

PRODUÇÃO DE CALOS *Cereus peruvianus* (CACTACEAE) EM MEIO DE CULTURA LIVRE DE ÁGAR

Laura Ivana Ramos (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Sandra Aparecida de Oliveira Collet (Orientador), e-mail: saocollet@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR.

Área: 20200005 – Genética; Subárea: 20203004 - Genética Vegetal

Palavras-chave: Cultura de calos, Cultura sem ágar, *Cereus peruvianus*.

Resumo:

A cultura de calos de *Cereus peruvianus* pode ser considerada uma potencial fonte de produção de polissacarídeos. O ágar, um polissacarídeo utilizado para gelificar o meio, interfere na composição dos polissacarídeos, o que resulta em superestimação da sua concentração na cultura de calos, visto que o ágar é detectado por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear. O cultivo dos calos em algodão coberto com papel filtro embebidos com meio MS líquido é uma alternativa para criar cultura de calos livres de ágar. Assim, a proposta deste estudo foi cultivar os calos de *C. peruvianus* nesta condição a fim de obter massa de calos suficiente para testar diferentes protocolos de extração de polissacarídeos e outros compostos de interesse farmacêutico. O cultivo em algodão coberto com papel filtro foi considerado adequado, uma vez que os calos apresentaram grande ganho de peso, um bom aspecto na coloração, e vivacidade.

Introdução

Cereus peruvianus é uma espécie de cactos da família Cactaceae conhecida popularmente no Brasil como Mandacaru e frequentemente utilizada como planta ornamental. Esta espécie também vem sendo estudada por produzir diversos compostos de interesse econômico, com aplicações industriais, na produção de cosméticos, na indústria de alimentos e inclusive com potencial farmacêutico. Essa cactácea produz uma goma viscosa com diferentes aplicações. A goma possui um polieletrólito natural bastante viscoso, que age como auxiliar de coagulação e floculação podendo ser utilizado no tratamento de águas, no tratamento de efluentes da indústria de papel e celulose e pode, também, ser utilizado na clarificação de extratos. Além disso, o composto péctico presente nesta goma, o ácido péctico, possui aplicações na indústria alimentícia, sendo utilizado no preparo de geleias, gomas, iogurtes e outros produtos (ALVAREZ et al., 1992).

As características estruturais do polissacarídeo da goma do *C. peruvianus* foram estudadas e galactose, arabinose e ramnose parecem ser os monossacarídeos constituintes (ALVAREZ et al., 1992). No estudo realizado por Machado et al. (2004), a composição de grupos glicosil foi descrita para os polissacarídeos tanto de tecidos

de caules como de calos desta espécie, e com esta análise foi possível constatar que os polissacarídeos são compostos principalmente de galactose, arabinose e ramnose nas proporções 5,6:2:1 e 24:1:2,6 respectivamente.

Estudos realizados por Machado et al. (2004) demonstraram que a cultura de calos é capaz de produzir quantidades significativas de um polissacarídeo semelhante encontrado em caule de plantas adultas. Os teores de carboidratos obtidos dos polissacarídeos extraídos de caules de plantas e de calos de *C. peruvianus*, foram estimados em 58,08% e 35,21% respectivamente. Ainda que, estes teores tenham sido menores em calos comparados com caules das plantas, modificação nas condições de cultivo, como a otimização do meio de cultura, pode induzir ou estimular um aumento na produção de compostos de interesse.

A cultura de calos é, portanto, uma via alternativa e importante para a obtenção de vários compostos de interesse que são originalmente produzidos pelas plantas de *C. peruvianus*. Esta metodologia permite o cultivo desta espécie *in vitro*, que pode ser propagada indefinidamente em meio suplementado e usada como fonte alternativa de polissacarídeos, substituindo o uso de plantas adultas (MACHADO et al., 2004). A cultura de calos de *C. peruvianus* foi estabelecida por Oliveira et al. (1995), e vem sendo mantida em meio de cultura MS suplementado com os reguladores de crescimento ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D; 4,0 mg·L⁻¹) e cinetina (KIN; 4,0 mg·L⁻¹), vitaminas do meio B5, e solidificado com 0,8% de ágar. Apesar dos calos estarem bem estabelecidos no referido meio, Nunes (2014), usando a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) detectou que o ágar, que é um polissacarídeo, utilizado para gelificar o meio interferiu na composição dos polissacarídeos desta cultura, superestimando a concentração de polissacarídeos presentes nos calos. Por isso, na tentativa de contornar esse problema, foi testado no presente estudo, uma forma alternativa para substituição do ágar do meio de cultivo dos calos de *C. peruvianus*.

