

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TEMPOS DE IMERSÃO E pH'S DA SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO NA ASSEPSIA DE EXPLANTES FOLIARES DE ATROVERAN
Ocimum selloi Benth.

LUCILA ELIZABETH FRAGOSO MONFORT¹; CAROLINA MARIANE MOREIRA²; JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO³; SUZAN KELLY VILELA BERTOLUCCI⁴; HELENA BOTELHO DE ANDRADE⁵

RESUMO

O atroveran (*Ocimum selloi* Benth - Lamiaceae) é uma planta medicinal utilizada na medicina popular. Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes tempos de imersão e pH's da solução de hipoclorito de sódio de explantes foliares de *O. selloi*. Para o experimento foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, sendo 3 tempos de imersão (5; 10 e 15 min) e 4 pH's (11,5; 9, 7 e 5) da solução de hipoclorito de sódio a 30%. Para a assepsia dos explantes foliares de atroveran recomenda-se a exposição na solução a 30% de hipoclorito de sódio com pH ajustado para 5.

Palavras-chaves: Lamiaceae, *Ocimum selloi*, assepsia.

INTRODUÇÃO

O *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae) é conhecido popularmente como atroveran, alfavaca, anis-do-campo, erva-doce-silvestre, alfavaca-do-mato, hortelã-brava e o seu cultivo é fácil e rápido podendo a propagação ser obtida por estaquia (Marquesini, 1996). Estudos etnobotânicos realizados com o *O. selloi* revelaram que esta planta é utilizada na medicina popular com várias finalidades. Por via oral, é usada como digestivo, e para tratar gastrite, vômitos, tosse, bronquite, e outras condições. O *O. selloi* é empregado também topicamente para aliviar dores nas pernas (Paneesa, 1997).

Um dos maiores problemas da produção em escala comercial é a contaminação do meio nutritivo por fungos e bactérias durante as etapas de propagação *in vitro*. A contaminação estabelece-se no meio de cultura e/ou material vegetal competindo pelos nutrientes, produzindo substâncias tóxicas e inibindo o desenvolvimento do explante, ocasionando assim a sua perda. Em princípio, existem quatro fontes de contaminação: a fonte de explante, o meio nutritivo, o ambiente e o operador (Pierik, 1997).

Dentre as várias substâncias germicidas a base de cloro, utilizadas para desinfestação de explantes, as mais comuns são o hipoclorito de sódio, encontrado em formulações comerciais de água sanitária ou o hipoclorito de cálcio (Grattapalia & Machado, 1998).

O hipoclorito de sódio constitui uma das fontes de cloro com possibilidade de utilização como esterilizante químico. É um produto químico muito empregado para esterilização de superfícies, frutas e hortaliças, água, entre outros. Sua utilização em larga escala é devido ao seu vasto espectro de atividade biocida contra bactérias, fungos e vírus, além de ser um produto de fácil aquisição e de baixo custo (Estrela et al., 2002).

Em amoreira-preta (*Rubus* sp.), a contaminação dos explantes foi reduzida com a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% em diferentes tempos de imersão (0, 10, 20 e 30 min) (Augusto & Biasi, 2002).

O hipoclorito de sódio é bastante usado para a assepsia de explantes na cultura de tecido, tendo a sua eficácia comprovada, contudo pouco se tem estudado sobre o efeito do pH dessa solução na assepsia dos explantes. Com a diminuição do pH, o cloro fica mais ativo, aumentando o poder

¹ Doutoranda em Fitotecnia, DAG/UFLA, lucilaagro@yahoo.com.br

² Mestranda em Genética e Melhoramento de Plantas, DBI/UFLA; carolinammoreira@hotmail.com

³ Professor Titular do DAG/UFLA, jeduardo@ufla.br

⁴ Professora Assistente do DAG/UFLA, suzan@ufla.br

⁵ Estudante de Agronomia do 8 semestre, UFLA, heleninhaba@yahoo.com.br

desinfestante da solução, porém essa elevação do cloro pode causar a morte do tecido dependendo do tempo de exposição.

Com base no que foi exposto, objetivou-se verificar o efeito de diferentes tempos de imersão e pH's da solução de hipoclorito de sódio em explantes foliares de *O. selloi*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Mediciniais da Universidade Federal de Lavras-UFLA, em Lavras, MG. Plantas jovens de *O. selloi*, cultivadas em casa de vegetação serviram como doadoras de folhas.

A excisada da espécie está depositada no herbário ESAL, do Departamento de Biologia da UFLA, sob o registro nº 7474.

