteínas solúveis totais ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ massa fresca), em tecidos foliares de *Pogostemon cablin* aos 120 dias sob diferentes níveis de sombreamento e aplicação de $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃. Curitiba-PR, 2007.

Proteínas	Sombreamento (%)		
	0	56	77
Sem GA ₃	0,0381 Aa	0,0283 Bb	0,0270 Bb
Com GA ₃	0,0241 Ca	0,0391 Ba	0,0492 Aa

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.2.2 Teores de aminoácidos totais

Os resultados obtidos demonstraram que houve interação significativa entre os fatores sombreamento e regulador vegetal, onde o tratamento não sombreado e submetido à aplicação de GA₃ apresentou os maiores teores de aminoácidos totais seguido do tratamento não sombreado sem aplicação do regulador vegetal.

De forma semelhante aos teores de proteínas solúveis totais, as concentrações de aminoácidos totais também foram superiores em tratamentos sem sombreamento independente da aplicação do regulador vegetal. A aplicação de regulador vegetal resultou em teores de aminoácidos superiores em plantas

desenvolvidas em ambientes não sombreados e com 77% de sombreamento (Tabela 11).

TABELA 11 - Concentração de aminoácidos ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em *Pogostemon cablin* aos 120 dias, em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{GA}_3$. Curitiba-PR, 2007.

Aminoácidos	Sombreamento (%)		
	0	54	77
Sem GA_3	0,0004 Ab	0,0003 Ba	0,0002 Cb
Com GA_3	0,0005 Aa	0,0001 Cb	0,0003 Ba

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.2.3 Teores de açúcares solúveis totais

Em relação aos teores de açúcares solúveis totais, plantas mantidas em ambiente não sombreado apresentaram os maiores teores, havendo decréscimo com aumento do sombreamento. Entretanto, após aplicação de GA_3 , os maiores teores foram encontrados com 77% de sombreamento e estes decresceram com a diminuição do nível de sombreamento ao qual foram expostos (Tabela 12). Estes resultados concordam com Carvalho et al. (2006) que observou a queda dos teores de açúcares solúveis totais em plantas de *Artemisia decorrente* da diminuição da radiação. Por outro lado, De la Barrera e Nobel (2004) observaram em frutos de *Opuntia ficus-indica*, L. (Miller) que não houve acréscimo de açúcares solúveis totais em plantas tratadas com GA_3 durante todo seu desenvolvimento, logo os resultados obtidos com plantas de patchouli não concordam com estes autores.

TABELA 12 - Concentração de açúcares solúveis totais ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em *Pogostemon cablin*, aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento, com e sem aplicação de $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{GA}_3$. Curitiba-PR, 2007.

Açúcares solúveis totais	Sombreamento (%)		
	0	54	77
Sem GA_3	0,6296 Aa	0,5440 Ba	0,5184 Bb
Com GA_3	0,4449 Cb	0,5503 Ba	0,6656 Aa

*Médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.2.4 Teores de açúcares redutores

Os teores de açúcares redutores foram superiores em plantas tratadas com GA₃ quando desenvolvidas sob condições de sombreamento. Nos tratamentos não sombreados, não houve efeito da aplicação deste regulador vegetal. (Tabela 13). Os menores níveis de açúcares redutores encontrados sob condições de sombreamento aonde o regulador não foi aplicado podem estar relacionados à diminuição da atividade fotossintética das plantas em ambientes sombreados. O aumento dos teores após a aplicação de GA₃, sugere que em ambientes sombreados este regulador ativa o metabolismo das plantas tendo em vista que esta é a forma de açúcar prontamente disponível para ser usado em processos metabólicos. Os resultados semelhantes obtidos para os teores de proteínas e açúcares totais reforçam esta possibilidade.

TABELA 13 - Concentração de açúcares redutores ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em *Pogostemon cablin*, aos 120 dias em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃. Curitiba-PR, 2007.

Açúcares Redutores	Sombreamento (%)		
	0	54	77
Sem GA ₃	0,0036 Aa	0,0012 Bb	0,0014Bb
Com GA ₃	0,0036 Ca	0,0072 Aa	0,0052 Ba

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.2.5 Teores de pigmentos

Não houve interação significativa para os teores de clorofila *a*, *b* e total em função dos níveis de sombreamento e aplicação do regulador vegetal (Tabelas 14). Os teores de clorofila *a* e total foram influenciados apenas pelo nível de sombreamento sendo estes superiores em condições sombreadas. Por outro lado,

os teores de clorofila *b* foram influenciados de forma isolada pelos níveis de sombreamento e aplicação de GA₃. Pode-se observar que o sombreamento promoveu os maiores teores destes pigmentos e que a aplicação do regulador vegetal resultou no decréscimo dos teores de clorofila *b* (Tabela 15). Segundo Zanella et al. 2006, plantas de *Passiflora edulis* (maracujá amarelo) tendem a responder ao aumento dos níveis de sombreamento com o aumento dos teores de clorofilas totais, conforme foi observado em *Pogostemon cablin*. O fato de plantas mantidas em tratamentos mais sombreados apresentarem maiores teores de clorofilas está relacionado a um efeito compensatório da espécie a menor quantidade de radiação disponível (ALMEIDA, 2004). Em relação a aplicação do regulador vegetal, os resultados deste trabalho podem estar relacionados com os obtidos por Bora e Sharma (2006), que ao aplicarem GA₃ em concentrações de 10 a 100 mg.L⁻¹ em plantas de *Pisum sativum* L. observaram que as concentrações de clorofilas tendem a diminuir quanto maior for a concentração de giberelina aplicada, e que o aumento do volume da célula em decorrência da aplicação da giberelina não está correlacionada ao aumento da síntese de clorofilas.

TABELA 14 - Concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em *Pogostemon cablin* aos 120 dias, em diferentes níveis de sombreamento. Curitiba-PR, 2007.

	Sombreamento (%)		
	0	54	77
Clorofila <i>a</i>	0,1531 C	0,2882 B	0,4094 A
Clorofila <i>b</i>	0,1170 C	0,1657 B	0,1970 A
Clorofila total	0,2659 C	0,4507 B	0,6115 A

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 15 - Concentração clorofila *b* ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em *Pogostemon cablin* aos 120 dias, com e sem aplicação de 200 mg.L⁻¹ GA₃. Curitiba-PR, 2007.

	Sem GA ₃	Com GA ₃
Clorofila <i>b</i>	0.1741 A	0.1457 B

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Independentemente da aplicação do regulador vegetal, houve acréscimo nos teores de carotenóides em função dos níveis de sombreamento. Plantas tratadas com GA₃ apresentaram por sua vez redução significativa nos teores de carotenóides em ambiente não sombreado e com 54% de sombreamento (Tabela 16).

TABELA 16 - Concentração carotenóides ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ massa fresca) em *Pogostemon cablin* aos 120 dias, em diferentes níveis de sombreamento e aplicação de 200 mg.L⁻¹ GA₃, Curitiba-PR, 2007.