Materiais e métodos

Os calos de *C. peruvianus* foram cultivados em algodão coberto com papel filtro. As placas de petri contendo uma camada fina de algodão e papel filtro foram autoclavadas em 120° C por 20 minutos. Posteriormente, o meio de cultura foi distribuído nas placas contendo a matriz esterilizada.

O meio utilizado no cultivo alternativo dos calos foi preparado da mesma forma que o meio da cultura convencional, mas sem o ágar. O meio de cultura utilizado foi o meio MS, formulado por Murashige e Skoog em 1962, que contém uma série de macro e micronutrientes, além de vitaminas B5, sacarose 3% e as combinações de reguladores de crescimento 4,0 mg·L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 4,0 mg·L⁻¹ da cinetina N-(2-furanilmetil)-1H-purina-6 amina (kin). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,6 e o meio autoclavado em 120 °C por 20 minutos.

Os calos foram mantidos em temperatura de 32 °C e sob um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. O crescimento dos calos foi monitorado durante todo o período do estudo e a cada 15-20 dias foram adicionados de três a cinco mL de meio líquido em cada placa para umidificar as matrizes e disponibilizar nutrientes para os calos. A cultura foi monitorada, a fim de garantir o crescimento da massa de calos com nutrientes e sem contaminação por microrganismos. As placas

contaminadas com microrganismos e calos escurecidos e necrosados foram descartadas.

Resultados e Discussão

Os calos de *C. peruvianus* cultivados em algodão coberto com papel filtro apresentaram crescimento e coloração compatíveis aos calos cultivados em meio solidificado com ágar (Figura 1), indicativo de que esta estratégia é adequada para obter e manter os tecidos de calos em meio de cultura na ausência de ágar. O uso de matrizes alternativas para o cultivo de tecidos vegetais não é uma técnica nova, uma vez que pontes de papel e suportes de espuma de plástico já foram usadas para substituir o ágar e o Gelrite (BARRUTO CID, 2014). Para a cultura de calos de *C. peruvianus*, em um projeto de pesquisa anterior, já foram testadas como matrizes alternativas para substituir o ágar, a areia, o sisal, e o algodão. E o algodão foi indicado como a melhor matriz para o desenvolvimento e crescimento dos calos. Na areia e no sisal muitos setores e até calos inteiros ficaram escurecidos e morreram no segundo mês de cultivo. Entretanto, os calos cultivados diretamente no algodão se desenvolveram entremeados às fibras de algodão. Desta forma, o procedimento adotado no presente estudo, cobrindo o algodão com papel de filtro, permitiu que os calos se desenvolvessem sem a mistura com o algodão, o que resultou em maior rendimento na extração de compostos de interesse (resultados apresentados em outro estudo).



Figura 1. Placas com calos de *Cereus peruvianus* cultivados em algodão e papel filtro embebidos com meio MS. Em (A) placa com calos antes do repique e em (B), (C) e (D) são placas com calos repicados.

Conclusões

A metodologia desenvolvida no presente estudo foi eficiente para o cultivo dos calos de *C. peruvianus* livres de ágar, e assim permitiu maior rendimento na extração de polissacarídeos produzidos pelos calos desta espécie de cacto. O desenvolvimento do presente projeto possibilitou o treinamento da discente com a Técnica de Cultura

de Tecidos Vegetais, mais especificamente, com a cultura de calos que podem ser usados para obtenção de metabólitos de interesse econômico e industrial.

Agradecimentos

Agradeço a Fundação Araucária pela bolsa concedida e ao laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal pela oportunidade de desenvolver este projeto.

Referências

ALVAREZ, M. et al. The anionic glycan from the cactus *Cereus peruvianus* - structural features and potencial uses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n.34, p.283-295, 1992.

BARRUETO CID, L. P. Cultivo in vitro de plantas, 3ª edição ampliada, Brasília, DF, EMBRAPA, 2014.

MACHADO, F. A. P. S. A. et al. Polysaccharide production from callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 313-316, 2004.

NUNES, A. R. C. **Estudo de Metodologias para Extração e Obtenção de Polissacarídeos de Calos de *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae)**. Trabalho de conclusão do curso de Tecnologia em Biotecnologia da Universidade Estadual de Maringá. 2014.

OLIVEIRA, S. A.; MACHADO, M. D. P. D.; PRIOLI, A. J.; MANGOLIN, C. A. In-Vitro Propagation of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 31, n. 1, p. 47-50, Jan 1995.