

Efetividade de fontes e doses de silício para o crescimento, pigmentos fotossintéticos e teor de cardenólides em *Digitalis mariana* Boiss subsp. *Heywoodii* in vitro

Effectiveness of sources and doses of silicon for growth, photosynthetic pigments and cardenolide content in *Digitalis mariana* Boiss subsp. *Heywoodii* in vitro

Eficacia de fuentes y dosis de silicio para el crecimiento, pigmentos fotosintéticos y contenido de cardenólido en *Digitalis mariana* Boiss subsp. *Heywoodii* in vitro

Recebido: 16/12/2022 | Revisado: 14/01/2023 | Aceitado: 17/01/2023 | Publicado: 20/01/2023

Raíssa Couteiro Moura

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1557-2031>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: rcoultmoura@gmail.com

Rafael Marlon Alves de Assis

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8978-2867>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: rafamarlon7@gmail.com

João Pedro Miranda Rocha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2699-4931>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: jjoaomiranda7@gmail.com

Jeremias José Ferreira Leite

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2178-2972>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: jeremias12agro@gmail.com

Flávia Dionísio Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8282-4059>
Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Brasil
E-mail: flavia1808@hotmail.com

Jandeilson Pereira dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3708-2540>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: jandeilsonpereira@gmail.com

Suzan Kelly Vilela Bertolucci

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8796-7043>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: suzan@ufla.br

José Eduardo Brasil Pereira Pinto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1141-7907>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: jeduardo@ufla.br

Resumo

Digitalis mariana (Plantaginaceae) é considerada nativa do Oeste, Sudoeste e Centro-oeste da Europa. É uma espécie de interesse medicinal, dado principalmente por seus glicosídeos cardiotônicos usados no tratamento de insuficiência cardíaca. Modificações no meio de cultivo podem ser realizadas para melhorar o cultivo *in vitro*. Tem sido relatado que o crescimento e desenvolvimento de plantas são afetadas pela aplicação de Silício. Desta forma, objetivou-se avaliar o crescimento, teor de cardenólides totais e pigmentos fotossintéticos em *D. mariana* cultivadas sob diferentes fontes e doses de Silício em meio de cultura. O material vegetal foi estabelecido *in vitro*. Após esse processo, foram testadas três fontes de Silício: silicato de Potássio, de Cálcio e de Sódio nas concentrações de 0, 0,5, 1,5, 4,5, 7,5, 10,5 mg L⁻¹. Após 40 dias foi realizado a validação analítica e foram avaliados o crescimento, pigmentos fotossintéticos e cardenólides totais. As diferentes fontes e concentrações promoveram crescimento de parte aérea e raízes, aumentaram os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e de cardenólides. O uso de 0,5 mg L⁻¹ de silicato de sódio promoveu maior biomassa seca da folha e total. Silicato de cálcio e silicato de potássio na concentração de 4,5 mg L⁻¹ promoveram maiores teores de cardenólides. O cultivo de *D. mariana* sob fontes de Silício em concentrações diferentes mostra-se uma técnica promissora para a otimização da produção de mudas e metabólitos secundários.

Palavras-chave: Micropropagação; Plantas medicinais; Cardenólides; Glicosídeos cardiotônicos.

Abstract

Digitalis mariana (Plantaginaceae) is considered native to Western, Southwestern and Central western Europe. It is a species of medicinal interest, given mainly by its cardiotonic glycosides used in the treatment of heart failure. Modifications in the culture medium can be performed to improve the *in vitro* culture. It has been reported that plant growth and development are affected by silicon application. Thus, the objective was to evaluate the growth, total cardenolide content and photosynthetic pigments in *D. mariana* cultivated under different sources and doses of silicon in culture medium. Plant material was established *in vitro*. After this process, three sources of Silicon were tested: Potassium, Calcium and Sodium silicate at concentrations of 0, 0.5, 1.5, 4.5, 7.5, 10.5 mg L⁻¹. After 40 days, analytical validation was performed and growth, photosynthetic pigments and total cardenolides were evaluated. The different sources and concentrations promoted shoot and root growth, increased the levels of chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids and cardenolides. The use of 0.5 mg L⁻¹ of sodium silicate promoted higher leaf and total dry biomass. Calcium silicate and potassium silicate at a concentration of 4.5 mg L⁻¹ promoted higher levels of cardenolides. The cultivation of *D. mariana* under sources of silicon at different concentrations is a promising technique for optimizing the production of seedlings and secondary metabolites.

Keywords: Micropropagation; Medicinal plants; Cardenolides; Cardiotonic glycosides.

Resumen

Digitalis mariana (Plantaginaceae) se considera originaria del Oeste, Suroeste y Centro oeste de Europa. Es una especie de interés medicinal, dado principalmente por sus glucósidos cardiotónicos utilizados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Se pueden realizar modificaciones en el medio de cultivo para mejorar el cultivo *in vitro*. Se ha informado que el crecimiento y desarrollo de las plantas se ven afectados por la aplicación de silicio. Así, el objetivo fue evaluar el crecimiento, contenido total de cardenólidos y pigmentos fotosintéticos en *D. mariana* cultivada bajo diferentes fuentes y dosis de silicio en medio de cultivo. El material vegetal se estableció *in vitro*. Luego de este proceso se ensayaron tres fuentes de Silicio: Silicato de Potasio, Calcio y Sodio en concentraciones de 0, 0.5, 1.5, 4.5, 7.5, 10.5 mg L⁻¹. A los 40 días se realizó la validación analítica y se evaluó el crecimiento, pigmentos fotosintéticos y cardenólidos totales. Las diferentes fuentes y concentraciones promovieron el crecimiento de brotes y raíces, aumentaron los niveles de clorofila a, clorofila b, carotenoides y cardenólidos. El uso de 0.5 mg L⁻¹ de silicato de sodio promovió mayor biomasa foliar y seca total. El silicato de calcio y el silicato de potasio a una concentración de 4.5 mg L⁻¹ promovieron mayores niveles de cardenólidos. El cultivo de *D. mariana* bajo fuentes de silicio a diferentes concentraciones es una técnica prometedora para optimizar la producción de plántulas y metabolitos secundarios.

