

# PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CHAPÉU-DE-COURO (*Echinodorus cf. scaber* RATAJ), UMA PLANTA MEDICINAL

FLÁVIA DIONÍSIO PEREIRA<sup>1</sup>  
JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO<sup>2</sup>  
MARIA DAS GRAÇAS CARDOSO<sup>3</sup>  
OSMAR ALVES LAMEIRA<sup>4</sup>

**RESUMO** - A espécie *Echinodorus cf. scaber* é uma planta nativa do Brasil conhecida popularmente como chapéu-de-couro. Na utilização de suas folhas na forma de chá ou infusão tem eficiente ação diurética, antiofídica, anti-reumática e antiinflamatória, contra artrose e gota e principalmente para normalizar o ácido úrico. A reprodução usual ocorre por meio de sementes que podem trazer variação genética à espécie ou pelos seus rizomas que são muito sensíveis no plantio, podendo às vezes secar as folhas das quais os princípios ativos são extraídos. Para evitar inconvenientes como estes, a micropropagação constitui uma alternativa eficaz para a multiplicação dessas espécies que apresentam interesse econômico. O objetivo proposto neste trabalho foi o de viabilizar a multiplicação *in vitro* do chapéu-de-couro e

estabelecer um protocolo que permita a clonagem da mesma apresentando uma alternativa ao processo convencional de propagação. Segmentos nodais de plantas estabelecidas *in vitro* foram excisadas e inoculadas em meio básico de MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 0,0; 1,0; 2,0; e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP em câmara de fluxo laminar. Os explantes foram cultivados em fotoperíodo de 16 horas sob uma intensidade de luz de 2000 lux. Cada tratamento continha 15 explantes. Foi avaliado o número de brotações, raízes, folhas e tamanho do explante. O número de brotações e folhas aumentou com níveis de BAP, porém o tamanho de brotações e de raízes diminuiu. O tratamento mais eficiente foi com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

**TERMO PARA INDEXAÇÃO:** *Echinodorus cf scaber*, Plantas medicinais, micropropagação, chapéu-de-couro.

## PROPAGATION *IN VITRO* OF “CHAPÉU-DE-COURO” (*Echinodorus cf. scaber* RATAJ), A MEDICINAL PLANT.

**ABSTRACT** - *Echinodorus cf. scaber* Rataj is a specie with medicinal properties popularly known as leather hat. Due to the action of its active principles it is prescribed as depurative, antiophidian, diuretic, antirheumatic, and antiinflammatory being also utilized for normalizing uric acid against both gout and arthrosis. Usual reproduction occurs either through seeds, may bring genetic variation within the species, or by its rhizomes which are greatly sensitive at planting, being able, sometimes, to dry, the leaves from where active principles are extracted. To avoid such drawbacks as these, micropropagation constituted an effective alternative for multiplication of species like

that which present economical value. The objective proposed in this work was to become viable the *in vitro* multiplication of leather hat and establish a protocol which enable its clonagem by presenting an alternative to the conventional process of propagation. Nodal segments of plantlets *in vitro* were inoculated at MS medium supplemented with 0.0; 1.0; 2.0; 4.0 mg.L<sup>-1</sup> of BAP. It was evaluated the number of shoot, roots, leaves and size of the explant. The shoot number and leaves increased with levels of BAP, but the size of shoot and number of roots decreased. The most efficient treatment was with 1.0 mg.L<sup>-1</sup> of BAP.

**INDEX TERMS:** *Echinodorus cf scaber*, Medicinal plants, micropropagation, “chapéu-de-couro” (leather hat).

1. Engenheiro Agrônomo, M.Sc, Departamento de Fisiologia/UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS (UFLA)

2. Bióloga., Dr<sup>a</sup>., Professora. do Departamento de Química/UFLA Caixa Postal 37, 37200-000 – Lavras - MG

3. Engenheiro Agrônomo, PhD, Professora do Departamento de Fitotecnia/UFLA.

4. Engenheiro Agrônomo, Dr., EMBRAPA, Amazônia Oriental.

## INTRODUÇÃO

A utilização de plantas que apresentam propriedades medicinais vem perpassando os tempos desde os primórdios da civilização humana. Tais conhecimentos adquiridos sobre o seu ambiente foram passados de geração a geração por especialistas como os pajés, chamãs, mezinheiros, benzedeiros, raizeiros e druidas por eficientes sistemas de transmissão oral (Cardoso Júnior, 1996).

