

CAPÍTULO 5

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO NA DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES DE *MORINGA OLEIFERA* LAM

Douglas Manoel Silva Costa
Jenipher Stephanie Pereira Das Neves
Ivonete Berto Menino
Ivaldo Antonio de Araújo
Luiz Eduardo Santos Lazzarini
Adna Cristina Barbosa de Sousa

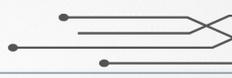
RESUMO

Moringa oleifera é uma espécie nativa das montanhas do Himalaia, resistente à seca, de rápido crescimento e pertencente à família Moringaceae. No Brasil, é encontrada em maior número na região Nordeste. Tem atraído o interesse de inúmeras pessoas devido aos benefícios nutricionais e medicinais que a espécie oferece. Isso se deve à resiliência da planta a uma variedade de climas, bem como as inúmeras propriedades que possui, incluindo a capacidade de aumentar a imunidade, potencial ação antioxidante, propriedades antimicrobianas, e têm um efeito hipocolesterolêmico e hipotensivo, principalmente por causa de seus valores terapêuticos e nutricionais, cujo potencial nutritivo é explorado principalmente para combater a desnutrição, tornando-se um alimento fundamental para a segurança alimentar em áreas com recursos econômicos limitado. O cultivo *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica que vem sendo aplicada para a germinação, multiplicação e conservação de diferentes espécies, porém, é um processo oneroso, que pode ter seus custos reduzidos pela modificação de alguns fatores, como o meio de cultura. A finalidade do presente estudo foi avaliar as melhores condições *in vitro* para germinação de *M. oleifera*, avaliando o efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO) na desinfestação de sementes de *M. oleifera*. Neste trabalho, observou-se que o tratamento de NaClO com concentração de 30% apresentou a menor porcentagem (%) de contaminação, representando 17% na cultura de *M. oleifera*. Apesar dos avanços obtidos nesse estudo, outros se fazem necessários para o estabelecimento de um protocolo eficiente para a desinfestação de sementes dessa espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Biotecnologia. Cultura De Tecidos Vegetais. Moringaceae.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Moringa* Lamarck pertence à família Moringaceae, compreende 13 espécies botânicas (SCHOCH *et al.*, 2020), sendo a *Moringa oleifera* a mais comum e utilizada no mundo. Conhecida por uma série de nomes como árvore da vida, baqueta, lírio-branco, acácia-branca ou moringa (RABBANI *et al.*, 2013). A espécie é uma árvore de porte alto que varia de 7 a 12 m de altura e pode atingir até 40 cm de diâmetro. A espécie é nativa das montanhas do Himalaia, do Noroeste do Paquistão ao Norte da Índia, e exibe crescimento rápido, raízes grossas e tuberosas, folhagens verdes claras, floração abundante e os frutos são vagens alongadas e pendulares (ASENSI; VILLADIEGO; BERRUEZO, 2017).



Há muito tempo é um componente da horticultura tradicional, usada principalmente para fins ornamentais e na medicina fitoterápica (OLSON; FAHEY, 2011). Isso se deve à resiliência da planta a uma variedade de climas, bem como as inúmeras propriedades que possui, incluindo a capacidade de aumentar a imunidade, potencial ação antioxidante, propriedades antimicrobianas, e têm um efeito hipocolesterolêmico e hipotensivo, principalmente por causa de seus valores terapêuticos e nutricionais, cujo potencial nutritivo é explorado principalmente para combater a desnutrição, tornando-se um alimento fundamental para a segurança alimentar em áreas com recursos econômicos limitados (MARRUFO *et al.*, 2013).

Devido a essas propriedades há necessidade de otimizar a forma de propagação da cultura, seja via semente ou por cultura de tecidos. Um problema observado na *M. oleifera* é que durante a propagação no campo, o tempo que a planta começa a ser produtiva é considerado alto de aproximadamente 1 ano, é necessário procedimentos que encurtem o prazo para o estabelecimento e produção das culturas, além de obter plantas de alta qualidade. Uma alternativa tecnológica é a propagação *in vitro* por sementes, que permite a produção de um grande número de plântulas com características genéticas desejáveis e altos padrões de sanidade das mudas, assim contribuindo para o desenvolvimento da agricultura, especialmente quando associadas aos campos de transformação genética, fitossanidade e fitotecnia (SOUZA *et al.*, 2006).

