

Área: Sustentabilidade | Tema: Temas Emergentes em Sustentabilidade

**Efeito do extrato etanólico de folhas de oliveira no estabelecimento in vitro de sementes de
açoita-cavalo**

Effect of the ethanolic extract of olive leaves on the in vitro establishment of açoita-cavalo seeds

Jullie Dos Santos , Ana Cristina Da Fonseca Ziegler , Alana Silveira Pavlack, Berta Maria Heinzmann e Lia

Rejane Silveira Reiniger

RESUMO

Açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart.) é uma espécie arbórea de grande importância para a flora brasileira, porém sua frequência em florestas naturais tem sido prejudicada devido à germinação lenta e irregular das sementes além de poucas informações sobre sua viabilidade. Assim, a propagação in vitro surge como uma técnica promissora por proporcionar condições ideais de propagação da espécie, as quais podem ser melhoradas com o uso de metabólitos secundários oriundos de plantas medicinais como a oliveira, por exemplo, que têm sido estudada pela riqueza em moléculas bioativas presentes no extrato foliar, com atividades biológicas já comprovadas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato etanólico de folhas de oliveira na germinação e controle da contaminação de sementes de açoita-cavalo no ambiente in vitro. As sementes foram inoculadas em meio MS suplementado com extrato etanólico de folhas de oliveira diluído em diferentes concentrações, constituindo sete tratamentos (zero, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 e 2 mg L⁻¹) com 10 repetições cada. Após 30 dias avaliou-se a ocorrência de contaminação e a porcentagem de germinação das sementes. Os dados foram submetidos à ANOVA e regressão linear ($p < 0,05$) e para os dados não paramétricos aplicou-se o teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para a variável porcentagem de germinação, onde a concentração de 2 mg L⁻¹ (T7) obteve o pior resultado (10%) diferindo significativamente dos demais tratamentos cujos valores variaram de 42,5 (T5) a 57,5% (T2) de germinação. As concentrações testadas não foram promissoras no controle da contaminação in vitro. Concentrações acima de 1,5 mg L⁻¹ não são indicadas para a germinação de sementes de açoita-cavalo in vitro por desencadear possíveis efeitos tóxicos.

Palavras-Chave: *Luehea divaricata*; cultivo in vitro; metabólitos secundários

ABSTRACT

Açoita-cavalo (*Luehea divaricata*) is a tree species of great importance to the Brazilian flora, but its frequency in natural forests has been impaired due to the slow and irregular germination of seeds and little information on its viability. Thus, in vitro propagation appears as a promising technique because it provides ideal conditions for propagation of the species, which can be improved with the use of secondary metabolites from medicinal plants such as olive trees that have been studied for the richness of bioactive molecules present in the extract leaf activity, with proven biological activities. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of ethanolic extract of olive leaves on the germination and control of açoita-cavalo seeds contamination in vitro. The seeds were inoculated in MS medium supplemented with ethanolic extract of olive leaves diluted in different concentrations, constituting seven treatments (zero, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 and 2 mg L⁻¹) with 10 repetitions each. After 30 days, contamination occurrence and seed germination percentage were evaluated. Data were submitted to ANOVA and linear regression ($p < 0,05$) and for nonparametric data the Kruskal Wallis test ($p < 0,05$) was applied. There was significant difference ($p < 0,05$) only for the variable germination percentage, where the concentration of 2 mg L⁻¹ (T7) obtained the worst result (10%) differing significantly from the other treatments whose values ranged from 42,5 (T5) at 57,5% (T2) of germination. The concentrations tested were not promising in controlling in vitro contamination. Concentrations above 1,5 mg L⁻¹ are not indicated for germination of açoita-cavalo seeds in vitro as they trigger possible toxic effects.

Keywords: *Luehea divaricata*; in vitro cultivation; secondary metabolites

EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE OLIVEIRA NO ESTABELECIMENTO *in vitro* DE SEMENTES DE AÇOITA-CAVALO

1 INTRODUÇÃO

A exploração dos recursos florestais a fim de suprir a demanda por matéria prima ocasiona, frequentemente, a utilização posterior destas áreas desmatadas para fins agropecuários. Sendo assim as sementes são consideradas ponto de partida na produção de mudas para recomposição florística destes locais na tentativa de buscar possíveis soluções à degradação ambiental e escassez de recursos deste setor (GRAVE et al. 2007). Neste cenário, a adoção de metodologias adequadas de propagação de espécies importantes para a flora brasileira se faz necessária.

Açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart.) é uma espécie arbórea pertencente à família Malvaceae, com ocorrência desde o Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, considerada de grande importância por possuir madeira de boa qualidade, média retratibilidade e baixa resistência mecânica, ideal para a indústria moveleira. Além disso, apresenta propriedades medicinais relevantes e é indicada para reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente, pelo fato de ser uma espécie pioneira de crescimento rápido (PACHECO & FRANCO, 2008; GRAVE et al., 2007).

A ocorrência de açoita-cavalo nas florestas naturais tem sua frequência prejudicada principalmente por possuir sementes de germinação lenta e irregular, que varia entre 20 e 75%, além de poucas informações sobre sua viabilidade (FLÔRES, et al. 2011). Neste contexto, a propagação *in vitro* surge como uma técnica promissora na tentativa de proporcionar condições ideais de propagação desta espécie, em termos de assepsia e independência das condições ambientais como temperatura, luminosidade, umidade relativa, nutrição do solo, etc.

Um dos principais problemas enfrentados e que condiciona o sucesso desta técnica é o elevado grau de contaminação e a presença sistêmica de microrganismos que comprometem o estabelecimento *in vitro* das plântulas, competindo por nutrientes disponíveis no meio nutritivo (SANTOS et al. 2019). Para contornar estas dificuldades é importante a utilização de substâncias capazes de reduzir ou evitar a atuação destes patógenos.

Recentemente, várias plantas medicinais têm sido estudadas devido à sua riqueza em moléculas bioativas, entre as quais flavonoides e compostos fenólicos. Estes compostos são definidos como metabólitos secundários com forte atividade biológica, como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, hipoglicêmica, anti-hipertensiva e antiviral (GHOMARI et al. 2019). Neste contexto, o extrato foliar de oliveira (*Olea europaea* L.), árvore comum da região mediterrânea e conhecida mundialmente pela sua importância nutricional e medicinal, é descrito por apresentar atividades biológicas relevantes como antioxidante e antimicrobiana, devido principalmente à bioatividade de seus constituintes (oleuropeína, verbacosídeo, rutina, tirosol e hidroxitirosol) (GUEX et al., 2018).

Existem muitos estudos com espécies medicinais relacionados ao tratamento de doenças em humanos e animais. Entretanto, o uso destas plantas no controle de microrganismos fitopagênicos ainda é pouco explorado, principalmente no que se refere ao uso de metabólitos secundários oriundos de oliveira cultivada no Brasil. Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do extrato etanólico de folhas de oliveira na germinação e controle da contaminação de sementes de açoita-cavalo no estabelecimento *in vitro*.

2 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Extrativos Vegetais e no Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento da Universidade Federal de Santa Maria, no período de janeiro-junho/2019.

2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO

Foram coletadas folhas de árvores adultas de oliveira (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina cultivadas no município de Formigueiro – RS. Após a coleta, as folhas foram secas à temperatura ambiente, em seguida moídas e submetidas à extração com etanol em aparelho do tipo Soxhlet durante oito horas. Após este processo o extrato foi evaporado para a retirada do solvente e deixado em dessecador até a secagem e, em seguida, armazenado em congelador até o uso.

2.2 ISOLAMENTO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para este experimento foram utilizadas sementes viáveis de açoitaca-coleto coletadas de árvores adultas localizadas no município de Ijuí – RS. Inicialmente, as sementes foram imersas em água quente (60°C) durante 10 minutos e em seguida submetidas à desinfestação superficial, que constou de lavagem em solução de álcool 70% por um minuto, seguida de única lavagem em água destilada e autoclavada. A seguir, as sementes foram mergulhadas em soluções de hipoclorito de sódio 3% (10 min.) e hipoclorito de cálcio 2% (10 min.), respectivamente. Logo após, realizou-se triplice lavagem em água destilada e autoclavada para retirada do excesso de hipoclorito.

As sementes foram inoculadas em frascos de vidro preenchidos com 25 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de ágar, 100 mg L⁻¹ de mioinositol e diferentes concentrações de extrato de oliveira, primeiramente diluído em etanol absoluto e em seguida diluído junto ao meio conforme tratamento (Quadro 1). Antes da transferência das sementes para o interior dos frascos, o pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1, seguido de autoclavagem a 120 °C e 108 kPa, por 20 minutos. Os frascos contendo as sementes foram acondicionados em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 20 μmol m⁻² s⁻¹ a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias do tipo luz do dia, permanecendo nestas condições por 30 dias.