Nas diferentes regiões florísticas existentes no Brasil, metade das espécies nativas apresentam alguma propriedade medicinal; de acordo com estimativas otimistas, cerca de 1% delas já foi quimicamente estudada (Clemente Filha, 1996). Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e de importância, atualmente podem-se mencionar as obtidas de *Echinodorus cf. scaber* Rataj, que apresentaram promissores efeitos depurativo, antiofídico, diurético, anti-reumático e antiinflamatório, sendo também utilizadas na medicina popular com muita segurança para normalizar o ácido úrico, combatendo a gota e artrose, servindo ainda como base para a fabricação de refrigerantes (Corrêa, Batista e Quintas 1998).

*Echinodorus cf. scaber* Rataj, também conhecida como chapéu-de-couro, chá de mineiro, chá de campanha, congonha do brejo, erva de bugre, erva do pantano e chá de pobre é uma planta nativa amplamente dispersa por quase todo o território brasileiro, pertence à família Alismataceae. São herbáceas perenes, aquáticas emergentes, mantêm suas partes inferiores imersas e expõem suas folhas e inflorescências que ocorrem principalmente nas margens de rios, lagos, canais de drenagem e baixadas pantanosas conseguindo sobreviver totalmente imersas por um certo período, porém não florescem. Toleram curtos períodos de seca, suas flores são brancas com manchas amareladas na parte basal, apresentam infrutescências arredondadas de coloração castanha na maturação

Os principais constituintes químicos encontrados nesta família foram taninos, flavonóides, triterpenos, glicosídeos, equinodorosídeos, essências e sais minerais (Martins et al., 1995; Lainetti e Brito, 1980).

A aplicação da micropropagação destaca-se pela hibridização e desenvolvimento de novas cultivares, na recuperação de substâncias farmacêuticas, na multiplicação segura de cultivares desejáveis, na propagação rápida com alto coeficiente de multiplicação, e como auxiliar na salvaguarda do patrimônio genético de plantas ameaçadas pela exploração humana (Simões, 1988).

Não existem relatos disponíveis de trabalhos na literatura sobre a propagação *in vitro* da espécie. Por tal motivo e por se tratar de uma espécie de grande interesse farmacológico, carente de informações científicas e técnicas adequadas de cultivo, fazem-se necessários estudos sobre a propagação da espécie.

O objetivo deste trabalho foi viabilizar a multiplicação *in vitro* do chapéu-de-couro e estabelecer um protocolo que permita a clonagem da mesma apresentando uma alternativa ao processo convencional de propagação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Utilizou-se a cultura nodal proveniente de explantes obtidos de plântulas *Echinodorus cf. scaber* Rataj estabelecidas *in vitro* em meio MS sem regulador de crescimento. Em câmara de fluxo laminar as plântulas foram classificadas de acordo com o tamanho e coloração como sendo grandes e verdes (GV) pois possuíam suas folhas verdes e tinham  $\pm 1,5$  cm; grandes e amarelas (GA) possuíam suas folhas amarelas e tinham  $\pm 1,5$  cm, pequenas e amarelas (PA) possuíam suas folhas amarelas e tinham  $\pm 0,5$  cm, foram excisadas e os segmentos nodais foram inoculados em meio MS, suplementado com 0,0; 1,0; 2,0; 4,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP, solidificado com ágar a 0,47% e pH  $5,7 \pm 0,1$  antes de serem autoclavados.

Os explantes foram incubados a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  em fotoperíodo de 16 horas luz sob intensidade de 2000 lux ( $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em sala de crescimento. Aos 30 dias avaliaram-se; número de brotações, número de raízes, número de folhas e tamanho do explante.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), sendo que cada tratamento continha 15 repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste F ao nível de 5%, com comparações de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando os explantes secundários de chapéu-de-couro foram inoculados em meio MS ausente de regulador de crescimento (T1), observou-se que não houve formação de brotações. Segundo Pinto e Pasqual (1990), certos tecidos sintetizam as quantidades de hormônios que necessitam, enquanto outros são total-