Carotenóides	Sombreamento (%)		
	0	54	77
Sem GA ₃	0,0627 Ca	0,1642 Aa	0,0971 Ba
Com GA ₃	0,0356 Cb	0,0716 Bb	0,1080 Aa

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Folhas de sombra possuem mais clorofilas por centro de reação e uma relação clorofila *b*/ clorofila *a* mais alta quando comparadas a folhas de ambientes ensolarados (LAMBERS, 1998). Desta forma, os resultados obtidos nas plantas de *Pogostemon cablin* não seguiram padrões semelhantes com os relatos da literatura onde a relação clorofila *b*/ clorofila *a* diminui de acordo com o nível de sombreamento (Tabela 17). A diminuição desta relação pode ser explicada pelo fato de que houve aumento das concentrações de clorofila *b* nas folhas mantidas em ambiente sombreado, entretanto, o aumento dos teores de clorofila *a* nos mesmos níveis de sombreamento foi proporcionalmente maior em relação ao aumento dos níveis de clorofila *b* (aproximadamente duas vezes superior em condições de 77% de sombreamento). Normalmente, as plantas competem pela radiação solar, folhas sombreadas por outras folhas possuem baixas taxas fotossintéticas, e maior concentração de clorofilas *b* capazes de absorver comprimentos de onda menores (LAMBERS, 1998). O maior acúmulo de moléculas de clorofilas em ambientes sombreados pode ser decorrente de um efeito compensatório da espécie a menor quantidade de radiação disponível (ALMEIDA et al., 2004). Deste modo, os resultados obtidos sugerem que houve aclimatização da espécie a condição de sombreamento.

TABELA 17 - Relação clorofila *b* / clorofila *a* ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}$ massa fresca) em *Pogostemon cablin* aos 120 dias e aplicação de $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{GA}_3$. Curitiba-PR, 2007.

Relação Cb/Ca	Sombreamento (%)		
	0	54	77
Sem GA3	0,7674 Ab	0,5775 Ba	0,5375 Ba
Com GA3	0,9130 Aa	0,5338 Ba	0,4198 Cb

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.4 CONCLUSÕES

O sombreamento resulta em alterações anatômicas no tecido lacunoso em plantas de *Pogostemon cablin*.

Os maiores teores de proteínas, açúcares solúveis totais e açúcares redutores são encontrados no menor nível de sombreamento. A aplicação de GA₃ faz com que essa relação seja inversa, onde o teor destes tende a decrescer com a diminuição do nível de sombreamento.

O sombreamento promove aumento nas concentrações de clorofilas e carotenóides, e a aplicação de GA₃ promove a redução nas concentrações de clorofila *b* e carotenóides em ambientes não sombreados e em 54% de sombreamento.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, L. P.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; ZANELA, S. M.; VIERIA, C. V. Crescimento inicial de plantas de *Cryptocaria aschersoniana* Mez. submetidas a níveis de radiação solar. **Ciência Rural**, v.34, n.1, , 2004.
2. ATROCH, E. M. A. C.; SOARES, A. M.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forficata* Link submetidas à diferentes condições de sombreamento. **Ciência Agrotecnologia**, v.25, n.4, p.853-862, 2001.
3. BATES, L.S.; WALDERN, R.P.; TEARE, I.D.; Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, The Hague, v.39. p.205- 207, 1973.
4. BORA, R. R.; SHARMA, C. M. Effect of gibberellic acid and cycocel on growth, yield and protein content of pea. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 2, p. 324-330, 2006.
5. BOSABALIDIS, A. M.; EXARCHOU, F. Effect of NAA and GA₃ on leaves and Glandular trichomes of *Origanum x Intercedens* Rech.: Morphological and anatomical features. **International Journal of Plant Sciences**, v. 156, n. 4, p. 488-495, 1995.
6. BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

7. CARVALHO, L. M.; CASALI, V. W. D.; LISBOA, S. P.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R. Crescimento e metabolismo em artemísia em função do nível de irradiância. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 3, 2006.
8. COSTA, L. C. B.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; ALVES, E.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSAL, L. F.; MOREIRA, C. M. Aspectos da anatomia foliar de *Ocimum selloi* Benth.. (Lamiaceae) em diferentes condições de qualidade de luz. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1, p. 6-8, 2007.
9. COZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. **Biosynthesis of Hormones and Elicitor Molecules**. In: BUCHANAN, B. GRUISSSEN, W.; JONES, R. E. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, 2000.
10. DIAS-FILHO, M. B. Physiological response of *Solanum crinitum* Lam. To contrasting light environments. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p 789-796, 1997.
11. DE LA BARRERA, E.; NOBEL, P. S. Carbon and water relations for developing fruits of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller, including effects of drought and gibberellic acid. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n.397, p 719-729, 2004.
12. DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, p.350-356, 1956.
13. GERSHENZON, J.; McCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiology**, v. 122, p. 205-213, 2000.

14. HENDERSON, W.; JAMES, W. H.; HOW, P.; JUDGE, J. Chemical and morphological studies on sites of sesquiterpene accumulation in *Pogostemon cablin* (Patchouli). **Phytochemistry**, v. 9, p. 1219-1228, 1970.
15. JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York, Mac Graw-Hill Book Co, 1940, 523p.
16. LAMBRES, H. CHAPIN, F. S.; PONS, T. L. **Plant Physiological Ecology**. USA: Springer, 1998.
17. LEE, D. W. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian Hopea (Dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 4, p. 447 – 455, 2000.
18. LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press Inc., v 148, p. 350-382, 1987.
19. LIMA JR, E. C.; ALVARENGA, A. A; CASTRO, E. M.; VIEIRAS, C. V.; BARBOSA, J. P. R. A. D. Aspectos fisiológicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore** , v. 30, n.1, p, 33-41, 2006.
20. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 3, p 426-428, 1959.
21. MOSTAFA, H. A. M; HALA, M. S. EL-BASSIOUNY; HEMMAT, K. I. KHATTAB; MERVAT, S. SADAK. Improving the Characteristics of roselle seeds as a new source of protein and lipid by gibberellin and benziladenine application. **Journal of Applied Sciences Research**, v.1, n.2, p.161-167, 2005.

22. NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, L. E. M.; CASTRO, E. M.; DELÚ, N. F.; MESQUITA, A. C.; VIEIRA, C. V. Alterações morfofisiológicas em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) consorciado com seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Ciência Rural**, v.36, n.3, , 2006.
23. ONO, E. O.; NAKAMURA, T.; MACHADO, S. R.; RODRIGUES, J. D. Application of brassinosteroid to *Tabebuia alba* (Bignoniaceae) plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, n.3, p. 187-194, 2000.
24. PYSTINA, N. V.; DANILOV, R. A. Influence of light regimes on respiration, activity of alternative respiratory pathway and carbohydrates content in matures leaves of *Ajuga reptans* L. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n. 3, p. 285-292, 2001.
25. REISSER JUNIOR, C.; BREGAMASCHI, H.; RADIN, B.; BERGONCI, J. I. Alterações morfológicas do tomateiro em resposta à redução de radiação solar em ambientes de estufa plástica. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 11, n. 1, p. 7-14, 2003.
26. SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. A new version of the assistat-statistical assistance software. In: World Congress on Computers in Agriculture, 4. Orlando-FL-USA: Anais: Orlando: **American Society of Agricultural Engineers**, p.393-396, 2006.
27. SUGIMURA, Y.; KADOTANI, N.; UEDA, Y.; SHIMA, K.; KITAJIMA, S.; FURUSAWA, O.; IKEGAMI, M. Transgenic patchouli plants produced by Agrobacterium-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 82, p.251–257, 2005.

28. SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SFIABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth regulation** v. 34, p. 3-21, 2001.
29. ZANELLA, F.; SONCELA, R.; LIMA, A. L. S. Formação de mudas de maracujazeiro amarelo sob níveis de sombreamento em Ji- Paraná/ RO. **Ciência Agrotecnologia**, v. 30, n. 5, p. 880-884, 2006.
30. ZHAO, Z.; LU, J.; LEUNG, K.; CHAN, C. L.; JIANG, Z. H. Determination of patchoulic alcohol in herba pogostemonis by GC-MS-MS. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 53, n.7, p. 856-860, 2005

5. CAPITULO IV - DESENVOLVIMENTO DE *Pogostemon cablin* Benth., RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL APÓS A APLICAÇÃO DE GA₃ E EXTRATO DE ALGA MARINHA COMO FONTE DE CITOCININAS.

RESUMO

Os vegetais produzem diversos compostos orgânicos, os quais não possuem participação direta em processos de crescimento e de desenvolvimento, tais substâncias são referidas como metabólitos secundários, estes conferem às plantas grande importância econômica, principalmente no que diz respeito à indústria alimentícia e farmacêutica. *Pogostemon cablin* é uma espécie aromática amplamente utilizada pela indústria de perfumes devido a sua fragrância amadeirada e sua capacidade de fixação à pele. Os fatores que influenciam a concentração de constituintes químicos do óleo essencial de plantas aromáticas devem ser avaliados, visando obter uma matéria prima de melhor qualidade. O presente trabalho foi realizado na Universidade Federal do Paraná. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado constituído por 6 tratamentos, compostos por 3 níveis de extrato de alga marinha (testemunha, 15 e 30 mg.L⁻¹) com e sem aplicação de GA₃ (200 mg.L⁻¹). A aplicação dos reguladores iniciou-se 30 dias após o plantio das mudas. Não houve diferença significativa para a altura das plantas, a concentração de extrato de alga marinha até 15 mg.L⁻¹ promoveu aumento de 9,4% no número de folhas em relação à testemunha e a concentração de 30 mg.L⁻¹ promoveu um decréscimo de 16,6%. Em relação à área foliar e ao número de folhas houve uma relação inversa para os níveis de extrato de alga marinha, onde o tratamento que recebeu a maior concentração do regulador teve aumento de 19% em relação à área foliar do tratamento testemunha. Por outro lado, o tratamento de menor concentração de extrato de alga marinha teve uma redução de 16,6% de área foliar em relação à testemunha. A produtividade do óleo essencial de patchouli também foi alterada pela aplicação de reguladores vegetais, onde houve um aumento de 60,6% na produtividade quando utilizado extrato de alga marinha 15 mg.L⁻¹ e de 58% quando utilizado somente GA₃. A utilização de 30 mg.L⁻¹ de extrato de alga marinha e extrato de alga marinha combinado a GA₃ tende a diminuir a produtividade do óleo essencial.

Palavras-chave: metabolismo secundário, reguladores vegetais, patchouli.

ABSTRACT

Plants produce various organic compounds, which do not participate directly in growth and development. These substances are referred as secondary metabolites, which confers to the plants a great economic importance, especially to the food and pharmaceutical industry. *Pogostemon cablin* is an aromatic species widely used by the perfume industry because of its fragrance and its ability to fix the perfume in the skin. The factors that influence the concentration of chemical constituents of the essential oil of aromatic plants must be analyzed in order to obtain a better quality raw material. The current work was carried out at Federal University of Paraná State. The experimental design was completely randomized with 6 treatments, including 3 levels of seaweed extract (0, 15, 30 mg.L⁻¹) in presence or absence of GA₃ (200 mg.L⁻¹). The plant growth regulators were applied at 30 days after planting. There was no treatment effect on plant height, but seaweed extract at concentration of 15 mg.L⁻¹ promoted increase of leaf number and decrease at the concentration of 30 mg.L⁻¹. Leaf area and leaf number presented an inverse relationship to the levels of seaweed extract, where the treatment that received the highest dose of the regulator resulted on increase of leaf area. The essential oil productivity of patchouli also was changed by the use of plant growth regulators. The use of 30 mg.L⁻¹ of seaweed extract and seaweed extract combined to GA₃ decrease the productivity of essential oil.

Key – words: Secondary metabolites, plant growth regulators, patchouli

5.1 INTRODUÇÃO

Os vegetais produzem diversos compostos orgânicos, os quais não possuem participação direta em processos de crescimento e de desenvolvimento, tais substâncias são referidas como metabólitos secundários, e possuem restrição a alguns grupos taxonômicos (CROTEAU, 2000), estes conferem às plantas grande importância econômica, principalmente no que diz respeito à indústria alimentícia e farmacêutica (PIMENTEL et al., 2006). *Pogostemon cablin* Benth. é uma erva de hábito perene que se adapta bem a ambientes semi-sombreados (EPAGRI, 2004). O óleo essencial produzido por esta espécie contribui em muitas atividades farmacológicas, sendo suas propriedades terapêuticas diretamente relacionadas à qualidade e a quantidade deste (HU et al., 2005).

Crouch e Van Staden (1993) relatam a utilização de algas marinhas e seus produtos durante muitos anos em práticas agrícolas. Porém, seus mecanismos de ação que promovem benefícios no desenvolvimento vegetal ainda não foram completamente elucidados. Sabe-se que estas possuem alguns hormônios vegetais em sua composição. Ergün et al. (2002), demonstrou a presença de ácido indol-3-acético (IAA), ácido giberélico (GA_3), ácido abscísico (ABA) e citocinina (zeatina) em algumas espécies de líquens. Zhang e Ervin (2004), por meio de testes de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) descreveram a presença de zeatina ribosídeo ($66 \mu\text{g.g}^{-1}$) e de isopentil adenina (iPA) ($4 \mu\text{g.g}^{-1}$) no extrato da alga parda *Ascophyllum nodosum*. Mooney e Van Staden (1986) e Crouch et al. (1992) citados por Munshaw (2006), também relataram a presença de citocininas no extrato de *Ascophyllum nodosum*.

As citocininas e as giberelinas são capazes de promover diversos efeitos fisiológicos nas plantas. Além de promover o aumento da altura das plantas as giberelinas atuam também em vários processos do desenvolvimento vegetal, tais como quebra de dormência em sementes, indução da floração entre outros. Dentre os fatores fisiológicos relacionados as citocininas estão a promoção da divisão celular em conjunto com auxinas e a inibição da senescência de órgãos das plantas, especialmente das folhas, sendo a zeatina a citocinina com maior ocorrência natural (COZIER et al., 2000).

Entretanto, o uso de reguladores vegetais pode alterar o comportamento de algumas plantas através da sua produtividade bem como do seu metabolismo secundário (SHUKLA e FAROOQUI, 1990).

Quando aplicadas exogenamente as citocininas podem promover o aumento da produção de óleos essenciais bem como alterações em sua composição (STOEVA e ILIEV, 1997). Shukla e Farooqi (1990), sugerem que a aplicação de giberilinas e citocininas podem otimizar o rendimento de óleos essenciais. Conforme observado em plantas de *Artemisia annua* L. a aplicação de GA₃ resultou em aumento da produção de artemisin e a aplicação de cinetina aumentou o rendimento do óleo essencial (FAROOQI et al., 1996).

Entretanto, Scavroni et al. (2006) relatam que quando aplicado GA₃ não há alteração no rendimento do óleo essencial de *Mentha x piperita*, por outro lado, a aplicação da citocinina 6-benzilaminopurina embora não tenha afetado o rendimento, alterou a composição do óleo essencial. El-Hady (2005) observou que em plantas de *Pimpinella anisum* L. a utilização de GA₃ em concentrações de 50 a 75 mg.L⁻¹ e de cinetina entre 25 e 50 mg.L⁻¹ aumentaram a porcentagem de anetol seu constituinte majoritário no óleo essencial.

