

Desenvolvimento de protocolo de desinfestação de explantes de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltl.) Micheli.)

Development of a protocol for the disinfestation of leather hat explants (*Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltl.) Micheli.)

Bianca Maria Morais Biondo¹, Lucas Loff Lunkes², Glauco Vieira Miranda³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de desinfestação para explantes de *Echinodorus grandiflorus*, conhecida como chapéu-de-couro, uma planta fitoterápica brasileira pertencente à família das alismataceae, se propaga por semente e raiz. É amplamente atrativa para fins medicamentosos, e de interesse comercial. Para desenvolver a micropropagação *in vitro*, os segmentos nodais foram excisados e mantidos em meio de cultura suplementado com 30 mg de ácido indolacético (AIA) e 5 mg de benzilamina purina (BAP) e aclimatadas em BOD devidamente regulada em fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 °C, e intensidade luminosa de 108,17 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Quanto à avaliação, os explantes passaram por análise de formações de raízes, folhas e brotos. O protocolo eficiente para desinfestar explantes de *Echinodorus grandiflorus* foi lavar com água e detergente, imergir em álcool a 70% por 4 minutos e depois imergir por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,6% e finalizar com a tríplice lavagem em água autoclavada.

PALAVRAS-CHAVE: Micropropagação; Protocolo; *Echinodorus grandiflorus*; Fitoterápica.

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a disinfestation protocol for explants of *Echinodorus grandiflorus*, known as leather hat, a Brazilian herbal plant belonging to the alismataceae family, propagates by seed and root. It is widely attractive for medicinal purposes, and of commercial interest. To develop *in vitro* micropropagation, the nodal segments were excised and maintained in a culture medium supplemented with 30 mg of indoleacetic acid (AIA) and 5 mg of benzylamine purine (BAP) and acclimatized in BOD duly regulated in a photoperiod of 16 hours, temperature of 25 °C, and luminous intensity of 108.17 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As for the evaluation, the explants underwent analysis of root formations, leaves and shoots. The efficient protocol to disinfect *Echinodorus grandiflorus* explants was to wash with water and detergent, immerse in 70% alcohol for 4 minutes and then immerse for 15 minutes in 0.6% sodium hypochlorite solution and finish with triple washing in autoclaved water.

KEYWORDS: Micropropagation; Protocol; *Echinodorus grandiflorus*; Phytotherapeutic.

INTRODUÇÃO

A *Echinodorus grandiflorus* é popularmente conhecida por chapéu-de-couro, aguapé, chá-de-campanha, chá-do brejo, chá-de-pobre, chá-mineiro, congonha-do-brejo, erva-do-brejo, erva-do-pântano, dentre outros. É uma planta medicinal pertencente à família das alismataceae e é originária da América do Sul, que se desenvolve em quase todo Brasil e possui poucos estudos científicos (PEREIRA, *et al.*, 2000).

As plantas do gênero *Echinodorus* são encontradas em habitat aquático e pantanoso, muito utilizadas para fins medicinais fitoterápicos, mas também utilizadas para fins ornamentais e em alimentação e bebidas como mate e refrigerantes (mate couro ou mineirinho). Além de todas suas funcionalidades, o chapéu-de-couro é uma planta

¹ Bolsista. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: biankaamorais@icloud.com. ID Lattes: 4625937889282856

Bolsista. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: lunkelucas11@gmail.com. ID Lattes: 8979539107877484.

² Orientador. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. Email: glaucovmiranda@professores.utfpr.edu.br. ID Lattes: 1581269691451530.

considerada “daninha” em mananciais aquáticos por apresentar alto crescimento espontâneo (PEREIRA, *et al.*, 2000).

As plantas medicinais apresentam alto valor comercial, o que atrai desejáveis produções que atendam a demanda do mercado consumidor que podem causar o extrativismo não sustentável de plantas em ecossistemas frágeis. Os principais constituintes químicos encontrados nesta família foram taninos, flavonóides, triterpenos, glicosídeos, equinodorosídeos, essências e sais minerais (PEREIRA, *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 1995; LAINETTI, *et al.*, 1980). Possui ações de uso medicinal tradicional, descrito em farmacopeias e documentos oficiais. Dentro a farmacologia há resultados satisfatórios em atividade vasodilatadora e hipotensiva, atividade diurética e renal, atividade analgésica e anti-inflamatória, atividade sobre o sistema circulatório, colesterol e obesidade, atividade no sistema imunológico e atividade antimicrobiana (GILBERT, *et al.*, 2022). Para cada finalidade do chapéu de couro há uma posologia e dosagem em diversas formas, mas a grande maioria abrange o uso de folhas e raízes, excepcionalmente o caule.

A micropropagação de plantas representa uma alternativa para a propagação comercial de espécies de interesse econômico, entre as quais as medicinais com valor farmacológico reconhecido. Embora esta técnica tenha como desvantagem o custo elevado, a crescente demanda da indústria farmacêutica por plantas indexadas, livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica, bem como com capacidade de síntese de metabólitos secundários potencializada, por meio do melhoramento genético, justificam a sua utilização (LIMA, *et al.*, 2007).