2.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo constituído de sete tratamentos que corresponderam a diferentes concentrações de extrato de oliveira (0; 0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,5 e 2 mg L⁻¹) diluídas ao meio de cultura. Cada tratamento consistiu de 10 repetições compostas por um frasco contendo quatro sementes.

Passados 30 dias de isolamento realizou-se a avaliação das porcentagens de germinação e contaminação (fúngica e bacteriana) das sementes. Os dados referentes à porcentagem de contaminação não corresponderam aos pressupostos de uma distribuição normal, sendo submetidos à análise pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis a 5% de probabilidade. Os dados de porcentagem de germinação foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e regressão linear a 5% de probabilidade, sendo que as análises estatísticas foram realizadas pelo software SISVAR (FERREIRA, 2011).

Quadro 1 – Tratamentos utilizados para avaliação do efeito do extrato etanólico de folhas de oliveira no estabelecimento *in vitro* de sementes de açoitaca-coleto.

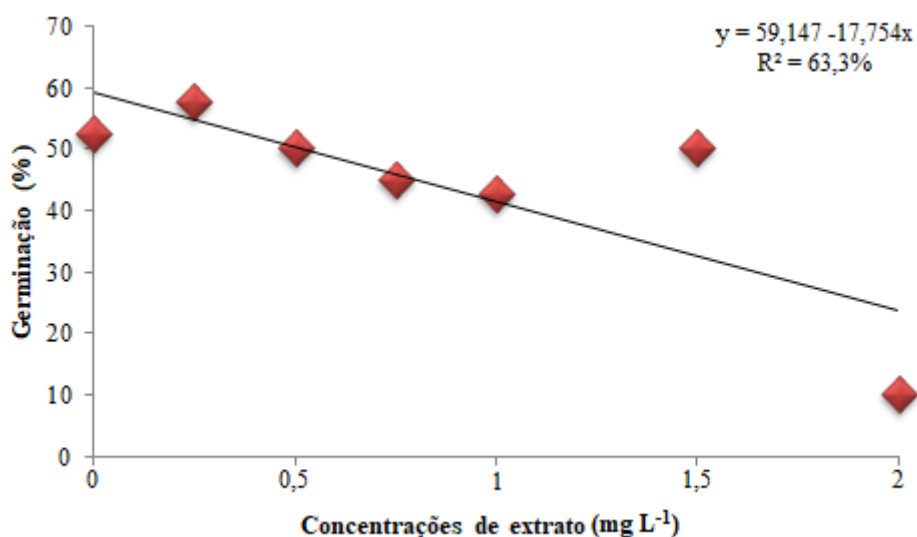
Tratamentos	Concentrações de extrato (mg L ⁻¹)
T1	0 (controle)
T2	0,25
T3	0,50
T4	0,75
T5	1,0
T6	1,5
T7	2,0

Fonte: autores.

3 RESULTADOS

De acordo com a análise dos resultados foi possível observar diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos apenas para a variável porcentagem de germinação. No geral, pode-se visualizar um efeito dose-dependente, pois na medida em que se elevou as concentrações do extrato houve uma diminuição gradual da porcentagem de sementes germinadas. A maior média foi observada para o T2 (0,25 mg L⁻¹) com 57,5% de germinação diferindo significativamente ($p < 0,05$) apenas do T7 (2 mg L⁻¹) que exibiu 10% de sementes germinadas (Figura 1). A queda acentuada da variável observada para as concentrações acima de 1,5 mg L⁻¹ sugere a ocorrência de uma possível toxicidade do extrato, o que comprometeu o estabelecimento das plântulas. A aparência das sementes germinadas para o T2 e T7 pode ser visualizada nas figuras 2A e 2B, respectivamente.

Figura 1 – Porcentagem de sementes de açoita-cavalo germinadas *in vitro* em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas de oliveira



Fonte: autores.