Após a coleta das folhas os processos de assepsia foram aplicados. Utilizou-se a solução de hipoclorito de sódio na concentração de 30% com pH's ajustados para 11,5; 9; 7 e 5. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, sendo quatro pH's e três tempos de imersão nas soluções de hipoclorito de sódio (5, 10 e 15 min). Utilizou-se quatro repetições, com cinco tubos por repetição.

Após receber os respectivos tratamentos, os explantes foram lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada, sob capela de fluxo laminar. Em seguida, as folhas foram cortadas em pequenos quadrados de aproximadamente 1,0 cm² e foram inoculados em tubos de ensaio contendo 12,5 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 3% de sacarose, 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e 1 mg.L⁻¹ de BAP. O meio de cultura foi solidificado com 0,6% de ágar, o pH foi ajustado para 5,7±0,1 e, em seguida, autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão por 20 min. Após a inoculação, os tubos foram fechados com tampas plásticas e vedados com parafilme. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro, sob intensidade luminosa de 25 μmol m⁻² s⁻¹, à temperatura de 26±0,1°C. Aos 45 dias, avaliaram-se as porcentagens de contaminação, oxidação e sobrevivência.

A análise estatística dos dados foi realizada pelo software Sisvar[®], versão 5.0 (Ferreira, 2007). Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA, pelo teste F (p<0,05). Para comparação do tempo foi utilizado o teste de Scott-Knott (p<0,05). A comparação dos pH's foi realizada por meio da análise de regressão polinomial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação não foi significativa para nenhum dos parâmetros avaliados. As variáveis agrônômicas apresentaram diferenças estatísticas apenas quando analisados separadamente.

A variável tempo apresentou significância para as porcentagens de contaminação e oxidação (Tabela 1). O menor tempo de exposição (5 min.) foi o que apresentou o maior valor de contaminação (80%) e menor valor de oxidação (9%). Os tempos de 10 e 15 min. não apresentaram diferenças significativas para porcentagem de contaminação, sendo esses os melhores tratamentos. Porém, como era de se esperar, o aumento do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio apesar de ter aumentado a ação desinfestante, também contribuiu para a oxidação.

Tabela 1 – Valores médios da porcentagem de contaminação e oxidação em função do tempo aos 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Tempo (min.)	%Contaminação	%Oxidação
5	80 b	9 a
10	71 a	29 b
15	62 a	34 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

No que se refere à ação desinfestante do hipoclorito de sódio, os resultados do presente trabalho corroboram com os de Bianchi et al. (2003), que observaram que a imersão de meristemas de

marmeleiro em hipoclorito de sódio a 1,5% por 10 min. apresentou o menor percentual de contaminação. Porém, no marmeleiro esse tempo de exposição também foi o que apresentou a maior taxa de sobrevivência.

Indiferente do pH da solução de hipoclorito de sódio houve contaminação (51,59; 63,93; 76,26 e 93,21%) em todos os tratamentos (Figura 1). Observou-se que a porcentagem de contaminação apresentou comportamento linear crescente para a faixa de pH estudada (pH entre 5 e 11,5), com um aumento da contaminação de 6,16%. Esse resultado demonstra que em pH mais baixo, a solução de hipoclorito de sódio apresenta uma maior ativação do cloro proporcionando uma ação germicida mais eficiente.

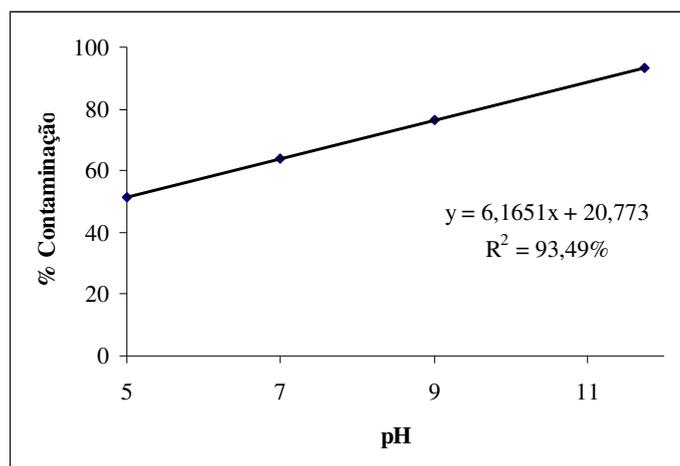


Figura 1 - Porcentagem de contaminação em relação ao diferentes pH's da solução de hipoclorito de sódio a 30% aos 45 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Já para a porcentagem de oxidação observou-se um comportamento linear decrescente, com uma oxidação máxima de 48,3% no pH = 5 e nenhuma oxidação no pH = 11,5 (Figura 2). Em pH menor a ação germicida do cloro é mais eficiente, contudo pode causar a morte do explante.