Palabras clave: Micropropagación; Plantas medicinales; Cardenólidos; Glucósidos cardiotónicos.

1. Introdução

Digitalis mariana pertence à família Plantaginaceae, é considerada nativa do oeste, sudoeste e centro-oeste da Europa (Jadhav *et al.*, 2018). É uma espécie de interesse medicinal, pois é fonte de glicosídeos cardiotônicos usados no tratamento de insuficiência cardíaca (Navarro *et al.*, 2000). Além dos efeitos cardiotônicos, trabalhos recentes com a espécie registraram atividades antitumorais, hepatoprotetoras e antioxidantes (Al-Snafi, 2017; Ebaid *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 2004).

O principal modo de propagação da espécie é por germinação de sementes em campo. Contudo, o conteúdo dos glicosídeos cardiotônicos obtidos na propagação convencional é bastante afetado pelas condições climáticas e do solo (Roca-Pérez *et al.*, 2004). Com o intuito de atender às demandas do mercado, estão sendo conduzidas em biotecnologia agrícola moderna e para produção em larga escala de glicosídeos cardiotônicos e seus derivados (Verma *et al.*, 2016).

A micropropagação é utilizada como uma forma alternativa de propagação, dando plantas homogêneas com o mesmo perfil fitoquímico e de alta qualidade fitossanitária (Sharafzadeh & Zare, 2011). Esta técnica consiste no cultivo de células ou tecidos vegetais sob condições químicas e físicas apropriadas, representando uma das áreas de maior êxito da biotecnologia (Korsangruang *et al.*, 2010). Desta forma, a micropropagação não só permite a maximização da produção de mudas com fidelidade genética, mas também garante a conservação do germoplasma (Reed *et al.*, 2011).

Entretanto, durante o cultivo *in vitro* as plantas ficam expostas a diferentes fatores que podem influenciar o êxito do crescimento das plantas, tais como, alta umidade dentro do recipiente de cultivo e as condições da sala de crescimento (temperatura, fotoperíodo e intensidade da luz) (Us-Camas *et al.*, 2014). Portanto, assim como em condições *ex vitro*, o cultivo *in vitro* pode ser influenciado por vários fatores como o genótipo, reguladores de crescimento, meio de cultivo, concentrações de sacarose, luz, temperatura, dentre outros (Reis *et al.*, 2009).

Modificações no meio de cultivo podem ser realizadas para melhoras no cultivo *in vitro*. Tem sido relatado que o crescimento e desenvolvimento de plantas são afetadas pela aplicação de Silício (Si) (Sahebi *et al.*, 2016). O efeito benéfico do Si sobre as plantas que sofrem de estresse abiótico ocorre frequentemente através da neutralização do estresse oxidativo através da modulação de enzimas antioxidantes (Ma, 2004).

Silício (Si) é um mineral amplamente encontrado em solos, como um macroelemento, tem um papel vital nos ciclos das plantas (Al-Mayahi, 2016). O Silício ajuda as plantas a tolerar diferentes tensões ambientais que estão presentes em condições de campo, como alta temperatura, seca, carga, UV, congelamento, desequilíbrio de nutrientes, salinidade, e toxicidade de metais (Sahebi *et al.*, 2015). O mecanismo de ação nas plantas mais divulgado é que o Si pode levar a ajustes osmóticos e diminuir o dano oxidativo em plantas submetidas a estresses (Saqib *et al.*, 2008).

Tendo em vista as diversas ações em plantas em campo, estudos têm avaliados os efeitos de aplicação de Si em no cultivo *in vitro* de plantas. O Silício induz a tolerância à desidratação no tecido ou nos níveis celulares, melhorando o estado da água (Gao *et al.*, 2006). Além disso, em plantas cultivadas *in vitro*, o Silício pode promover mudanças benéficas nas plantas, como maior desenvolvimento de processos fotossintéticos e produção de clorofila (Braga *et al.*, 2009).

Utilizando meio MS (Murashige & Skoog) modificado suplementado com silicato de potássio Sivanesan *et al.* (2011), notaram a diminuição da hiperidricidade em *Cotoneaster wilsonii*, além de diminuir significativamente o conteúdo de Malondialdeído nas brotações regeneradas da parte aérea em comparação com as plantas controle. Youssef *et al.* (2010), demonstraram que o Si é capaz de prevenir completamente o escurecimento dos tecidos da goiabeira (*Psidium guajava*) ao selar as extremidades cortadas dos explantes nodais com uma mistura de Silícios em quaisquer efeitos subsequentes para o restante da propagação *in vitro*. Investigando os efeitos do Si na hiperidricidade em *Ornithogalum dubium* cultivados *in vitro* Ziv (2010), observou que o meio líquido MS suplementado com Si usando um biorreator diminui consideravelmente a indução hiperidricidade da parte aérea, aumenta a força mecânica e a firmeza das plantas.

Devido às aplicações medicinais e industriais de *D. mariana*, além ser fonte natural de heterosídeos cardiotônicos, o seu cultivo *in vitro* pode ser uma alternativa de produção. Desta forma, objetivou-se avaliar o crescimento, percentual de cardenólídeos e pigmentos fotossintéticos em *D. mariana* subsp. *heywoodii* cultivadas sob diferentes fontes de Silício.

2. Metodologia

2.1 Estabelecimento do material vegetal *in vitro*

Para o estabelecimento do material vegetal *in vitro* foram utilizadas sementes de *Digitalis mariana* subsp. *heywoodii* (Jelitto Seeds®, Alemanha). As sementes passaram por um processo de assepsia em uma solução de Hipoclorito de sódio a 50% sob agitação por 10 minutos e, em câmara de fluxo laminar, lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada. Após a desinfestação as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 3% de sacarose e 0,5% de ágar, pH ajustado para $\pm 5,7$, e posteriormente mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 25 ± 2 °C e intensidade luminosa de $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2 Cultivo *in vitro* com Silício

Plântulas com 20 dias de idade foram inoculadas em tubos de ensaio contendo como suporte pontes de papel, 15 mL de meio MS líquido suplementado com 3% de sacarose, pH ajustado para $\pm 5,7$ e suplementação com diferentes fontes e doses do elemento Si. Foram avaliadas três fontes de Silício: silicato de potássio (K), silicato de cálcio (Ca) e silicato de sódio (Na) e, seis concentrações 0 (controle); 0,5; 1,5; 4,5; 7,5 e 10,5 mg L⁻¹.