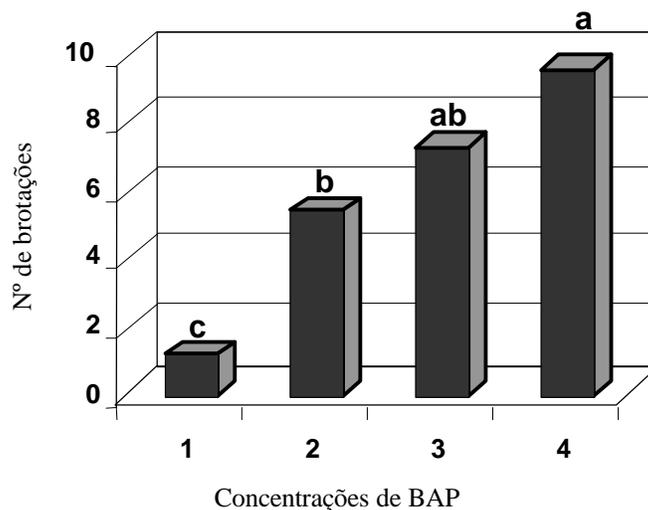
mente dependentes da adição exógena. O material vegetativo para multiplicar pode ser enquadrado em quatro categorias: ausência de regulador, presença de citocininas, presença de auxina, interação entre auxina e citocininas.

Nesse caso, o material vegetativo necessitou da presença de citocinina para que ocorresse a proliferação de brotações. Os segmentos nodais cultivados em meio suplementado com BAP formaram brotações e estas foram induzidas em todos os tratamentos em que o BAP foi utilizado. O maior número de brotações foi obtido quando houve acréscimo nos níveis de BAP.

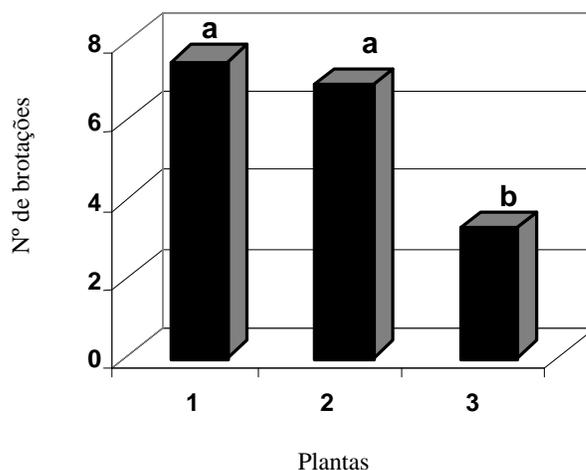
Entre os tratamentos, o meio MS que continha 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T4) foi o que apresentou maior número de brotações; de 5 a 19. No tratamento que continha 1,0mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T2) constatou-se de 3 a 10 brotações; já no tratamento com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T3) obteve-se de 1 a 14 brotações. Mas a plântula que apresentou melhor desenvolvimento normal foi com 1,0 mg. L<sup>-1</sup> que acaba sendo mais econômico e com menor risco de ocorrer variação somaclonal. Um dos fatores para induzir a variação somaclonal é concentrações mais altas de reguladores de crescimento independente do grupo a que pertença.

Observou-se que ocorreu significância na formação de brotações nas avaliações dos diferentes tipos de

plântulas. Assim deduz-se que plantas estando grandes e verdes e grandes e amarelas proporcionam melhor desenvolvimento das brotações, enquanto plântulas estando pequenas e amarelas são menos satisfatórias. No meio MS, que continha 4,0mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T4), com base em uma plântula GV, o maior número de brotações alcançado foi 19; em plântula GA, o maior número de brotações obtido foi 12; para plântula PA o maior número de brotações foi 6. No tratamento que continha 1,0mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T2) em plântula GV, o maior número de brotações alcançado foi 10, em plântula GA o maior número de brotações obtido foi 5, para plântula PA o maior número de brotações foi 5; para o tratamento com 2,0mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T3) em plântula GV o maior número de brotações alcançado foi 14; em plântula GA o maior número de brotações obtido foi 13; para plântula PA o maior número de brotações foi 2 (Figura 1 e 2). A diferença no número de brotações obtidas é muito dependente do tamanho do explante, por causa da diferença no metabolismo de cada plântula e da própria reserva de metabólitos em cada explante. Portanto, é muito importante selecionar material com bom estado fisiológico e tamanho homogêneos do explante para obter melhores resultados na proliferação das brotações ou na morfogênese



**FIGURA 1** - Efeito do BAP no desenvolvimento in vitro de brotações de chapéu-de-couro 1) meio MS ausente de regulador de crescimento; 2) meio MS+1,0mg. L<sup>-1</sup>; 3) meio MS+2,0mg. L<sup>-1</sup>; 4) meio MS+4,0mg. L<sup>-1</sup>. UFLA, Lavras, MG, 1999.



**FIGURA 2** - Efeito do BAP no desenvolvimento in vitro de brotações de chapéu-de-couro 1) grandes e verdes (GV); 2) grandes e amarelas (GA) 3) pequenas e amarelas (PA) UFLA, Lavras, MG, 1999.