Ao comparar o efeito da aplicação de 100 mg.L⁻¹ de citocinina, ácido 2-cloroetilfosfônico (ethephon) e GA₃ em *Ocimum basilicum* L. Barreiros et al. (2006), observou que a aplicação de cinetina promoveu maior taxa de crescimento absoluto, sugerindo que o tratamento com este regulador proporciona maior velocidade de crescimento das plantas de *Ocimum basilicum*.

Leite et al. (2003), observou em plantas de soja que a aplicação foliar de GA₃ resultou em maior altura de plantas bem como maior teor de massa seca, entretanto, não foi observado que a aplicação de GA₃ juntamente com citocinina tenha promovido efeito sobre o número de folhas e ramificações, embora a aplicação de citocinina tenha diminuído o efeito da giberelina.

Este experimento teve como objetivo avaliar o desenvolvimento vegetativo e o rendimento do óleo essencial de *Pogostemon cablin* quando submetido à aplicações de extrato de alga marinha *Ascophyllun nodosum* e de GA₃.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de casa-de-vegetação no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná durante os meses de agosto a novembro de 2007.

5.2.1 Material Vegetal

O material vegetal utilizado para a extração do óleo essencial constitui-se de plantas de *Pogostemon cablin* Benth. coletadas no município de Joinville–SC e mantidas em casa-de-vegetação.

5.2.2 Preparo das mudas

As mudas foram obtidas a partir de estacas com 6 cm de comprimento e um par de folhas reduzidas a metade. As estacas foram mantidas durante 60 dias em tubetes 50 cm³ contendo plantmax HT® em casa-de-vegetação com sistema de irrigação intermitente, com três turnos de rega, sendo de 15 segundos a cada 15 minutos das 08:00h às 17:00h, 15 segundos a cada hora das 17:00h às 23:00h e 15 segundos a cada 3 horas das 23:00h às 08:00h, para o enraizamento das estacas. Após este período as estacas que apresentaram desenvolvimento vegetativo satisfatório, bem como boas condições fitossanitárias foram selecionadas para o transplântio em vasos.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3 com 4 repetições, cada qual com 4 vasos (17cm de altura e 23 cm de diâmetro) e capacidade para aproximadamente 6 Kg de substrato. Para a implantação do experimento amostras do solo foram coletadas para análise química no Laboratório de Fertilidade do Departamento de Solos da UFPR (Tabela 18).

Para a correção do pH do solo, foi incorporado 4,2 toneladas/ha⁻¹ de calcário (100% PNRT) (RAIJ *et al.*, 1996). Ainda de acordo com estes autores foi incorporado 60 Kg /ha⁻¹ de N, 30Kg/ ha⁻¹ de P₂O₅ e 70 Kg/ ha⁻¹ de KO₂.

TABELA 18 - Características do solo utilizado no experimento. Curitiba-PR, 2007.

pH		Al ⁺³	H+Al ⁺³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	SB	T	P	S	C	V	m	Ca/Mg	Argila
CaCl ₂	SMP	cmol _c /dm ³							mg/dm ³		g/dm ³	%	%		g/kg
4,30	5,20	1,80	9,00	0,9	0,4	0,1	1,40	10,40	4,70	-	24,50	13	56	2,25	422,3

O material vegetal foi então submetido ao sombreamento de 54% utilizando-se Sombrite®, e a aplicação de Pro Gibb® 10% GA₃ (200 mg. L⁻¹) e extrato da alga marinha *Ascophyllun nodosum* (EAM) como fonte de citocinia 0,001% (15 e 30 mg.L⁻¹). A aplicação dos reguladores foi realizada com equipamento de pulverização pressurizado por CO₂ com vazão e pressão constante (50 Psi), 30 dias após a implantação do experimento.

Para determinar com maior precisão o nível de radiação, foram feitas medições utilizando-se o aparelho porômetro, modelo LICOR 1600, em dias ensolarados e nublados, conforme descrito na Tabela 2 do capítulo II.

O desenvolvimento vegetativo do material foi avaliado aos 75 dias após a implantação do experimento (45 dias após aplicação dos reguladores) a partir da determinação da área foliar, altura (cm), número de folhas e número de ramos.

A extração do óleo essencial de *Pogostemon cablin* foi realizada no Laboratório de Ecofisiologia do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná. Utilizou-se 30g tecido foliar com aproximadamente 20% de umidade para hidrodestilação durante 5 horas em aparelho graduado Clevenger e balão volumétrico de 2L, conforme testes preliminares realizados em laboratório com a mesma espécie.

5.2.3 Caracterização química

As amostras do óleo essencial de *Pogostemon cablin* foram analisadas por meio de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) no Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos, no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná. Utilizou-se cromatógrafo gasoso Varian, modelo CP 3800 com detector FID (CG_FID), coluna capilar Chrompack de sílica fundida CP-SIL 8 CB, 0.25mm de diâmetro interno, 30 m de

comprimento e 0,25 µm de filme líquido. Temperatura do injetor: 250 °C, split 1:300, Volume de amostra injetada: 1,0 µl. Gás de arraste: hélio 1mL/min constante. Gás de make up: ar sintético, nitrogênio e hidrogênio. Temperatura do detector FID: 300°C. Programação de temperatura do forno: temperatura inicial de 50°C, elevação de temperatura a 180°C na razão de 10°C permanecendo por 20 minutos; elevação de temperatura a 200°C na razão de 20°C permanecendo por 1 minuto. Tempo total da corrida: 35 minutos.

5.2.4 Análise estatística

As análises de variâncias foram realizadas utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT versão 7.4 beta (SILVA e AZEVEDO, 2006). As variâncias dos tratamentos foram testadas quanto à homogeneidade pelo teste de Bartlett e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Desenvolvimento vegetativo

Na avaliação do desenvolvimento vegetativo de *Pogostemon cablin* foi possível observar o efeito do GA₃, com o aumento da altura média das plantas (Tabela 19), Farooqui et al. (1993) obtiveram os mesmos resultados com plantas de *Artemisia pallens* Wall, testando as concentrações de 100, 150 e 200 mg.L⁻¹ observaram aumento da altura das plantas em todas as concentrações. Chaudry e Khan (2000) verificaram em *Cicer arietinum* L. que a aplicação de 20 mg.L⁻¹ de cinetina e cinetina combinada a GA₃ resulta em aumento significativo na altura das plantas a partir dos 45 de cultivo. Portanto, os resultados obtidos não concordam

com estes autores, pois não houve interação significativa entre os fatores extrato de alga marinha (EAM) e giberelina para as plantas de *Pogostemon cablin* aos 75 dias de cultivo (Tabela 20).

TABELA 19- Altura (cm) de *Pogostemon cablin* aos 75 dias após aplicação de 200 mg.L⁻¹GA₃. Curitiba-PR, 2007.

	Sem GA ₃	Com GA ₃
Altura (cm)	58,16 B	61,25 A

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Entretanto, a concentração de EAM até 15 mg.L⁻¹ promoveu aumento de aproximadamente 9,4% no número de folhas em relação à testemunha e a concentração de 30 mg.L⁻¹ promoveu um decréscimo de 16,6% (Tabela 20). Em relação à área foliar e ao número de folhas houve uma relação inversa para os níveis EAM, onde o tratamento que recebeu a maior concentração deste extrato teve aumento de 19% em relação à área foliar do tratamento testemunha. Por outro lado, o tratamento de menor concentração de EAM teve uma redução de 16,8% área foliar em relação à testemunha.