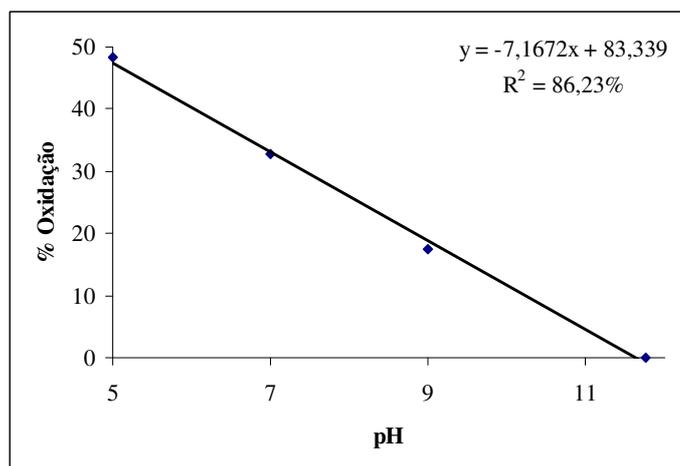


Figura 2 - Porcentagem de oxidação em relação ao diferentes pH's da solução do hipoclorito de sódio aos 45 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

A oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro* (Modgil et al.,1999). Esses últimos autores citados verificaram elevada oxidação (34,25%) no estabelecimento *in vitro* de macieira cv. Tydeman's Early Worcester utilizando ápices caulinares e segmentos nodais como explantes.

Quanto a porcentagem de sobrevivência observou-se também um comportamento linear decrescente na faixa de pH estudada (pH entre 5 e 11,5), cujo decréscimo foi de 2,6% com o aumento

do pH. A maior taxa de sobrevivência foi no pH = 5 (18,31%). Já o pH = 11,5, apresentou um índice muito baixo de sobrevivência (0,70 %) inviabilizando totalmente o cultivo *in vitro*.

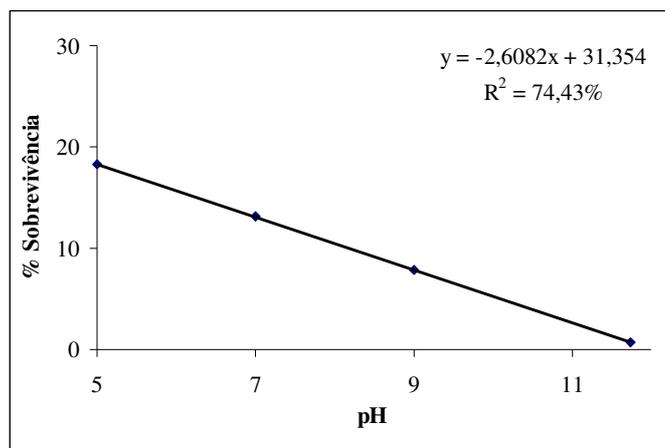


Figura 3 - Porcentagem de sobrevivência em relação ao diferentes pH's da solução do hipoclorito de sódio aos 45 dias. UFLA, Lavras, MG, 2010.

CONCLUSÃO

Para a assepsia de explantes foliares de atoveran recomenda-se o uso da solução de hipoclorito de sódio a 30% com o pH ajustado para 5 durante 10 min. de exposição.

AGRADECIMENTOS

A CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo fornecimento de bolsas e auxílio financeiro.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

AUGUSTO, C. S. S.; BIASI, L. A. Micropropagação da amoreira-preta cv. Brazos. **Scientia Agrária**, v. 3, p. 114-114, 2002.

BIANCHI, V. J.; CHAVES, A. da C.; SCHUCH, M. W.; FACHINELLO, J. C. Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, RS, v. 9, n. 2, p. 177-179, 2003.

ESTRELA C., ESTRELA C. R. A, BARBIN E. L. , SPANÓ, J. C. E. , MARCHESAN, M. A. & PÉRCORA, J. D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, v. 13, p. 113-117, 2002.

FERREIRA, D. F. SISVAR: sistema de análise de variância versão 5.0. Lavras: Departamento de Ciências Exatas, 2007.

GRATTAPALIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa – CNPH, 1998. p. 183-260.

MARQUESINI, N. R. Plantas usadas como medicinais pelos índios do Pará e Santa Catarina, Sul do Brasil: família asteraceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., 1996, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 1996.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

MODGIL, M.; SHARMA, D. R.; BHARDWAJ, S. V. Micropropagation of apple cv. Tydemán's Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.81, p.179-188, 1999.

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

PANEESA, S. **Plantas que curam: cheiro de mato**. São Paulo: IBRASA, 1997. 279 p.

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. Boston: Martinus Nijhoff, 1987. 344p.