O caráter tamanho médio das brotações teve efeito significativo, mostrando redução gradativa com a incorporação de doses crescentes de BAP no meio. Essa redução de tamanho é normal, porque o grupo da citocinina é um regulador de crescimento para indução de brotações. E este regulador induz à divisão celular reduzindo o tamanho das células e aumentando o número de células. O melhor tratamento foi favorável no meio MS com ausência de regulador de crescimento (T1), o que era de se esperar, pois a presença de BAP no meio induz à proliferação celular dos tecidos. Nesse tratamento, as brotações atingiam de 0,5 a 1,5cm.

Os tratamentos restantes mantiveram o tamanho médio de suas brotações entre 0,2 e 1,0cm (Figura 3). Como não houve significância nos diferentes tipos de plântulas deduz-se que as mesmas não interferem no tamanho das brotações.

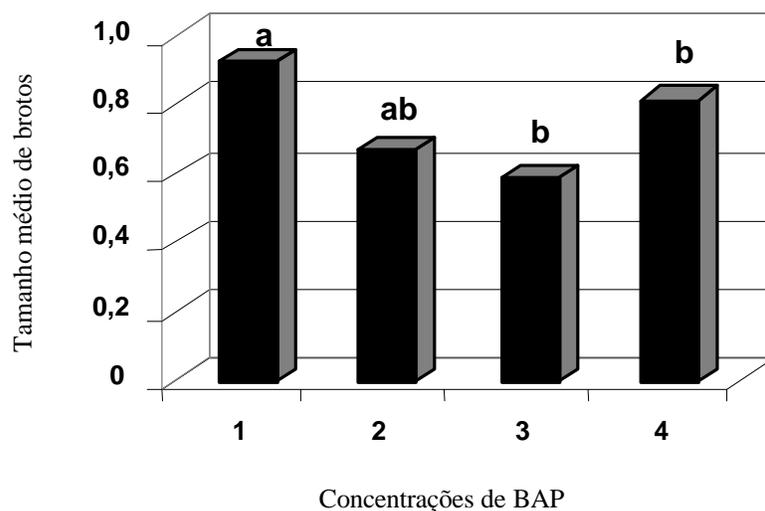
Argollo e Shepherd (1997) também comprovaram isso por meio de seus estudos, quando, utilizando ápices caulinares de *Artemisia annua* conseguiram a obtenção de um grande número de plantas bem desenvolvidas em meio MS básico.

Saleh e Shepherd (1997) obtiveram resultados semelhantes ao induzirem o desenvolvimento de plântulas de *Clusia nemorosa*; o mesmo ocorreu em estudos com plântulas de *Ipomoea batatas* nas quais se obteve a melhor resposta no crescimento e desenvolvimento das mesmas quando se utilizava o meio MS sem regulador de crescimento (Martins, 1997).

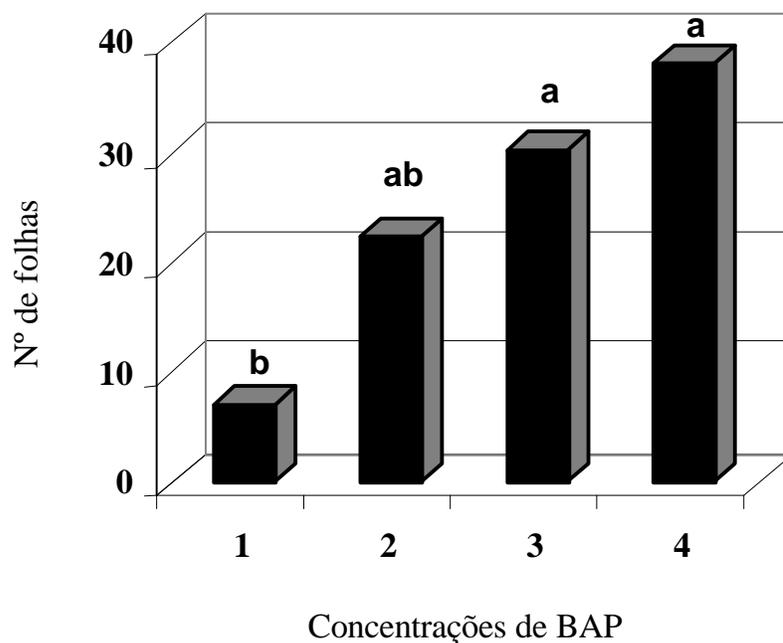
Com relação ao número de folhas, o tratamento sem regulador de crescimento (T1) foi o que tinha menor número de folhas, porém estas eram maiores, de cor verde intenso, arredondadas, apresentando-se bem características da espécie. Nesse tratamento, o número de folhas da planta toda chegou a ser de 4 a 15 para o menor e maior número, respectivamente.