Após a aplicação da giberelina foi possível observar que quanto maior a concentração de extrato aplicado menor é o número de folhas, e a maior área foliar foi encontrada quando o GA₃ foi combinado a aplicação de 15 mg.L⁻¹ de EAM.

A variação do número de ramos apresentou um padrão semelhante ao número de folhas onde o tratamento com a concentração intermediária de EAM resultou em maior número (29% em relação à testemunha). Entretanto, a aplicação de giberelina combinada a 30 mg.L⁻¹ de EAM promoveu aumento de 30,75% em relação ao tratamento com somente 200 mg.L⁻¹ de GA₃ (Tabela 20).

TABELA 20 - Altura (cm), número de ramos, número de folhas e área foliar (cm²) de *Pogostemon cablin* aos 75 dias após aplicação de extrato de alga marinha e 200 mg.L⁻¹ GA₃. Curitiba-PR, 2007.

	Extrato de alga marinha (mg.L ⁻¹)		
	0	15	30
Altura (cm)			
Sem GA ₃	58,50 ns	58,00 ns	58,00 ns
Com GA ₃	63,75 ns	62,00 ns	58,00 ns
Número de ramos			
Sem GA ₃	4,08 Bb	5,77 Aa	4,37 Bb
Com GA ₃	4,93 Ba	5,33 Ba	7,12 Aa
Número de folhas			
Sem GA ₃	63,90 Bb	70,50 Aa	58,81 Ca
Com GA ₃	73,00 Aa	67,50 Bb	53,25 Cb
Área foliar (cm ²)			
Sem GA ₃	103,90 Ba	86,39 Cb	123,69 Aa
Com GA ₃	84,48 Bb	99,88 Aa	84,64 Bb

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para os teores de massa seca de folhas, foi possível observar que a aplicação de EAM em até 15 mg.L⁻¹ foi superior em relação ao tratamento com 30 mg.L⁻¹. Por outro lado, após a aplicação de GA₃ o tratamento com 15 mg.L⁻¹ de EAM foi o que promoveu os menores teores de massa seca foliar. Entretanto, a utilização de 15 mg.L⁻¹ EAM resultou em aumento de 21,30% nos teores de massa seca de ramos em relação a testemunha, após a aplicação de GA₃ combinada com EAM, não houve diferença significativa nos teores de massa seca de ramos (Tabela 21).

TABELA 21 - Massa seca de folhas e de ramos de *Pogostemon cablin* aos 75 dias após aplicação de extrato de alga marinha e 200 mg.L⁻¹GA₃. Curitiba-PR, 2007.

	Extrato de alga marinha (mg.L ⁻¹)		
	0	15	30
Massa seca de folhas			
Sem GA ₃	10,51 Aa	10,18 Aa	9,13 Bb
Com GA ₃	10,55 Aa	9,35 Bb	9,97 A ab
Massa seca de ramos			
Sem GA ₃	13,93 Bb	17,70 Aa	16,27 Ab
Com GA ₃	20,78 Aa	19,21 Aa	19,98 Aa

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Houve alteração no rendimento do óleo essencial em relação aos diferentes reguladores vegetais utilizados. Pode-se observar que a aplicação de EAM resulta em aumento do rendimento até a concentração de 15 mg.L⁻¹ (41,24% em relação testemunha) e a concentração de 30 mg.L⁻¹ diminui o rendimento do óleo essencial (Tabela 22). Logo este resultado concorda com Scavroni et al. (2006) que observou uma redução no rendimento do óleo essencial de *Mentha piperita* L. quando tratada com a citocinina BAP na concentração de 50 mg.L⁻¹. O maior rendimento de óleo essencial nas plantas submetidas a 15 mg.L⁻¹ de EAM e a 200 mg.L⁻¹ de GA₃, pode estar relacionado ao aumento do número de folhas e da massa seca foliar nesses tratamentos, sabendo-se que as estruturas de armazenamento de óleos nessa espécie estão presentes na folha (HENDERSON et al., 1970). Da mesma forma, o menor rendimento encontrado em plantas tratadas com GA₃ combinado a 30 mg.L⁻¹ pode estar relacionado ao aumento no número de ramos e a diminuição do número de folhas.

TABELA 22 - Rendimento do óleo essencial ($\mu\text{L. g}^{-1}$ de massa seca foliar) de *Pogostemon cablin* aos 75 dias após aplicação de extrato de alga marinha e 200 mg.L⁻¹GA₃. Curitiba-PR, 2007.

Rendimento óleo essencial	Extrato de alga marinha (mg. L ⁻¹)		
	0	15	30
Sem GA ₃	39,39 Cb	67,03 Aa	56,54 Ba
Com GA ₃	60,01 Aa	60,71 Aa	23,88 Bb

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

De forma semelhante ao rendimento, a produtividade do óleo essencial de patchouli também é alterada pela aplicação de reguladores vegetais, onde houve um aumento de 60,6% na produtividade quando utilizado 15 mg.L⁻¹ de EAM e de 58% quando utilizado somente GA₃. Farooqui et al. (1993), observou que quando aplicada as concentrações de 100, 150 e 200 mg.L⁻¹ de GA₃ em plantas de *Artemisia pallens* Wall, somente o tratamento com a maior concentração é superior na produtividade do óleo essencial quando comparada ao tratamento testemunha. Entretanto, a utilização de 30 mg.L⁻¹ de EAM e EAM combinado a GA₃ tende a diminuir a produtividade (Tabela 23).

TABELA 23 - Produtividade ($L \cdot ha^{-1}$) de óleos essenciais em *Pogostemon cablin* aos 75 dias após aplicação de extrato de alga marinha e $200 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ GA_3 . Curitiba-Pr, 2007.

Produtividade óleo essencial	Extrato de alga marinha ($\text{mg} \cdot L^{-1}$)		
	0	15	30
Sem GA_3	4,23 Cb	10,73 Aa	8,00 Ba
Com GA_3	10,04 Aa	9,17 Bb	8,62 Cb

As médias com mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A composição do óleo essencial de patchouli foi influenciada tanto pela concentração quanto pela fonte de regulador vegetal utilizada (Tabela 24). De um modo geral todos os reguladores utilizados parecem contribuir para o aumento do constituinte majoritário patchoulol. A influência da aplicação de reguladores vegetais na composição do óleo essencial tem sido observada em outras espécies aromáticas. Em *Artemisia annua* L. a aplicação de GA_3 resulta em aumento dos teores de artemisin (FAROOQI et al., 1996), aplicação da citocinina 6-benzilaminopurina altera a composição do óleo essencial de *Mentha x piperita* (SCAVRONI et al., 2006). Logo as alterações na composição do óleo essencial de patchouli frente aplicação de reguladores vegetais estão de acordo com a literatura pesquisada.

TABELA 24- Composição do óleo essencial de *Pogostemon cablin* após 75 dias de cultivo, com aplicação de GA₃ e extrato de alga marinha e 200 mg.L⁻¹ GA₃.