Nos estágios iniciais do cultivo *in vitro* das plantas, a seleção adequada da desinfestação de sementes é crucial. A remoção e eliminação de todos os microrganismos que possam potencialmente contaminar a cultura é necessária. Os meios de cultura por constituir uma parte fundamental da cultura de tecidos, fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos, controlando também o seu desenvolvimento (CYSNE, 2006). Os meios nutritivos precisam atender as necessidades de cada espécie vegetal no cultivo *in vitro*, assim deve-se recorrer a diversos ensaios já que existe um método diferente e eficaz para cada tipo de situação como: tipo de explante, genótipo, cultivar e objetivo (PASQUAL, 2001).

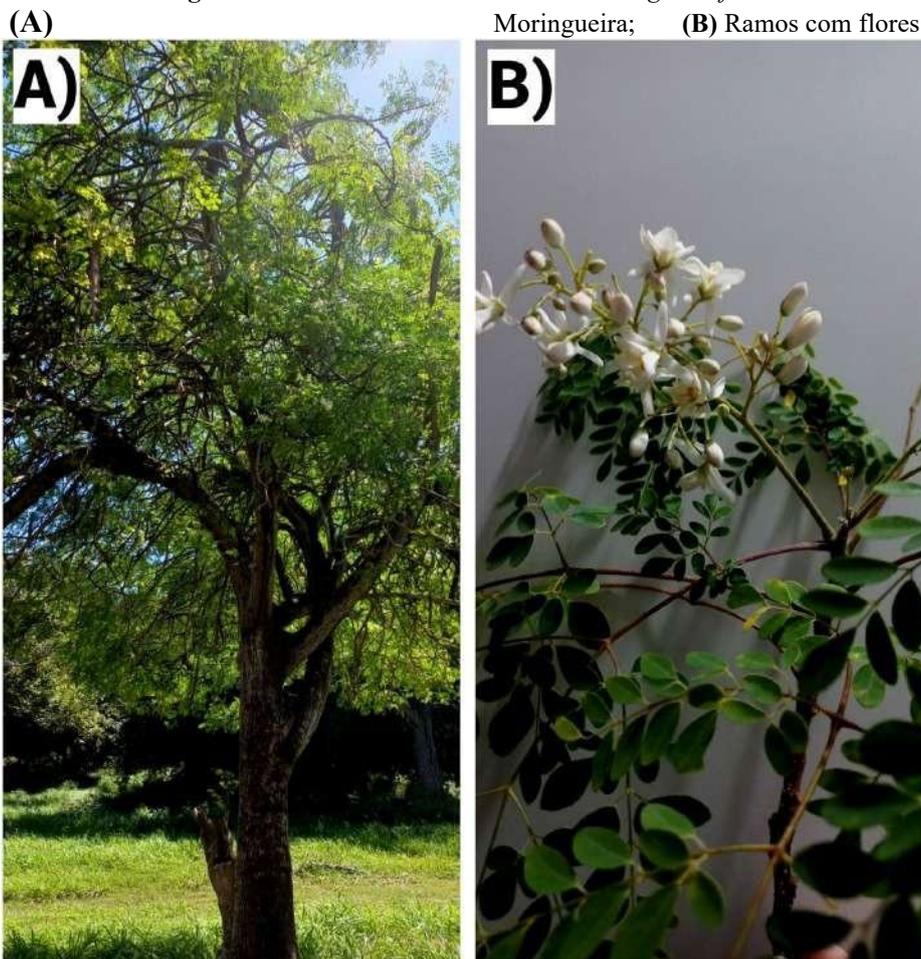
O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio na desinfestação superficial de sementes de *M. oleifera*.

2. MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pertencente à Estação Experimental Cientista José Irineu Cabral da Empresa Paraibana de Pesquisa, Extensão Rural e Regularização Fundiária (EMPAER), em João Pessoa-PB. As

sementes foram coletadas de plantas adultas de *M. oleifera*, de um cultivo domiciliar localizado na cidade de João Pessoa/PB (Figura 1) no bairro de Pedro Gondim, durante os meses de setembro de 2022 e outubro de 2022. Latitude de 7° 06'42.8"S e longitude de 34° 50'33.9" W.

Figura 1: Características botânicas da *Moringa oleifera*.



Cultivo localizado na cidade de João Pessoa/PB, latitude de 7° 06'42.8"S e longitude de 34° 50'33.9" W.