Após 40 dias, foram avaliados os números de folhas (NF), comprimento de raiz (CR, cm), matérias secas (mg) de folha (MSF), raiz (MSR) e total (MST), razão raiz/parte aérea e teores de pigmentos fotossintetizantes e de cardenólídeos

totais. Para a determinação das matérias secas, os materiais vegetais foram desidratados em estufa de circulação forçada de ar 70 °C, até peso constante.

2.3 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

A extração dos pigmentos clorofila *a*, *b*, clorofila total (*a+b*) e carotenoides foi realizada segundo Santos *et al.* (2015) com as seguintes adaptações para o método: quantidade do material vegetal e do solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) não saturado com Carbonato de cálcio (CaCO₃). Foram utilizados 50 mg de de folhas frescas, sem a nervura central. Em seguida, o material vegetal foi incubado em 10 mL de DMSO, em tubos Falcon envoltos em folha de Alumínio e colocado em estufa sob temperatura de 65 °C, durante 24 horas. Após esse período, alíquotas das soluções (3 mL) foram transferidas para uma cubeta de quartzo com volume de 3 cm³ para realização das leituras de absorvância em espectro TECAN INFINITY M200 PRO operado com o sistema de processamento de dados I-control® versão 3.37. Utilizando-se os comprimentos de onda 480, 649 e 665 nm para carotenoides, clorofila *b* e *a*, respectivamente. Foi feita a leitura do branco, utilizando-se como apenas o DMSO. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

A partir das leituras obtidas determinou-se a concentração das Clorofilas *a*, *b* e carotenoides utilizando-se as equações propostas por Wellburn (1994): Clorofila *a* = (12,47 x A665) – (3,62 x A649); clorofila *b* = (25,06 x A649) – (6,5 x A665); carotenoides: (1000 x A480 – 1,29 x Ca – 53,78 x Cb)/220 , e a Clorofila total por meio da soma dos resultados encontrados das equações para Clorofila *a* e *b*, sendo os resultados expressos em mg g⁻¹.

2.4 Doseamento de cardenólídeos totais

A quantificação de cardenólídeos totais de *Digitalis mariana* subsp. *heywoodii* seguiu o protocolo analítico validado da Silva *et al.* (2022), cuja única modificação realizada foi a leitura em microplacas ao invés de cubetas. Diante dessa modificação, os parâmetros de validação de método analítico seletividade, repetibilidade, precisão intermediária e linearidade foram reavaliados seguindo os critérios do ICH (*International Conference on Harmonisation*) (ICH, 1994, 1996).

Folhas secas em estufa ventilada a 70 °C foram pulverizadas. Uma massa de cerca de 50 mg de folhas pulverizadas foi extraída com 1 mL de etanol a 70% (v/v) a 70 °C por sonicação, utilizando-se 1 ciclo ininterrupto de 30 min. Após esse período, o extrato ficou por 5 min em gelo, e então microcentrifugado a 13000 g por 10 min. Em seguida, foram adicionados ao sobrenadante 300 µL de acetato de Chumbo a 15% (p/v). Após incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram novamente microcentrifugadas. Uma vez removido o precipitado, 200 µL de solução aquosa de fosfato monossódico (Na₂HPO₂) a 10% (p/v) foram adicionados ao sobrenadante, e, em seguida, microcentrifugado. O sobrenadante foi transferido em partes iguais para dois microtubos e a eles adicionado 1 mL de clorofórmio:isopropanol (3:2 v/v), que foram microcentrifugados a 13000 g durante 5 min. A fase inferior foi transferida para um balão e, então rotaevaporada até seca.

2.5 Reação de coloração e leitura das absorvâncias

Para a quantificação dos cardenólídeos foi adicionado ao resíduo da extração um volume de 2 mL de Metanol (MeOH), seguido de sonicação até dissolução completa (1-2 min). A solução metanólica foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e em seguida, foram adicionados 5 mL de reagente de Baljet (95 mL de ácido pícrico a 1% + 5 mL de solução aquosa de Hidróxido de sódio, NaOH a 10%), completando-se o volume com MeOH. Após 20 minutos de reação, as leituras a 494 nm foram determinadas, frente ao branco. O branco foi adquirido transferindo-se 5 mL de reagente de Baljet para um balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com MeOH.

Para cada solução elaborou-se uma solução de compensação misturando-se 2 mL de solução metanólica da amostra obtida conforme descrito anteriormente, e diluindo para 10 mL com MeOH. O valor de absorvância obtido para a solução de compensação foi subtraído da leitura obtida para a amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata.

As leituras de absorção molecular no ultravioleta foram mensuradas sem microplaca no espectrofotômetro TECAN Infinity® M200 PRO operado pelo software I-control® versão 3.37. A substância de referência utilizada nos ensaios foi a β -metildigitoxina, com grau de pureza de 97% (CLAE).

2.6 Validação analítica para microplaca

A validação do método para a determinação do teor de cardenólídeos totais, expresso em β -metildigitoxina, foi realizada de acordo com os parâmetros e especificações da *International Conference on Harmonization* (ICH, 1996) e da RE n° 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (Brasil, 2003). Foram avaliados os parâmetros de seletividade e linearidade.

Seletividade: A seletividade do método foi avaliada a partir dos espectros de absorção molecular no ultravioleta a 494 nm das soluções de leitura com e sem a adição do reagente Baljet. Para atestar a seletividade do método a solução de leitura sem Baljet não deve apresentar absorção significativa no comprimento de onda da leitura.