Composto (%)	Regulador Vegetal (mg.L ⁻¹)						
	GA ₃	0	200	200	200	0	0
	EAM	0	0	15	30	15	30
Beta patchouleno		1,47	1,18	1,28	1,23	1,19	1,13
Cariofileno		3,6	3,23	3,47	3,39	3,12	3,18
Alfa guaieno		9,33	8,13	8,84	8,86	7,76	7,74
Gama patchouleno		6,61	5,68	6,20	6,00	5,33	5,45
Alfa patchouleno		4,06	3,49	3,76	3,64	3,23	3,31
Seicheleno		1,65	1,42	1,53	1,53	1,37	1,38
Beta guaieno		1,06	0,93	1,02	0,89	0,8	0,92
Alfa selineno		2,03	1,8	1,93	1,90	1,66	1,72
Alfa bulneseno		13,07	11,86	12,80	12,41	10,97	11,29
Nor patchoulenol		1,06	1,19	1,10	1,15	1,28	1,19
Pogostol		2,61	3,00	2,96	3,09	3,3	3,25
Patchoulol		42,4	46,2	44,75	47,07	48,58	48,06

5.4 CONCLUSÕES

A utilização de extrato de alga marinha combinado a giberelina não altera a altura das plantas, entretanto, promove diferenças no número de ramos, número de folhas e área foliar.

A aplicação de reguladores vegetais altera a biossíntese de óleos essenciais em *Pogostemon cablin*.

A aplicação de extrato de alga marinha na concentração de 15 mg.L⁻¹ resulta em maior rendimento de óleo essencial. O qual também pode ser obtido com aplicação de 200 mg.L⁻¹ de GA₃. Entretanto, a utilização de 30 mg.L⁻¹ de extrato de alga marinha e extrato de alga marinha combinado a GA₃ diminui a produtividade do óleo essencial, deste modo, os dois reguladores não devem ser utilizados simultaneamente.

A aplicação foliar de extrato de alga marinha e giberelina alteram a composição do óleo essencial de *Pogostemon cablin*.

REFERÊNCIAS

1. BAREIRO, A. P.; ZUCARELI, V.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Análise de crescimento de plantas de manjeriço tratadas com reguladores vegetais. **Bragantia**, v.65, n.4, p.563-567,2006.
2. CHAUDHRY, N. Y.; KHAN, A. S. Effect of growth hormones i.e., GA₃, IAA and kinetin on 1. Length and diameter of shoot, 2. Early Initiation of cambium and maturation of metaxylem elements in *Cicer arietinum* L. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 11, p. 1263-1266, 2000.
3. COZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. **Biosynthesis of Hormones and Elicitor Molecules**. In: BUCHANAN, B. GRUISSEN, W.; JONES, R. E. Biochemistry & Molecular Biology of Plants, 2000.
4. CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. In: BUCHANAN, B. GRUISSEN, W.; JONES, R. E. Biochemistry & Molecular Biology of Plants, 2000.
5. CROUCH, I. J.; VAN STADEN, J. Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. **Journal of plant growth regulation**, v. 13, n. 1, p. 21-29, 1993.
6. EL-HADY, S. Enhancement of the chemical composition and the yield of anise seed (*Pimpinella anisum* L.) oils and fruits by growth regulators. **Annals of Agricultural Science**, v. 50, n. 1, p. 15-29, 2005.

7. EPAGRI. **Normas técnicas para cultivo de capim-limão, citronela, palma-rosa e patchuli. Florianópolis**, 2004. 58p. (Epagri. Sistemas de Produção, 37).
8. ERGÜN, N.; TOPCUOGLU, F.; YILDIZ, A. Auxin (indole-3-acetic acid), gibberellic acid (GA₃), abscisic acid (ABA) and cytokinin (zeatin) production by some species of mosses and lichens. **Turk Journal Botany** , v.26, p. 13-18, 2002.
9. FAROOQI, A.A.; DEVIAH, K.A; VASUNDRA, M. Effect of some growth regulators and pinching on growth, yield and essential oil content of davana (*Artemisia pallens* Wall.) **Indian Perfumer**, v.37, p.19-23, 1993.
10. FAROOQI, A. H.; SHUKLA, A.; KHAN, A. Effect of plant age and GA₃ on artemisinin and essential oil yield in *Artemisia annua* L. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants** , v. 4, n. 1,p. 73-80, 1996.
11. HENDERSON, W.; JAMES, W. H.; HOW, P.; JUDGE, J. Chemical and morphological studies on sites of sesquiterpene accumulation in *Pogostemon cablin* (Patchouli). **Phytochemistry**, v. 9, p. 1219-1228, 1970.
12. HU L.F.; LI, S.P.; CAO, H.; LIU, J.J.; GAO J.L .; YANG, F.Q.; WANG, Y.T. GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. p. 1-7, 2005.
13. LEITE, V. M.; ROSOLEMI, C. A.; RODRIGUES, J. D. Gibberellin and cytokinin effects on soybean growth. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 3, p.537-541, 2003.
14. MUNSHAW, G. C.; ERVIN, E. H.; SHANG, C.; ASKEW, S. D.; ZHANG, X.; LEMUS, R. W. Influence of late-season iron, nitrogen, and seaweed extract

- on fall color retention and cold tolerance of four bermudagrass cultivars. **Crop Science** , v. 46, p. 273-283, 2006.
15. PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; *et al.* A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, v. 29, n. 2 , p. 373-375, 2006.
16. RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Instituto Agronômico e Fundação IAC, Campinas, p 285, 1996.
17. SCAVRONI, J.; VASCONCELLOS, M. C.; VALMORBIDA, J.; FERRI, A. F.; MARQUES, M. O. M.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J. D. Rendimento e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* L. submetida a aplicações de giberilina e citocinina. **Revista Brasileira de Horticultura**, v. 8, n.4, p. 40-43 , 2006.
18. SHUKLA, A.; FAROOQI, A. H. A. E. Review article: Utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. Current Research **Medicinal & Aromatic Plants**, v 12, n 3, p 152-157, 1990.
19. SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. A new version of the assistat-statistical assistance software. In: World Congress on Computers in Agriculture, 4. Orlando-FL-USA: Anais: Orlando: **American Society of Agricultural Engineers**, p.393-396, 2006.
20. STOEVA, T.; ILIEV, L. Influence of some phenylurea cytokinins on spearmint essential oil composition. **Bulgaria Journal Plant Physiology**, v.23 n.3, p. 66–71, 1997.
21. ZHANG, X.; ERVIN, E. H. Cytokinin containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping. **Crop Science** , v.44, p.1-10, 2004.

6. CAPÍTULO V - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho avaliou-se a resposta de *Pogostemon cablin* Benth. a níveis de sombreamento e à aplicação de reguladores vegetais, buscando um melhor desenvolvimento vegetativo da espécie e como consequência uma maior produtividade de óleo essencial. A necessidade deste estudo surgiu em função da falta de informações sobre o cultivo desta espécie na região, sabendo-se que esta produz um óleo essencial amplamente utilizado pelas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e principalmente de perfumarias.

Foi possível avaliar a influência do nível de sombreamento sobre o desenvolvimento das plantas, e que estas se desenvolvem melhor em ambientes sombreados com base nos resultados de desenvolvimento vegetativo. A aplicação de giberelina também se mostrou eficiente no desenvolvimento vegetativo das plantas bem como no rendimento e produtividade do óleo essencial. Além disso, a aplicação de GA₃ promoveu alterações bioquímicas e anatômicas nas plantas, que de um modo geral parecem contribuir para a maior produtividade de óleo essencial nesta espécie. Logo a aplicação deste regulador juntamente com a limitação da radiação é recomendada.

Por outro lado, a aplicação de extrato de alga marinha também promove alterações no desenvolvimento vegetativo, rendimento e produtividade do óleo essencial, mas, na concentração de 30 mg. L⁻¹ esta diminui tanto o rendimento quanto a produtividade deste, especialmente quando combinada a GA₃. Sugerindo que para obterem-se maiores níveis de óleo essenciais os dois reguladores não devem ser utilizados em conjunto nesta concentração.