Nos demais tratamentos, como ocorreu formação de brotações e estas organizavam-se em forma de roseta, a tendência foi ocorrer um acréscimo no número de folhas, à medida que se adicionou BAP no meio de cultivo. Contudo ocorreram modificações no formato das folhas que se apresentavam alongadas, estreitas, pequenas e amareladas à medida que se incorporavam doses crescentes de BAP.

O tratamento que continha 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T4) e o tratamento com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T3) foram os que apresentaram maior número de folhas. Obtiveram-se, nesses tratamentos rosetas que continham 63 (T4) e 60 (T3), folhas para o maior número e 22 (T4) e 14 (T3) folhas para o menor número. Pode-se definir que o meio com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T2) seja o tratamento intermediário; obtiveram-se rosetas com 32 folhas para o maior número e 10 para o menor número. Não houve diferença significativa quanto aos diferentes tipos de plântulas utilizados. Infere-se que o tipo de plântula não compromete formação de folhas, pois em todos os tratamentos houve a presença delas, ainda que deformadas, o que se atribui a divisões celulares provocadas pelo BAP (Figura 4).



**FIGURA 3** - Tamanho médio de brotos formados a partir de segmentos nodais de chapéu-de-couro cultivados *in vitro* em diferentes concentrações do meio MS. 1) meio MS ausente de regulador de crescimento; 2) meio MS+1,0mg. L<sup>-1</sup>; 3) meio MS+2,0mg. L<sup>-1</sup>; 4) meio MS+4,0mg. L<sup>-1</sup>. UFLA, Lavras/MG, 1999.



**FIGURA 4** - Número de folhas formadas em brotações de chapéu-de-couro cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio MS. 1) meio MS ausente de regulador de crescimento; 2) meio MS+1,0mg. L<sup>-1</sup>; 3) meio MS+2,0mg. L<sup>-1</sup>; 4) meio MS+4,0mg. L<sup>-1</sup>. UFLA, Lavras/MG, 1999.

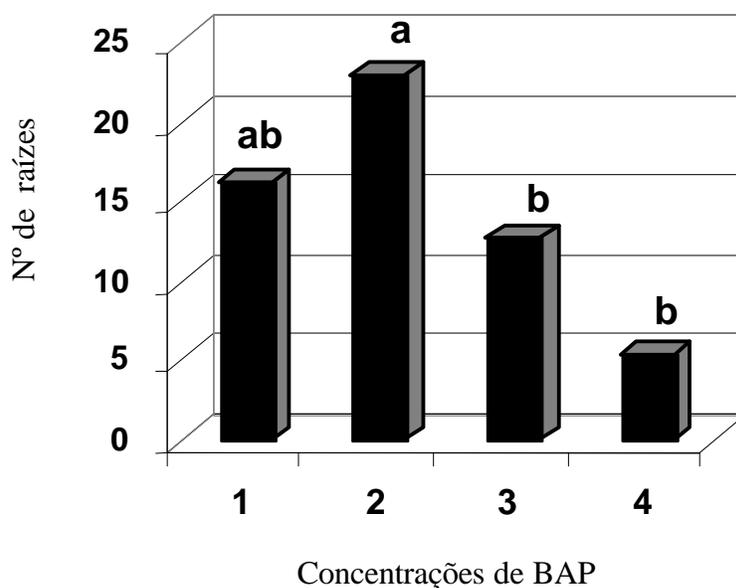
Para o caráter número de raízes tratamento sem regulador de crescimento (T1) e o tratamento que continha 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T2) foram os que promoveram o maior crescimento delas entretanto, o tratamento T2 foi mais eficiente, no qual o menor número de raízes obtido foi 5 e o maior 37; para o tratamento T1 o menor número de raízes obtido foi 6 e o maior 30. O esperado era que o meio ausente de regulador apresentasse a melhor resposta para essa variável. É provável que o BAP na concentração de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> (T2) seja o mais indicado para induzir a formação de raízes, pois estas mantiveram suas características morfológicas idênticas àquelas crescidas em meio MS ausente de regulador de crescimento (T1) (Figura 5).