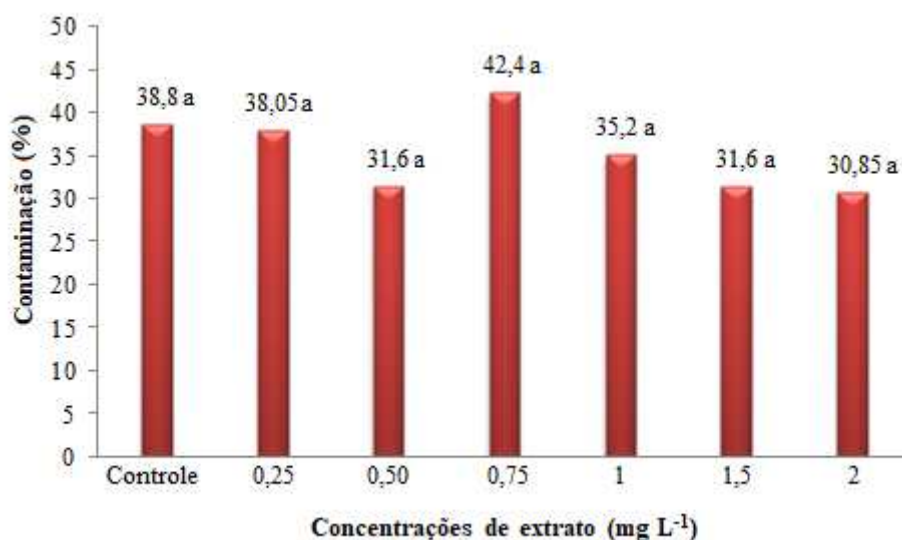
Figura 2 – Sementes de açoita-cavalo germinadas *in vitro* em meio de cultura MS suplementado com 0,25 mg L⁻¹ (A) e 2,0 mg L⁻¹ (B) de extrato etanólico de folhas de oliveira



Fonte: autores.

Conforme teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) para a variável não paramétrica porcentagem de contaminação, não houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo observada a menor média para o T7 (2 mg L^{-1}) com 30,85%. Já o T4 ($0,75 \text{ mg L}^{-1}$) foi o tratamento cuja concentração indicou menor eficiência no controle da contaminação apresentando a maior valor (42,4%), seguido do tratamento controle com média de 38,8%. Os demais tratamentos exibiram valores intermediários variando de 31,6 a 38,05% (Figura 3). Apesar de não haver diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$) foi possível visualizar uma queda gradual dos valores a partir da concentração de 1 mg L^{-1} , tal comportamento instiga a realização de novos testes.

Figura 3 – Teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) para os dados de contaminação em sementes de açoita-cavalo *in vitro* inoculadas em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de extrato etanólico de folhas de oliveira



Fonte: autores.

4 CONCLUSÕES

As concentrações testadas do extrato etanólico de folhas de oliveira não foram promissoras no controle da contaminação *in vitro* de sementes de açoita-cavalo, apesar de

observada uma tendência à diminuição dos valores com o aumento das mesmas. Concentrações a partir de 1,5 mg L⁻¹ não são indicadas para a germinação de sementes de açoita-cavalo *in vitro* por desencadear possíveis efeitos fitotóxicos aos propágulos. Tais resultados sugerem a realização de novos testes envolvendo a busca pelas substâncias responsáveis pela fitotoxicidade detectada para o extrato, visando avaliar seu potencial no controle de ervas-daninhas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FLÔRES, A. V.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; da CUNHA, A. C. M. C. M.; GOLLE, D. P.; BASSAN, J. S. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* mart. & zucc. **Ciência Florestal**, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011.

GRAVE, F.; FRANCO, E. T. H.; PACHECO, J. P.; SANTOS, S. R. Crescimento de plantas jovens de açoita-cavalo em quatro diferentes substratos. **Ciência Florestal**, v. 17, n.4, p. 289-298, 2007.

GUEX, C. G.; REGINATO, F. G.; FIGUEREDO, K. C.; da SILVA, A. R. H.; PIRES, F. B.; JESUS, R. da S.; LHAMAS, C. L.; LOPES, G. H. H.; BAUERMANN, L. de F. Safety assessment of ethanolic extract of *Olea europaea* L. leaves after acute and subacute administration to Wistar rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 395-399, 2018.

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

PACHECO, J. P.; FRANCO, E. T. H. Indolbutyric acid in different diameters on the vegetative propagation of *Luehea divaricata*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1624-1629, 2008.

SANTOS, J.; PINHEIRO, M. V. M.; FONTANA, D. C.; SCHMIDT, D. PRETTO, M. M. Estabelecimento *in vitro* de oliveira ‘arbequina’ e ‘koroneiki’. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 2, p. 508-518, 2019.