Os resultados obtidos indicam que os níveis de sombreamento e utilização de reguladores devem ser considerados para se obter maior produção de óleo essencial do patchouli. Com base nos resultados observados em casa-de-vegetação que demonstraram a boa adaptação do patchouli a ambientes sombreados, espera-se que quando submetida à condição de campo a espécie possa ser cultivada em consórcio, o que resulta em melhor aproveitamento da área cultivada pelo produtor.

Em relação à fonte do regulador vegetal, quando a planta é submetida a condições de sombreamento, pode-se optar tanto por GA₃ 200 mg.L⁻¹ tanto por extrato de alga marinha 15 mg.L⁻¹ tendo em vista que os dois reguladores vegetais, nestas concentrações, apresentaram rendimento de óleo essencial iguais.

Este estudo ainda não é conclusivo no que se refere a melhor concentração de regulador vegetal a ser usada, porém representa o início de um estudo que busca encontrar reguladores vegetais e suas respectivas concentrações que possam ser aplicados a fim de se obter um maior rendimento e uma melhor qualidade do óleo essencial de *Pogostemon cablin*. Espera-se também que este estudo não seja restrito a esta espécie, mas que a partir dos resultados apresentados, estes possam ser aplicados a outras espécies aromáticas.

ANEXOS

Anexo 1 - Análise de variância da altura média das plantas aos 30 dias do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	49.04517	24.52258	8.4396**
Fator 2 (F2)	1	1.06408	1.06408	0,3662 ns
Interação F1 X F2	2	2.62517	1.31258	0,4517 ns
Resíduo	24	69.73600	2.90567	
Total	29	122.47042		
Coeficiente de Variação				
%	18,85			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 2 - Análise de variância da altura média das plantas aos 75 dias do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	366.79017	183.39508	82.7066**
Fator 2 (F2)	1	73.16408	73.16408	32.9952**
Interação F1 X F2	2	0.070017	0.35008	0.1579 ns
Resíduo	24	53.21800	2.21742	
Total	29	493.87242		
Coeficiente de Variação %				
	5.76			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 3 - Análise de variância da altura média das plantas aos 120 dias do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	1418.46017	709.23008	71.4800**
Fator 2 (F2)	1	297.99008	297.99008	30.0330**
Interação F1 X F2	2	282.81817	141.40908	14.2520**
Resíduo	24	238.13000	9.92208	
Total	29	2237.39842		
Coeficiente de Variação %				
	6.14			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 4- Análise de variância do número de folhas das plantas aos 30 dias do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	20.23467	10.11733	2.1324 ns
Fator 2 (F2)	1	0.83333	0.83333	0.1756 ns
Interação F1 X F2	2	0.07467	0.03733	0.0079*
Resíduo	24	113.87200	4.74467	
Total	29	135.01467		
Coeficiente de Variação				
%	16.07			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 5- Análise de variância do número de folhas das plantas aos 75 dias do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	3925.15467	1962.57733	108.0040**
Fator 2 (F2)	1	1254.53333	1254.53333	69.0391**
Interação F1 X F2	2	873.37867	436.68933	24.0318**
Resíduo	24	436.11200	18.17133	
Total	29	6489.17867		
Coeficiente de Variação				
%	10.68			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 6- Análise de variância do número de folhas das plantas aos 120 dias do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	3201.93067	1600.96533	49.5180**
Fator 2 (F2)	1	1306.80000	1306.80000	40.4194**
Interação F1 X F2	2	10.46400	5.23200	0.01618 ns
Resíduo	24	775.94400	32.33100	
Total	29	5295.13867		
Coeficiente de Variação				
%	9.85			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 7 - Análise de variância do número de ramos das plantas aos 30 dias do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	0.43467	0.2733	3.2600 ns
Fator 2 (F2)	1	0.00133	0.00133	0.0200 ns
Interação F1 X F2	2	0.05067	0.2533	0.3800 ns
Resíduo	24	1.60000	0.06677	
Total	29	2.08667		
Coeficiente de Variação				
%	11.56			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 8- Análise de variância do número de ramos das plantas aos 75 dias do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	0.52267	0.26133	2.9697 ns
Fator 2 (F2)	1	0.26133	0.26133	2.9697 ns
Interação F1 X F2	2	1.48267	0.74133	8.4242**
Resíduo	24	2.11200	0.08800	
Total	29	4.37867		
Coeficiente de Variação				
%	11.89			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 9 - Análise de variância do número de ramos das plantas aos 120 dias do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	2.07200	1.03600	9.6522**
Fator 2 (F2)	1	0.16133	0.16133	1.5031 ns
Interação F1 X F2	2	0.13067	0.06533	0.6087 ns
Resíduo	24	2.57600	0.10733	
Total	29	4.94000		
Coeficiente de Variação				
%	12.13			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 10 - Análise de variância massa seca de folhas do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	1301,64473	650,82236	1464,1453**
Fator 2 (F2)	1	1,66145	1,66145	3,7377 ns
Interação F1 X F2	2	208,40081	104,20040	234,4181**
Resíduo	24	10,66816	0,44451	
Total	29	1522,37515		

Coeficiente de Variação % 1,15

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = < p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 11 - Análise de variância massa seca de ramos do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	2045,53034	1022,76517	4748,5074**
Fator 2 (F2)	1	894,45720	894,45720	4152,7975**
Interação F1 X F2	2	6288,13865	3144,06932	14597,3257**
Resíduo	24	5,16928	0,21539	
Total	29	9233,29547		

Coeficiente de Variação % 0,278

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = < p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 12 - Análise de variância da área foliar do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	19829,5406	9914,77003	1032,4731**
Fator 2 (F2)	1	2096,64427	2096,64427	218,3337**
Interação F1 X F2	2	85,31241	42,65620	4,4420*
Resíduo	18	172,85280	9,60293	
Total	23	22184,34953		

Coeficiente de Variação %

3,58

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = < p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 13 - Análise de variância do rendimento de óleo essencial do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	49.21338	24.60669	2.0378
Fator 2 (F2)	1	247.01236	247.01236	20.4560
Interação F1 X F2	2	121.32564	60.66282	5.0237
Resíduo	12	144.90387	12.07532	
Total	17	562.45524		
Coeficiente de Variação %	20.17			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = < p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).
Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 14 - Análise de variância da produtividade de óleo essencial do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	664.71600	332.35800	2.7909ns
Fator 2 (F2)	1	2270.75098	2270.75098	19.0682**
Interação F1 X F2	2	2052.63836	1026.31918	8.6183**
Resíduo	12	1429.02558	119.08547	
Total	17	6417.13091		
Coeficiente de Variação %	17.32			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = < p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).
Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 15 - Análise de variância dos teores de clorofila a do experimento Metabolismo de *Pogostemon cablin* em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	0.32898	0.16449	101.7448**
Fator 2 (F2)	1	0.00037	0.00037	0.2286 ns
Interação F1 X F2	2	0.00043	0.00021	0.1328 ns
Resíduo	24	0.03880	0.00162	
Total	29			
Coeficiente de Variação %	14.17			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = < p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).
Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 16 - Análise de variância dos teores de clorofila b do experimento Metabolismo de *Pogostemon cablin* em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	0.03247	0.01624	45.8944**
Fator 2 (F2)	1	0.00605	0.00605	17.1163**
Interação F1 X F2	2	0.00176	0.00088	2.4924 ns
Resíduo	24	0.00849	0.00035	
Total	29			
Coeficiente de Variação %	11.76			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).
Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 17 - Análise de variância dos teores de clorofila total do experimento Metabolismo de *Pogostemon cablin* em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	0.59809	0.29905	94.7302**
Fator 2 (F2)	1	0.01113	0.01113	3.5264 ns
Interação F1 X F2	2	0.00254	0.00127	0.4017 ns
Resíduo	24	0.07576	0.00316	
Total	29			
Coeficiente de Variação %	12.69			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).
Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