Linearidade: Foram construídas duas curvas de calibração, empregando-se duas soluções metanólicas estoques (0,50 mg/mL) de β -metildigitoxina preparadas em dias consecutivos. As concentrações finais de β -metildigitoxina nas soluções de leitura foram 0,004 mg/mL; 0,0125mg/mL; 0,025mg/mL; 0,05mg/mL e 0,075mg/ml.

Precisão: A precisão intradia foi avaliada pela análise de seis amostras a 100% da concentração de β -metildigitoxina na curva analítica ($n=6$). Da mesma forma, a precisão interdia foi determinada em dois dias consecutivos e por analistas diferentes ($n=12$). Os desvios padrão relativos (DPR) foram calculados para os teores encontrados nas determinações ($n=6$ e $n=12$, respectivamente).

2.7 Doseamento dos cardenólídeos totais

O preparo das amostras e as leituras das absorvâncias para a determinação dos teores de cardenólídeos totais nas amostras de folhas de *D. mariana* subsp. *heywoodii*, cultivadas sob fontes de Silício, foram obtidos conforme descrito anteriormente. Com base nos parâmetros da curva analítica, chegou-se a equação utilizada para o cálculo dos teores percentuais de cardenólídeos totais (CT), expressos em β -metildigitoxina: $\%CT = 0,283x(A+0,213)/m$, onde A corrigida = absorvância corrigida a 494 nm, m = massa do material vegetal em grama, neste caso foi de 0,05g.

2.8 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dezoito tratamentos, quatro repetições e doze plântulas por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. O programa Statistica versão 13.4.0.14 foi utilizado para análise dos dados.

3. Resultados e Discussão

3.1 Validação analítica

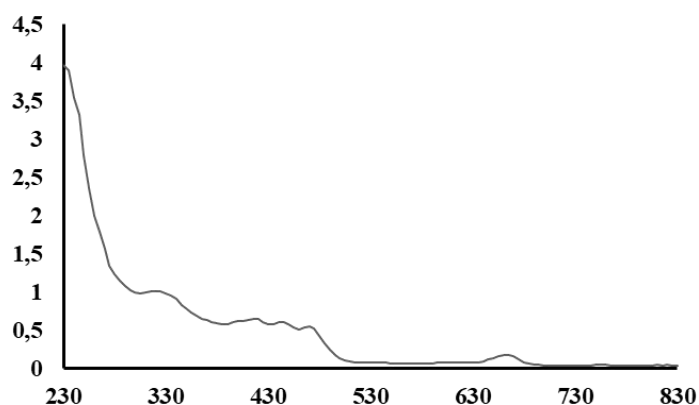
3.1.1 Seletividade

O ensaio de seletividade foi realizado a partir das soluções de leitura de *D. mariana* subsp. *heywoodii* com e sem o reagente de Baljet para verificação de possíveis interferentes nas amostras. Os espectros no ultravioleta registrados para as duas soluções de leitura na faixa de 230 a 830 nm estão representados nas Figuras 1 e 2.

No espectro da solução de leitura sem adição do reagente de Baljet foi observado uma pequena absorção no comprimento de onda de leitura (494 nm). Essa pequena absorção não afeta a seletividade do método, pois a mesma é neutralizada pela solução de compensação, cuja absorbância é descontada da absorbância obtida das soluções de leitura com o reagente cromogênico.

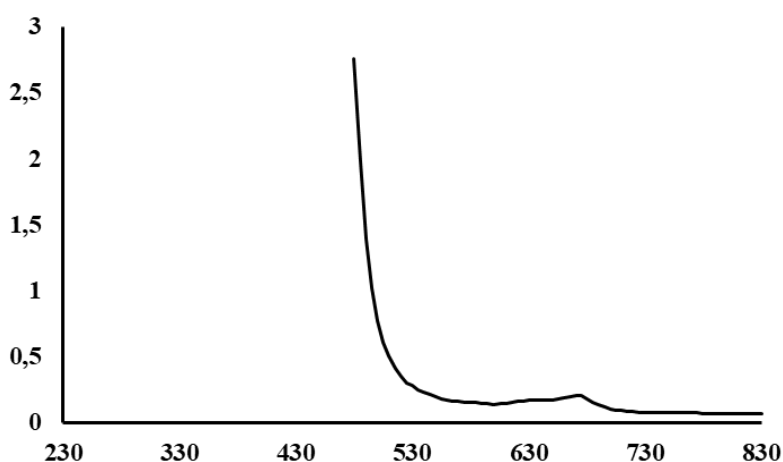
No espectro de varredura obtido para as soluções de leitura com o reagente de Baljet nota-se uma banda intensa e com máximo de absorção a 494 nm, evidenciando que mesmo na presença de interferentes contidos nos extratos é possível quantificar o complexo formado entre o reagente de cor e o anel γ -lactônico insaturado das estruturas químicas dos cardenólídeos, desde que seja utilizada a solução de compensação para subtrair a coloração dos extratos.

Figura 1 - Espectro de varredura no UV do extrato de *D. mariana* subsp. *Heywoodiis* em adição do reagente Baljet, frente ao metanol.



Fonte: Autores (2023).

Figura 2 - Espectro de varredura no UV do extrato de *D. mariana* subsp. *heywoodii* com adição do reagente Baljet, frente ao reagente de Baljet.



Fonte: Autores (2023).

3.1.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da relação linear entre absorbância e concentração de cardenólídeos totais. Para a construção da curva analítica durante o estudo de linearidade, empregaram-se soluções com concentrações conhecidas de β -

metildigitoxina variando entre 0,004 a 0,075 mg/mL. As soluções foram preparadas e analisadas em dois dias diferentes. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 1.