Fonte: Autoria própria (2022).

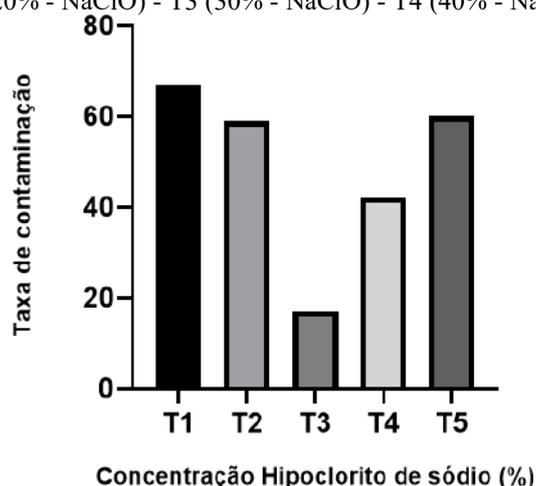
Após a coleta, foram armazenadas em condições de temperatura e luminosidade ambiente. Lavadas com água corrente e detergente durante 5 minutos. Depois, em câmara de fluxo laminar, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40 e 50%) v/v (2% de cloro ativo) por 10 minutos, sob agitação, e lavadas duas vezes em água destilada esterilizada, em seguida, foram imersas em álcool 96° (v/v) por 5 minutos, enxaguado por três vezes em água destilada esterilizada, seguindo protocolo proposto por Ridzuan *et al.* (2020) com modificações. Em câmara de fluxo laminar, simulando o ambiente asséptico, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro (250 mL), contendo 50 mL de meio WPM (LLOYD; MACCOWN, 1980) completo e sem regulador de crescimento, suplementado com 20 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg/L de mio-inositol, 6 g.L⁻¹ ágar,

e pH $5,7 \pm 0,1$, ajustado com NaOH e HCl (0,1 e 0,5 N, respectivamente), antes da autoclavagem (121° C, 25 min a 1,2 atm). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 12 repetições, sendo uma semente por frasco, totalizando 60 sementes. Após 10 dias, os tratamentos foram avaliados quanto à porcentagem de contaminação. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz por 8 horas de escuro, sob radiação de luz fluorescente branca de $45 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ na sala de incubação, à temperatura de 25 ± 1 °C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados mostrou que o tratamento III na concentração de 30% de hipoclorito de sódio mostrou-se mais eficaz na desinfestação das contaminações em relação aos outros tratamentos (Figura 2), com menor porcentagem de contaminação (17%) seguido pelo tratamento IV (42%). Os tratamentos I, II e V foram menos eficientes na desinfestação de sementes, com níveis de contaminação de 67%, 59% e 60% respectivamente. Apesar do tratamento III apresentar os menores índices de contaminação, observou-se que esse tratamento afetou a germinação das sementes, que foi inferior à do tratamento IV. Por esse motivo, na condução dos experimentos foi adotado como protocolo o tratamento IV, que mesmo apresentando maior nível de contaminação, em relação ao III, porém ainda aceitável, e com boa porcentagem de sementes germinadas.

Figura 2: Efeitos de diferentes concentrações de NaClO em porcentagem de taxa de contaminação. Tratamentos: T1 (10% - NaClO) - T2 (20% - NaClO) - T3 (30% - NaClO) - T4 (40% - NaClO) - T5 (50% - NaClO).



Fonte: Autoria própria (2022).

Há na literatura vários estudos sobre a desinfestação de sementes utilizando-se NaClO onde as concentrações utilizadas e duração de exposição variam muito. Por exemplo, Bevilacqua *et al.* (2011) utilizaram 2,5% de NaClO por 30 min em sementes de *Calendula officinalis* L. e obtiveram 6,1% de contaminação, enquanto Gonzaga (2021) utilizaram 5% de