anexo 18 - Análise de variância dos teores de carotenóides do experimento Metabolismo de *Pogostemon cablin* em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	0.02604	0.01302	150.6683**
Fator 2 (F2)	1	0.00986	0.00986	114.1744**
Interação F1 X F2	2	0.01374	0.00687	79.5326**
Resíduo	24	0.00207	0.00009	
Total	29	0.05172		
Coeficiente de Variação %	10.34321			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).
Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 19 - Análise de variância da relação Cb/Ca do experimento Metabolismo de *Pogostemon cablin* em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	0,58037	0,29019	90,8425**
Fator 2 (F2)	1	0,00016	0,00016	0,0490ns
Interação F1 X F2	2	0,07367	0,03683	11,5307**
Resíduo	18	0,05750	0,00319	
Total	23	0,71169		
Coeficiente de Variação %	9,04			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = < p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).
Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 20 - Análise de variância dos teores de proteínas solúveis totais do experimento Metabolismo de *Pogostemon cablin* em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	0.00002	0.00001	2.4557 ns
Fator 2 (F2)	1	0.00002	0.00002	5.8929*
Interação F1 X F2	2	0.00011	0.00005	16.5814**
Resíduo	24	0.00008	0.00000	
Total	29	0.00022		
Coeficiente de Variação %	21.03775			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = < p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).
Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 21 - Análise de variância dos teores de açúcares solúveis totais do experimento Metabolismo de *Pogostemon cablin* em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	0,01702	0,00851	10,6737 **
Fator 2 (F2)	1	0,00081	0,00081	1,0176ns
Interação F1 X F2	2	0,13875	0,06938	87,0300**
Resíduo	24	0,01913	0,00080	
Total	29			
Coeficiente de Variação %	3,89			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = < p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).
Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 22 - Análise de variância dos teores de açúcares redutores do experimento Metabolismo de *Pogostemon cablin* em diferentes níveis de GA₃ e radiação

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	0,00000	0,00000	12,7389**
Fator 2 (F2)	1	0,00001	0,00001	304,9433**
Interação F1 X F2	2	0,00000	0,00000	94,8043**
Resíduo	18	0,00000	0,00000	
Total	23	0,00003		
Coeficiente de Variação				
%	12,41937			

. ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = < p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).
Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 23 - Análise de variância dos teores de aminoácidos solúveis totais do experimento Metabolismo de *Pogostemon cablin* em diferentes níveis de GA₃ e radiação.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	2	0.00000	0.00000	121.8712**
Fator 2 (F2)	1	0.00000	0.00000	0.0033 ns
Interação F1 X F2	2	0.00000	0.00000	62.1175**
Resíduo	24	0.00000	0.00000	
Total	29	0.00000		
Coeficiente de				
Variação %	12.60941			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = < p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).
Fator 1 Níveis de Radiação, Fator 2 GA₃.

Anexo 24 - Análise de variância da altura do experimento Desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial, GA₃ e citocinina.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	1	57,04167	57,04167	7,7932*
Fator 2 (F2)	2	40,08333	20,04167	2.7381 ns
Interação F1 X F2	2	30,08333	15,04167	20,0550 ns
Resíduo	18	131,75000	7,31944	
Total	23			
Coeficiente de Variação %				
	4,53110			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = < p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).
Fator 1 GA₃, Fator 2 citocinina.

Anexo 25 - Análise de variância do número de ramos do experimento desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial, GA₃ e citocinina.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	1	6,67815	6,67815	66,7333**
Fator 2 (F2)	2	7,10243	3,55122	35,4865**
Interação F1 X F2	2	10,29610	5,14805	51,4433**
Resíduo	18	1,80130	0,10007	
Total	23			
Coeficiente de Variação %	6,00174			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = p < 0.05$), ns não significativo ($p > 0.05$).
Fator 1 GA₃, Fator 2 citocinina.

Anexo 26 - Análise de variância do número de folhas do experimento desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial, GA₃ e citocinina.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	1	0,19082	0,19082	0,4292 ns
Fator 2 (F2)	2	860,65601	430,32800	967,9779**
Interação F1 X F2	2	245,22101	122,61050	275,7995**
Resíduo	18	8,002215	0,44456	
Total	23			
Coeficiente de Variação %	1,03382			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = p < 0.05$), ns não significativo ($p > 0.05$).
Fator 1 GA₃, Fator 2 citocinina.

Anexo 27 - Análise de variância da área foliar do experimento desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial, GA₃ e citocinina.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	1	1348,95020	1348,95050	18,8126**
Fator 2 (F2)	2	592,87218	296,43609	4,1341*
Interação F1 X F2	2	2820,13661	1410,06830	19,6649**
Resíduo	18	1290,68637	71,70480	
Total	23			
Coeficiente de Variação %	8,71482			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = p < 0.05$), ns não significativo ($p > 0.05$).
Fator 1 GA₃, Fator 2 citocinina

Anexo 28 - Análise de variância da massa seca de ramos do experimento desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial, GA₃ e citocinina.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	1	97,04282	97,04282	67,4988**
Fator 2 (F2)	2	5,08861	2,54430	1,7697 ns
Interação F1 X F2	2	28,78501	14,39250	10,0108**
Resíduo	18	25,87855	1,43770	
Total	23			

Coeficiente de Variação % 6,66905

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 GA₃, Fator 2 citocinina

Anexo 29 - Análise de variância da massa seca de folhas do experimento desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial, GA₃ e citocinina.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	1	0,00107	0,00107	0,0053ns
Fator 2 (F2)	2	4,24926	2,12463	10,6521**
Interação F1 X F2	2	2,75701	1,37850	6,9113**
Resíduo	18	3,59020	0,19946	
Total	23	10,59753		

Coeficiente de Variação % 4,48

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 GA₃, Fator 2 citocinina

Anexo 30 - Análise de variância do rendimento do óleo essencial do experimento desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial, GA₃ e citocinina.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	1	224,78760	224,78760	9,1063**
Fator 2 (F2)	2	2268,57543	1134,28771	45,9506**
Interação F1 X F2	2	2839,40726	1419,70363	57,5130**
Resíduo	18	444,32867	24,68493	
Total	23			

Coeficiente de Variação % 9,69135

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 GA₃, Fator 2 citocinina

Anexo 31 - Análise de variância da produtividade do óleo essencial do experimento desenvolvimento de *Pogostemon cablin* rendimento do óleo essencial, GA₃ e citocinina.

Fontes de Variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F Observado
Fator 1 (F1)	1	0,00960	0,00960	0,0503 ns
Fator 2 (F2)	2	71,59143	35,79572	187,5294**
Interação F1 X F2	2	110,61990	55,30995	289,7621**
Resíduo	18	3,43585	0,19088	
Total	23			
Coeficiente de Variação %	5,72169			

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$), * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$), ns não significativo ($p \geq 0.05$).

Fator 1 GA₃, Fator 2 citocinina