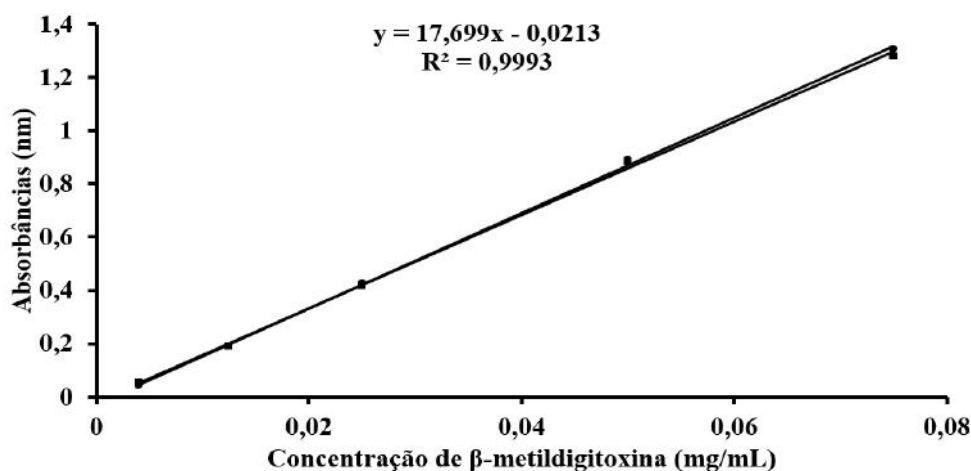
O método espectrofotométrico apresentou linearidade a 494 nm para a faixa de concentração estudada (0,004 mg/mL a 0,0755 mg/mL). A equação de regressão linear média obtida a partir de duas curvas de calibração, foi $y = 17,43x + 0,005$, em que y é a absorbância (nm) e x a concentração (mg/mL) em equivalente de β -metildigitoxina. O coeficiente de determinação obtido foi $R^2 = 0,9993$, indicando relação linear entre a faixa de concentração da substância de referência *versus* as absorbâncias a 494 nm (Figura 3). O coeficiente de determinação obtido supera o mínimo estabelecido pela ANVISA (Brasil, 2003) que considera o valor mínimo aceitável de $R^2 = 0,99$.

Tabela 1 - Dados empregados na construção da curva analítica do β -metildigitoxina para o doseamento espectrofotométrico de cardenólídeos.

Concentração de β -metildigitoxina (mg/mL)	Absorbância a 494 nm das repetições	
0,004	0,042	0,054
0,0125	0,192	0,192
0,025	0,426	0,416
0,05	0,889	0,883
0,075	1,305	1,280

Fonte: Autores (2023).

Figura 3 - Média das curvas analíticas de β -metildigitoxina obtidas por espectrofotometria (494 nm) para a quantificação de cardenólídeos. A equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) se referem à média das duas curvas.



Fonte: Autores (2023).

3.1.3 Precisão

Os resultados dos ensaios de repetibilidade (precisão intraleituras, $n=6$) e precisão intermediária (interleituras, $n=12$) encontram-se na Tabela 2. Os valores de desvio padrão relativo abaixo de 5% indicaram que o método analítico apresenta precisão intra-dia e inter-dias, segundo critérios da ANVISA (Brasil, 2003).

Tabela 2 - Teores de cardenólídeos totais em folhas de *D. mariana* subsp. Heywoodii, expressos em β -metildigitoxina, obtidos na determinação da precisão intracorridas e intercorridas.

Cardenolídeos Totais (%)		
Amostras	Intradia	Interdia
1	0,488	0,488
2	0,489	0,489
3	0,490	0,490
4	0,488	0,488
5	0,488	0,488
6	0,489	0,489
7	-	0,489
8	-	0,488
9	-	0,489
10	-	0,488
11	-	0,488
12	-	0,488
Teor médio (%)	0,489	0,488

Fonte: Autores (2023).

3.2 Crescimento e pigmentos fotossintéticos e cardenólídeos totais

As diferentes fontes de Silício e concentrações promoveram alterações no crescimento e na produção de pigmentos fotossintéticos em *Digitalis mariana* (Tabela 3 e Figura 4). Foi observado que em todos os tratamentos houve produção de pigmentos fotossintéticos, desenvolvimento de parte aérea e raízes. Houve interação significativa entre os fatores fontes de Silício e concentrações. A adição de silicato de cálcio a 4,5 mg L⁻¹ foi que resultou no maior número de folhas 15,83 (NF). Resultados semelhantes foram registrados em um trabalho realizado por Zhuo (1995) com micropropagação de *Phalaenopsis* usando silicato de cálcio também foi observado aumento do crescimento foliar.

A concentração de silicato de potássio a 0,5 mg L⁻¹ induziu maior crescimento de raízes 6,4 cm (CR). Em um estudo realizado por Soares *et al.* (2011), foi demonstrado que o crescimento das raízes de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio de cultivo suplementado com silicato de sódio e silicato de potássio foram significativamente aumentados. Em *Sorghum bicolor*, Hattori *et al.* (2005) observaram na formação de raízes, parte aérea e maior acúmulo de massa seca de raízes em plantas tratadas com Silício em comparação com plantas não tratadas com silício, indicando que o Silício facilita crescimento radicular. As diferentes respostas ao crescimento da plântula podem variar com as diferentes fontes de Silício e com a espécie em estudo. Lateef e Tangolar (2021) reportaram entre as fontes de Silício, a maior taxa de brotações (84,40%) foi encontrado no meio contendo silicato de sódio. O maior peso seco da parte aérea (0,026g) e da raiz (0,023 g) foram obtidos de silicato de potássio. Enquanto o número de raízes foi de 2,98 no meio contendo Potássio, foi determinado como 2,91 no meio contendo silicato de cálcio.

A biomassa seca da raiz (42 mg) em *Digitalis mariana* foi aumentada na fonte silicato de potássio em concentração de 10,5 mg L⁻¹. Romero-Aranda *et al.* (2006) também encontraram pesos mais elevados em tomates suplementados com silicato de potássio. Além disso, Lim *et al.* (2012) observaram os efeitos do Silício em duas cultivares de Begônia (*Begonia semperflorens*) cultivadas *in vitro* e observaram que a suplementação de silicato de potássio resultou em aumento do peso da planta. Os maiores resultados de peso de raízes podem estar relacionados à área e ao comprimento das raízes, uma vez que com o aumento da área de superfície, maior será a absorção de nutrientes e íons difusíveis.