NaClO por 20 minutos e obtiveram 63% de contaminação em sementes de *Lychnophora pohlii*. Já Lameira, Cordeiro e Campelo (2020) usaram 2% de NaClO por 20 min e obtiveram 10% de contaminações. Resultados aproximados aos do presente trabalho foram encontrados por Chau e Quang (2019) na qual utilizaram 30% por 10 minutos para esterilização de sementes de *M. oleifera*, obtendo uma taxa de 4,2% de contaminação. Por outro lado, Förster, Mewis e Ulrichs (2013) não conseguiram alcançar a desinfestação de sementes de *M. oleifera* devido ao alto grau de contaminação fúngica e bacteriana. Enquanto Ridzuan *et al.* (2020) obteve 2,5% de contaminação utilizando 20% de hipoclorito durante 15 minutos. A desinfestação da semente é uma das etapas mais importantes do processo de germinação *in vitro*, visto que a contaminação pode ser endógena ou exógena, sendo a mais comum exógena, quando fungos e bactérias se aderem ao tegumento da semente e se desenvolvem no momento do estabelecimento em meio de cultura e são difíceis de serem eliminados (Figura 3) (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). O uso de substâncias desinfestantes como etanol, hipoclorito de sódio e de cálcio, peróxido de hidrogênio, ácido clorídrico, ácido sulfúrico são relatados como eficientes na desinfestação de diferentes explantes de espécies vegetais (MÜLLER *et al.*, 2017).

Figura 3. Sementes de moringa com presença de contaminação após 10 dias de inoculação.



Fonte: Autoria própria (2022).

O hipoclorito de sódio é amplamente utilizado na desinfestação superficial de material vegetal, por ser facilmente removível durante a lavagem com água. Além da eficiência como agente de desinfestação, o hipoclorito pode atuar como estimulante da germinação em virtude da capacidade de estimular a atividade da α -amilase (KANEKO; MOROHASHI, 2003). O NaClO também foi eficiente na desinfestação de sementes *in vitro* de outras espécies florestais, como a *Amburana cearenses* (CAMPOS *et al.*, 2013), *Eugenia uniflora* (SILVA *et al.*, 2014) e

Aspidosperma polyneuron (RIBAS *et al.*, 2017). Lencina *et al.* (2013), no trabalho com *Apuleia leiocarpa*, encontraram influência do tempo de imersão em hipoclorito de sódio a 5% na desinfestação das sementes, sendo os maiores tempos os mais eficientes (15 min: 3% de contaminação, 10 e 5 min: 7% de contaminação). Nietsche *et al.*, (2006), afirmam que dependendo do tempo de imersão de desinfetantes pode ocorrer desidratação do explante, comprometendo assim a viabilidade do tecido vegetal. Nesse sentido é essencial que se determine uma concentração ótima para se obter tecido livre de agentes contaminantes e, conseqüentemente, um bom resultado no final do processo de estabelecimento *in vitro*. Além da contaminação, outro aspecto importante para a continuidade da cultura de tecidos são as taxas de germinação das sementes inoculadas.

4. CONCLUSÕES

Nas condições em que foram desenvolvido este trabalho pode-se chegar a conclusão de que o tratamento mais indicado para a desinfestação de sementes de *M. oleifera* é o que utiliza 30% de hipoclorito de sódio (NaClO) com o tempo de exposição mínimo de 10 minutos.

REFERÊNCIAS

- BEVILACQUA, C. B. *et al.* Desinfestação superficial, germinação e regeneração *in vitro* a partir de sementes de calêndula. **Ciência Rural**, v. 41, p. 761–766, 2011. <https://www.scielo.br/j/cr/a/dwkVkhfNcmbwK35k8RpqXSD/abstract/?lang=pt>. Acessado em: Set, 2022.
- CAMPOS, V. C. A. *et al.* Micropropagation of umburana de cheiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 4, p. 639-644, 2013. <https://www.scielo.br/j/cflo/a/tb3NfPzccsqqsML6mCNHHYC/?lang=en&format=pdf>. Acessado em: Jul, 2022.
- CHAU, M. H.; QUANG, N. M. Shoot multiplication and plant regeneration from *in vitro* cultures of drumstick tree (*Moringa Oleifera* Lam.). **Journal of forestry science and technology**, n. 8, p. 3-12, 2019. <http://tapchikhcnln.vnuf.edu.vn/documents/5898355/38787625/1.TA.MaiHaiChau%2CQuang.pdf>. Acessado em: Jun, 2022.
- CYSNE, J. R. B. **Propagação *in vitro* de *Moringa oleifera* L.** 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- DOMÉNECH ASENSI, G.; DURANGO VILLADIEGO, A. M.; ROS BERRUEZO, G. *Moringa oleifera*: Revisión sobre aplicaciones y usos en alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 67, n. 2, p. 86–97, 2017. https://www.researchgate.net/publication/322333702_Moringa_oleifera_Revision_sobre_aplicaciones_y_usos_en_alimentos. Acessado em: Set, 2022.