Diante ao fato de inúmeros benefícios da espécie, e a carência de informações com os estudos literários encontrasse a necessidade de envolver estudos sobre o caso e protocolos com meios eficientes da micropropagação *in vitro* do chapéu de couro para produção em massa de clones que sejam geneticamente iguais e atendam a fitossanidade desejável em um tempo bem mais curto.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Melhoramento e Sementes da UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) câmpus Santa Helena-PR. Para a elaboração e estabelecimento do protocolo de desinfestação foram utilizados segmentos nodais proveniente das hastes florais do chapéu-de-couro (Figura 1) de plantas matriz provenientes do estado de Minas Gerais e mantidas em ambiente protegido com iluminação artificial com intensidade de $48,27 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$.

Figura 1- Haste floral de onde são obtidos os segmentos nodais



No desenvolvimento do protocolo otimizado foram realizadas variações de material e métodos a fim de encontrar o ideal onde não ocorresse contaminação de agentes patogênicos. Foram avaliadas diferentes soluções desinfectantes e tempos de imersão dos explantes.

Para a primeira tentativa de protocolo foi desenvolvido a formulação com solução comercial de hipoclorito de sódio (NaOCl) (solução a 2,5%) diluída a 0,6% com água destilada autoclavada, no qual os explantes foram imergidos em variações de tempos de 5 a 25 minutos.

No segundo protocolo visando diminuir a contaminação, foi acrescido a solução de hipoclorito, o fungicida Cercobin 875 WG 1g/L e bactericida 0,2 mg/L de Quemicetina, também testando variações de tempos de imersão.

No terceiro e atual protocolo desenvolvido, os explantes passaram por uma lavagem em água corrente e sessões de imersão em detergente por 10 minutos, seguidos de enxágue e transferência para a câmara de fluxo laminar onde foram imersos em um béquer contendo álcool 70% por 4 minutos, seguidos para uma solução de 0,6% de hipoclorito de sódio, água destilada e duas gotas de detergente, mantidos sob agitação nos tempos de cinco, dez e quinze minutos, na sequência foram banhados em três placas com água destilada autoclavada e secos em papel. Ver por exemplo a figura 2, em que demonstra parte do processo e materiais utilizados.

Figura 2 – Materiais utilizados no processo de execução do experimento em câmara de fluxo laminar



Nos três protocolos, os explantes foram cortados e colocados em placas de petri com meio de cultura MS (Murashige & Skoog) suplementado com 5 mg de Benzilamina Purina (BAP) e 30 mg de Ácido Indol-3-Acético (AIA), contendo 10 g L⁻¹ de ágar e 30 g L⁻¹ de sacarose com pH 5,8 antes da autoclavagem. Em seguida as placas foram vedadas, identificadas por data e repetição, e então transferidas para a incubadora BOD devidamente regulada em fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 °C, e intensidade luminosa de 108,17 μmol m⁻² s⁻¹ oriundas de lâmpadas fluorescentes brancas.

As placas foram avaliadas quanto ao desempenho dos protocolos por vinte e oito dias.

O delineamento experimental utilizado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com um número de cinco repetições por tempo de imersão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos referentes aos dois primeiros protocolos foram completamente insatisfatórios com uma taxa de 100% de contaminação, mesmo adequando-se variações de tempos, sendo assim, houve a necessidade de alteração de procedimentos, com uma afunilada busca de conhecimentos e apoio, obteve-se então a ideia de acrescentar procedimentos, excluir outros e ainda suplementar o meio com hormônios.

Com o desenvolvimento do atual protocolo de desinfestação, melhores resultados foram adquiridos, buscou-se observar o desenvolvimento dos explantes na tabela 1 quanto ao número de brotos, folhas e raízes. Ressaltando que cada tempo teve um número de cinco repetições, e uma porcentagem em taxa de sobrevivência de 0; 20 e 60% nos tempos de 5; 10 e 15 min, respectivamente.

Tabela 1 – Números de brotos, folhas e raízes para os tempos de imersão dos explantes em hipoclorito de sódio

Tempo de imersão (Minutos)	Números de brotos	Número de folhas	Número de raízes
5	0	0	0
10	1	2	0
15	3	3	0

Fonte: Biondo, B.M.M (2023)

Explantes submetidos a menores tempos apresentaram níveis de contaminação maiores, o que cessa o crescimento e desenvolvimento do explante levando-o à morte. Sendo o tempo de quinze minutos o mais adequado. Melhorias e adequações precisam ser continuadas para não haver perdas por contaminação.

CONCLUSÃO

O protocolo mais eficiente para desinfestar explantes de *Echinodorus grandiflorus* é lavar com água e detergente, imergir em álcool a 70% por 4 minutos seguida por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,6% por 15 minutos finalizando com a tríplex lavagem em água autoclavada.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro, a Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Santa Helena e seus colaboradores pelo apoio, disponibilização de materiais necessários e locais para serem realizadas as pesquisas e auxílios.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

GILBERT, B.; *et al.* **Monografias de Plantas Medicinais Brasileiras e Aclimatadas (volume II)**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; Curitiba: Abifisa, 2022. E-book (295 p.).

LAINETTI, R. *et al.* **A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro**. Rio de Janeiro: Ediouro, 1980. 120p.

LIMA, S. M. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, [S. l.], v. 5, n. S2, p. 669–671, 2007. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/rbrasbioci/article/view/115219>. Acesso em: 26 out. 2023.

MARTINS, E.R.; *et al.* **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1995. 220p.

PEREIRA, F.D. *et al.* Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj), uma planta medicinal. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 24 (Edição especial), p. 74-80, 2000.