Em relação a biomassa seca de folha (BSF) não houve diferença significativa entre as fontes de Silício variando de 51,29 mg a 56,37 mg (Tabela 3). No entanto, houve diferença entre as doses de cada fonte de Silício. A fonte silicato de cálcio a 1,5 mg L⁻¹ exerceu maior influência para biomassa seca da folha 70,80 mg (BSF).

Tabela 3 - NF (número de folhas); CR (comprimento de raiz), BSR (biomassa seca de raiz); BSF (biomassa seca de folha); BST (biomassa seca total); R:Pa (razão raiz e parte aérea); Cl a (clorofila a); Cl b (clorofila b) e carotenoides de *D. mariana* subsp. Heywoodii cultivadas sob fontes e concentrações de Silício. Médias seguidas da mesma letra não diferem segundo o Teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Fontes	Concentrações (mg L ⁻¹)	NF	CR (cm)	BSR (mg)	BSF (mg)	BST (mg)	R:Pa	Cl a mg g ⁻¹	Cl b mg g ⁻¹	Carotenoides mg g ⁻¹
Silicato Na	0	10,11 c	3,64 b	19,33 c	54,00 a	73,33 b	0,36 c	0,34 f	0,20 b	0,09 b
	0,5	12,72 b	4,51 b	36,00 b	64,33 a	100,33 a	0,56 b	0,37 e	0,11 c	0,09 b
	1,5	7,78 d	4,03 b	12,67 d	48,33 a	61,00 b	0,26 d	0,24 h	0,14 b	0,07 b
	4,5	9,10 c	3,97 b	12,67 d	52,33 a	65,00 b	0,24 d	0,33 f	0,09 c	0,03 c
	7,5	11,60 c	5,45 a	14,00 d	49,25 a	63,25 b	0,28 d	0,40 d	0,13 c	0,10 b
	10,5	10,77 c	5,85 a	13,33 d	39,50 a	52,83 b	0,33 c	0,67 b	0,22 b	0,15 a
Silicato Ca	0	10,11 c	3,64 b	19,33 c	54,00 a	73,33 b	0,36 c	0,34 f	0,20 b	0,09 b
	0,5	15,60 a	5,48 a	14,75 d	63,33 a	78,08 b	0,28 d	0,55 c	0,12 c	0,13 a
	1,5	6,62 d	3,97 b	18,67 c	70,80 a	89,47 a	0,26 d	0,20 i	0,07 d	0,07 b
	4,5	15,83 a	4,50 b	14,67 d	59,33 a	74,00 b	0,25 d	0,11 j	0,05 d	0,03 c
	7,5	10,33 c	3,64 b	10,00 d	44,00 a	54,00 b	0,23 d	0,34 f	0,24 b	0,07 b
	10,5	7,54 d	4,65 b	17,67 c	46,75 a	64,42 b	0,40 c	0,22 h	0,20 b	0,09 b
Silicato K	0	10,11 c	3,64 b	19,33 c	54,00 a	73,33 b	0,36 c	0,34 f	0,20 b	0,09 b
	0,5	11,27 c	6,40 a	24,00 c	50,50 a	74,50 b	0,47 c	0,26 g	0,08 d	0,07 b
	1,5	11,17 c	5,10 a	8,67 d	53,67 a	62,33 b	0,16 d	0,42 d	0,01 d	0,08 b
	4,5	9,97 c	2,80 b	18,00 c	47,75 a	65,75 b	0,41 c	0,75 a	0,03 d	0,13 a
	7,5	7,83 d	4,46 b	35,33 b	60,25 a	95,58 a	0,61 b	0,40 d	0,34 a	0,14 a
	10,5	7,83 d	3,15 b	42,00 a	53,03 a	95,03 a	0,84 a	0,37 e	0,17 b	0,11 b
Médias para fontes										
Silicato Na		10,35 a	4,58 a	18,00 b	51,29 a	69,29 a	0,34 b	0,39 b	0,15 a	0,09 b
Silicato Ca		11,01 a	4,31 a	15,85 b	56,37 a	72,22 a	0,30 b	0,29 c	0,15 a	0,08 c
Silicato K		9,70 a	4,26 a	24,56 a	53,20 a	77,75 a	0,48 a	0,42 a	0,14 a	0,10 a
Médias para concentrações										
0		10,11 b	3,64 c	19,33 a	54,00 a	73,33 a	0,36 b	0,34 c	0,20 a	0,09 a
0,5		13,20 a	5,46 a	24,92 a	59,39 a	84,31 a	0,44 a	0,39 b	0,10 b	0,10 a
1,5		8,52 b	4,37 b	13,33 b	57,60 a	70,93 a	0,23 b	0,28 c	0,07 b	0,07 b
4,5		11,63 a	3,76 c	15,11 b	53,14 a	68,25 a	0,30 b	0,40 b	0,06 b	0,07 b
7,5		9,92 b	4,52 b	19,78 a	51,17 a	70,94 a	0,37 b	0,38 b	0,24 a	0,10 a
10,5		8,71 b	4,55 b	24,33 a	46,43 a	70,76 a	0,52 a	0,42 a	0,20 a	0,12 a

Fonte: Autores (2023).

Analisando a biomassa seca total (BST) não houve diferença significativa entre as fontes de Silício. No entanto, houve diferença entre as doses dentro de cada fonte e a concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ obteve um maior peso seco de $100,33 \text{ mg}$ (Tabela 3). De acordo com Lim *et al.* (2012), a concentração ideal de Silício necessária para o crescimento e desenvolvimento das plantas varia entre os diferentes genótipos dentro da mesma espécie e entre as espécies vegetais. Da Silva *et al.* (2020) determinou a melhor concentração do meio basal MS e a eficiência de diferentes fontes de Silício e suas diferentes concentrações no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de Gérberas. Os autores reportaram que brotos de gérbera *in vitro* se regeneram e enraizaram melhor em MS $\frac{1}{4}$, e a regeneração de brotos é ainda mais reforçada quando $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de silicato de cálcio é adicionado ao meio de multiplicação.