FÖRSTER, N.; MEWIS, I.; ULRICHS, C. *Moringa Oleifera*—Establishment and Multiplication of Different Ecotypes *In Vitro*. **Gesunde Pflanzen**, v. 65, n. 1, p. 21–31, 2013. https://www.researchgate.net/publication/257496668_Moringa_Oleifera-Establishment_and_Multiplication_of_Different_Ecotypes_In_Vitro. Acessado em: Out, 2022.

GONZAGA, A. P. D. *et al.* Desinfestação e germinação *in vitro* de *Lychnophora pohlii*. **Advances in Forestry Science**, v. 8, n. 1, p. 1253–1259, 2021. <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/AGRARIAS/Desinfestacao.pdf>. Acessado em: Set, 2022.

KANEKO, Y.; MOROHASHI, Y. The effect of sodium hypochlorite treatment on the development of α -amylase activity in mung bean cotyledons. **Plant Science**, v. 164, n. 2, p. 287–292, 2003. https://www.researchgate.net/publication/222064839_The_effect_of_sodium_hypochlorite_treatment_on_the_development_of_a-amylase_activity_in_mung_bean_cotyledons. Acessado em: Nov, 2022.

LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C.; CAMPELO, M. F. Protocolo para obtenção de plantas de *Cedrela odorata* L. através da cultura de tecidos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, p.1-16, 2020.

LENCINA, K. H. **Germinação e multiplicação *in vitro* de grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.)**. 2013. 91f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8134503>. Acessado em: Jul, 2022.

MARRUFO, T. *et al.* Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil from Leaves of *Moringa oleifera* Lam. Cultivated in Mozambique. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10989–11000, 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6269949/>. Acessado em: Set, 2022.

MÜLLER, D. *et al.* Estabelecimento *in vitro* de *Zephyranthes* spp. **Biotechnología Vegetal**, v. 17, n. 1, p. 98–103, 2017. <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/NdVMz8WctYDmKSrSPjqQPfS/?format=pdf&lang=pt>. Data do acesso: 08-2022.

NIETSCHKE, S. *et al.* Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, v. 36, p. 989–991, 2006. <https://www.scielo.br/j/cr/a/6kQTdWDGH7YNT6tqdwX6xrt/?lang=pt>. Acessado em: Jun, 2022.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de copaíba – propagação *in vitro* de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Revista Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 33, p. 109-120, 2004. <https://www.scielo.br/j/rbs/a/HYy3hmgzLxYwvWTJhk4qyQm/?lang=pt>. Acessado em: Set, 2022.

OLSON, M. E. O.; FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales seca. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 82, n. 4, 2011. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532011000400001. Acessado em: Nov, 2022.

PASQUAL, M. Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, p.74, 2001.

RABBANI, A. R. C. *et al.* Pré-embebição em sementes de moringa. **Scientia plena**, v. 9, n. 5, p. 1-8, 2013. <https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/878>. Acessado em: Out, 2022.

RIBAS, L. L. F. *et al.* Micropropagation of *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. From in vitro germinated seedlings. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 391-402, 2017. <https://www.redalyc.org/pdf/534/53451635002.pdf>. Acessado em: Mai, 2022.

RIDZUAN, N. I. *et al.* Micropropagation and defence enzymes assessment of *Moringa oleifera* L. plantlets using nodal segments as explant. **South African Journal of Botany**, Special Issue on Moringa Research. v. 129, p. 56–61, 2020. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/6295256>. Acessado em: Jun, 2022.

SCHOCH, C. L. *et al.* **NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools**. Database, v. 2020, p.062, 2020.

SILVA, P. R. D. *et al.* A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through *in vitro* germination and micropropagation. **Annals of Forest Research**, v. 57. n. 1, p. 39-45, 2014. Disponível em https://www.researchgate.net/publication/273050223_A_regenerative_route_for_Eugenia_uniflora_L_Myrtaceae_through_in_vitro_germination_and_micropropagation. Acessado em: Set, 2022.

SOUZA, F. V. D. *et al.* Micropropagação. Introdução à micropropagação de plantas. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, p.152, 2006. <http://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00077860.pdf>. Acessado em: Jun, 2022.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. Silvicultura clonal: princípios e técnicas. 2 ed. Viçosa, MG: **Editora UFV**, p. 272, 2013.