À medida que o regulador de crescimento foi acrescido ao meio de cultivo, observou-se que o número de raízes tendeu a diminuir; no tratamento com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (T3) o menor número de raízes obtido foi 7 e o maior 21; o tratamento com 4,0mg.L<sup>-1</sup> de BAP

(T4) obteve 1 para o menor número de raízes e o maior 12, mas na maioria das repetições desse tratamento, apresentavam-se ausentes de raízes. A diminuição no número de raízes com o suplemento de BAP normalmente ocorre, porque a citocinina é um regulador de crescimento que inibe o sistema radicular. A indução e a inibição dependerão do balanço e da interação entre o fitohormônio que é endógeno e o regulador de crescimento que é exógeno.

Como não houve significância nos diferentes tipos de plântulas conclui-se que as mesmas não interferem na formação de raízes.

Estudos com *Strelitzia reginae* demonstraram que o desenvolvimento radicular ocorre em meio MS independente da presença de BAP ou não, sem promover diferenças no tamanho das raízes (Paiva, 1998). Já Lameira (1997) alcançou o melhor enraizamento de propágulos de *Cordia verbenacea* aos 32 dias após a incubação inicial em meio MS sem regulador de crescimento.



**FIGURA 5** - Número de raízes formadas em brotações de chapéu-de-couro cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio MS. 1) meio MS ausente de regulador de crescimento; 2) meio MS+1,0mg. L<sup>-1</sup>; 3) meio MS+2,0mg. L<sup>-1</sup>; 4) meio MS+4,0mg. L<sup>-1</sup>. UFLA, Lavras/MG, 1999.

## CONCLUSÕES

A concentração de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP no meio MS é a mais eficiente para se obter multiplicação de brotações, porém, estes, antes de serem levados para a aclimação devem ser repicados no meio MS sem regulador, para atingirem maior tamanho e melhor desenvolvimento foliar e radicular. De forma comercial, o meio MS adicionado de 1mg.L<sup>-1</sup> BAP seria o mais indicado, pois nele consegue-se um número satisfatório de brotações com boa formação de folhas e raízes.

Independente do tipo de plântulas utilizadas, todas desenvolvem-se bem nas concentrações usadas, e somente aquelas estando pequenas amarelas comprometem a indução de brotações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGOLLO, D.M.; SHEPHERD, S.L.K., Cultura de ápices meristemáticos caulinares de *Artemisia annua*. In: **JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 3.**, 1997, São Paulo. Resumos, Campinas: CPQBA – UNICAMP, 1997. P 72p.
- CARDOSO JÚNIOR, E.L. Homem e plantas medicinais: passado, presente e futuro. In: **SEMINÁRIO MINEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 2.**, 1996, Anais, Lavras: UFLA 1996. 1-4p.
- CLEMENTE FILHA, A.C. **Aspectos fisiológicos e fitoquímicos de *Bauhinia forficata* Link e *Plantago major* L.** Lavras: UFLA, 1996. 67p (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S; QUINTAS, L.E.M Plantas Medicinais: do cultivo à terapêutica Petropolis: Vozes, 1998. 246p.
- LAINETTI, R.; BRITO, N.R.S.. **A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro.** Rio de Janeiro: Ediouro, 1980. 120p.
- LAMEIRA, O.A. **Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva baleeira (*Cordia verbenacea* L.)** Lavras: UFLA, 1997. 88p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, 1995. 220p.
- MARTINS, M. **Utilização de anticorpos para caracterização da síntese de esporamina em diferentes tecidos de *Ipomoea batatas* obtidos de plantas cultivadas in vivo e in vitro.** Lavras: UFLA, 1997. 71p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen., v.15, p.473-479, 1962.
- PAIVA, P.D.O. **Estabelecimento in vitro de estrelícia (*Strelitzia reginae* Ait.) e controle de oxidação com identificação dos compostos liberados no meio de cultura,** Lavras: UFLA, 1998. 86p. (Tese Doutorado em Agronomia)
- PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. **Introdução a cultura de tecidos,** Lavras: ESAL. 1990. 73p. (Apostila).
- SALEH, E.O.L.; SHEPHERD, S.L.K. Estudos de germinação in vitro e ex vitro de *Clusia nemorosa* (Guttiferae). **JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 3**, 1997, São Paulo, Resumos, Campinas: CPQBA – UNICAMP, 1997, p.67.
- SIMÕES, M.O.M. **Ontogênese de gemas e raízes adventícias de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv Pêra cultivadas in vitro.** Viçosa: UFV, 1988. 56p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).