A alocação de biomassa para as raízes pode tornar a planta mais apta a persistir sob condições adversas. A maior relação raiz:parte aérea (R:Pa) foi determinada na fonte de silicato de potássio $0,84$. A plântula alocou maior matéria vegetal para raiz em relação a parte aérea.

Figura 4 - Plântulas de *D. mariana* subsp. *Heywoodii* cultivadas sob fontes de Silício em diferentes concentrações (mg L^{-1}).



Fonte: Autores (2023).

Em plantas cultivadas *in vitro*, o Silício pode promover mudanças benéficas nas plantas, como maior desenvolvimento de processos fotossintéticos e produção de clorofila (Braga *et al.*, 2009). A concentração de 4,5 mg L⁻¹ de silicato de potássio promoveu maior produção de clorofila *a* (0,75 mg g⁻¹ matéria fresca). Quanto à clorofila *b*, os maiores resultados foram obtidos com silicato de potássio a 7,5 mg L⁻¹. A concentração de 7,5 mg L⁻¹ silicato de potássio também foi a mais vantajosa para a produção de carotenoides (0,14 mg g⁻¹).

A fotossíntese corresponde à entrada básica de energia para as plantas, é essencial para o crescimento das plantas e está diretamente ligada à estrutura das folhas (Braga *et al.*, 2009). Efeitos positivos da aplicação de Si são atribuídos à preservação da percentagem de água nas folhas, evitando assim a destruição de processos fotossintéticos e a produção de clorofila nas folhas (Mali *et al.*, 2008).

Os resultados das concentrações e fontes de Silício na produção de cardenolídeos de *D. mariana* subsp. *Heywoodii* estão representadas na Tabela 4. As culturas de células, tecidos e órgãos vegetais são capazes de produzir e acumular em grandes quantidades metabólitos secundários tanto quanto as plantas em campo. Pode-se observar que 4,5 mg L⁻¹ é a melhor concentração para obter maiores teores de cardenolídeos em *D. mariana* cultivada sob fontes de Silício. Quanto à fonte, silicato de sódio houve um aumento de 1,70 vezes no teor de cardenolídeos e silicato de cálcio e de potássio promoveram maior produção de cardenolídeos totais em *D. mariana* de 1,80 vezes em relação ao controle (Tabela 4). Khattab *et al.* (2022) reportaram que nano partículas de Sílica (Si-NPs) é um bom candidato para aumentar o crescimento e a multiplicação de *Lavandula officinalis* e modificar sua composição fitoquímica e bioatividade do seu óleo essencial.

Tabela 4 - Percentual de cardenolídeos totais Plântulas de *D. mariana* subsp. *Heywoodii* cultivadas sob fontes de Silício em diferentes concentrações. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente no Teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Fontes	Concentração (mg L ⁻¹)	Cardenolídeos (CT%)
Silicato Na	0	0,13 b
	0,5	0,10 c
	1,5	0,15 b
	4,5	0,22 a
	7,5	0,10 c
	10,5	0,11 c
Silicato Ca	0	0,13 b
	0,5	0,11 c
	1,5	0,10 c
	4,5	0,23 a
	7,5	0,15 b
	10,5	0,13 b
Silicato K	0	0,13 b
	0,5	0,13 b
	1,5	0,20 a
	4,5	0,23 a
	7,5	0,13 b
	10,5	0,14 b
Médias para fontes		
Silicato Na		0,13 c
Silicato Ca		0,14 b
Silicato K		0,16 a
Médias para concentrações		
0		0,13 c
0,5		0,11 d
1,5		0,15 b
4,5		0,23 a
7,5		0,13 c
10,50		0,13 c

Fonte: Autores (2023).

4. Conclusão

As diferentes fontes e concentrações promoveram crescimento de parte aérea e raízes, aumentaram os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e de cardenolídeos. O uso de 0,5 mg L⁻¹ de silicato de sódio promove maior biomassa seca da folha e total. Silicato de Sódio, Cálcio e Potássio na concentração de 4,5 mg L⁻¹ promove maiores teores de cardenolídeos. De acordo com esses achados, o cultivo de *D. mariana* subsp. *heywoodii* sob fontes de Silício em concentrações diferentes mostra-se uma técnica promissora para a otimização da produção de mudas e metabólitos secundários.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal de Lavras - UFLA pelo suporte e estrutura. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES – Finance Code 001) pela bolsa de produtividade, apoio técnico e pelo apoio financeiro.

Referências

- Al-Mayahi, A. M. W. (2016). Effect of silicon (Si) application on *Phoenix dactylifera* L. growth under drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) *in vitro*. *American Journal of Plant Sciences*, 7(13), 1711-1728.
- Al-Snafi, A. (2017). Nutritional and therapeutic importance of *Daucus carota* - A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 7(2), 72-88.
- Braga, F. T., Nunes, C. F., Favero, A. C., Pasqual, M., Carvalho, J. G. d., & Castro, E. M. d. (2009). Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(2), 128-132.
- Brasil. (2003). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003 - Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos.
- da Silva, D. P. C., de Oliveira, P. P. D., Herrera, R. C., Porto, J. M. P., dos Reis, M. V., & Paiva, R. (2020). Effectiveness of silicon sources for *in vitro* development of gerbera. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 141(1), 77-85.
- da Silva, G. M., Mohamed, A., de Carvalho, A. A., Pinto, J. E. B. P., Braga, F. C., de Pádua, R. M., Kreis, W., & Bertolucci, S. K. V. (2022). Influence of the wavelength and intensity of LED lights and cytokinins on the growth rate and the concentration of total cardenolides in *Digitalis mariana* Boiss. ssp. heywoodii (P. Silva and M. Silva) Hinz cultivated *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 151(1), 93-105.
- Ebaid, G. M. X., Faine, L. A., Diniz, Y. S., Rodrigues, H. G., Galhardi, C. M., Ribas, B. O., Fernandes, A. A. H., & Novelli, E. L. B. (2006). Effects of digitonin on hyperglycaemia and dyslipidemia induced by high-sucrose intake. *Food and Chemical Toxicology*, 44(2), 293-299.
- Gao, X., Zou, C., Wang, L., & Zhang, F. (2006). Silicon decreases transpiration rate and conductance from stomata of maize plants. *Journal of Plant Nutrition*, 29(9), 1637-1647.
- Hattori, T., Inanaga, S., Araki, H., An, P., Morita, S., Luxová, M., & Lux, A. (2005). Application of silicon enhanced drought tolerance in *Sorghum bicolor* [<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00481.x>]. *Physiologia Plantarum*, 123(4), 459-466.
- ICH. (1994). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *British journal of clinical pharmacology*, 37(5), 401.
- ICH. (1996). International conference on harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Methodology. *United States of America*.
- Jadhav, G., Ghanghav, S., & Singh, N. (2018). *Digitalis purpurea*: an overview of phytochemical and pharmacological profile. *Int. J. Pharmacogn*, 5, 563-570.
- Khattab, S., El Sherif, F., AlDayel, M., Yap, Y.-K., Meligy, A., & Ibrahim, H. I. M. (2022). Silicon dioxide and Silver nanoparticles elicit antimicrobial secondary metabolites while enhancing growth and multiplication of *Lavandula officinalis in-vitro* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 149(1), 411-421.
- Korsangruang, S., Soonthornchareonnon, N., Chintapakorn, Y., Saralamp, P., & Prathantururug, S. (2010). Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(3), 333-342.
- Lateef, S. Q., & Tangolar, S. (2021). Effect of different silicone sources and concentrations on *in vitro* micro propagation of 140 Ru grape rootstock. *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences*, 5(2), 221-228.
- Lim, M., Lee, E., Sonali, J., Iyyakkannu, S., & Jeong, B. (2012). Effect of potassium silicate on growth and leaf epidermal characteristics of begonia and pansy grown *in vitro*. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 30(5), 579-585.
- Ma, J. F. (2004). Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(1), 11-18.
- Mali, M., Aery, & Naresh, C. (2008). Silicon effects on nodule growth, dry-matter production, and mineral nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*) [<https://doi.org/10.1002/jpln.200700362>]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 171(6), 835-840.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Navarro, E., Alonso, P. J., Alonso, S. J., Trujillo, J., Pérez, C., Toro, M. V., & Ayuso, M. J. (2000). Cardiovascular activity of a methanolic extract of *Digitalis purpurea* spp. heywoodii. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(3), 437-442.
- Reed, B. M., Sarasan, V., Kane, M., Bunn, E., & Pence, V. C. (2011). Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(1), 1-4.
- Reis, É. S., Pinto, J. E. B. P., Rosado, L. D. S., & Corrêa, R. M. (2009). Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 31(2), 331-335.
- Roca-Pérez, L., Boluda, R., Gavidia, I., & Pérez-Bermúdez, P. (2004). Seasonal cardenolide production and Dop5βr gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. *Phytochemistry*, 65(13), 1869-1878.
- Romero-Aranda, M. R., Jurado, O., & Cuartero, J. (2006). Silicon alleviates the deleterious salt effect on tomato plant growth by improving plant water status. *Journal of Plant Physiology*, 163(8), 847-855.
- Sahebi, M., Hanafi, M. M., Akmar, S. N. A., Rafii, M. Y., Azizi, P., Tengoua, F. F., Azwa, N. M. J., & Shabanimofrad, M. (2015). Importance of silicon and mechanisms of biosilica formation in plants. *BioMed Research International*, 2015, 396010.

- Sahebi, M., Hanafi, M. M., & Azizi, P. (2016). Application of silicon in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 52(3), 226-232.
- Santos, R. P., Da Cruz, A. C. F., Iarema, L., Kuki, K. N., & Otoni, W. C. (2015). Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. *Ceres*, 55(4), 356-364.
- Saqib, M., Zörb, C., & Schubert, S. (2008). Silicon-mediated improvement in the salt resistance of wheat (*Triticum aestivum*) results from increased sodium exclusion and resistance to oxidative stress. *Functional Plant Biology*, 35(7), 633-639.
- Sharafzadeh, S., & Zare, M. (2011). Influence of growth regulators on growth and secondary metabolites of some medicinal plants from Lamiaceae family [Report]. *Advances in Environmental Biology*, 2296+.
- Sivanesan, I., Song, J. Y., Hwang, S. J., & Jeong, B. R. (2011). Micropropagation of cotoneaster wilsonii Nakai — a rare endemic ornamental plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(1), 55-63.
- Soares, J. D. R., Pasqual, M., Rodrigues, F. A., Villa, F., & Araujo, A. G. d. (2011). Silicon sources in the micropropagation of the *Cattleya* group orchid. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33(3), 503-507.
- Srivastava, M., Eidelman, O., Zhang, J., Paweletz, C., Caohuy, H., Yang, Q., Jacobson, K. A., Heldman, E., Huang, W., Jozwik, C., Pollard, B. S., & Pollard, H. B. (2004). Digitoxin mimics gene therapy with CFTR and suppresses hypersecretion of IL-8 from cystic fibrosis lung epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(20), 7693-7698.
- Us-Camas, R., Rivera-Solís, G., Duarte-Aké, F., & De-la-Peña, C. (2014). *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(2), 187-201.
- Verma, S. K., Das, A. K., Cingoz, G. S., & Gurel, E. (2016). *In vitro* culture of *Digitalis* L. (Foxglove) and the production of cardenolides: An up-to-date review. *Industrial Crops and Products*, 94, 20-51.
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313.
- Youssef, M. A., El-Helw, M. R., Taghian, A. S., & El-Aref, H. M. (2010). Improvement of *Psidium guajava* L. using micropropagation. *Acta Horticulturae*(No.849), 223-230.
- Zhuo, T.-S. (1995). The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 75(6), 605-607.
- Ziv, M. (2010). Silicon effects on growth acclimatization and stress tolerance of bioreactor cultured *Ornithogalum dubium* plants. *Acta Horticulturae*,(865), 29-35.