

PERFIL LIPÍDICO DA CULTURA DE CALOS DE *Cereus hildmannianus* (K.) Schum.

Aline Savam (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Arildo José Braz de Oliveira, Éverton da Silva Santos (Coorientador) Regina Aparecida Correia Gonçalves (orientadora)¹ e-mail: racgoncalves@uem.br¹

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Farmácia - Farmacognosia

Palavras-chave: ácidos graxos, *Cereus hildmannianus*, cultura *in vitro*, elicitores.

Resumo

O *Cereus hildmannianus* representa uma fonte importante de ácidos graxos poli-insaturados, porém o seu uso tradicional e comercial é feito a partir dos espécimes *in natura*. O presente trabalho visou otimizar a produção sustentável utilizando a biotecnologia vegetal associada a técnica de elicitação com o ácido salicílico, e avaliar a composição lipídica destas culturas. A elicitação se mostrou eficiente em aumentar a bioprodução de lipídeos, sobretudo a produção de ácidos graxos insaturados e saturados com o tratamento Ácido Salicílico 50 e Ácido Salicílico 200, respectivamente.

Introdução

Estudos *in vitro* e mesmo ensaios clínicos em humanos vêm demonstrando o potencial antineoplásico de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), como o ômega 3. A busca por esses compostos têm aumentado e, nesse sentido, o *Cereus hildmannianus* representa uma fonte importante (Jacomini, 2015). A espécie, que pertence à família Cactaceae, é utilizada na medicina tradicional na prevenção de doenças cardiovasculares e também apresenta potencial antineoplásico devido à presença de PUFAS (Jacomini, 2015). O presente estudo visou traçar o perfil lipídico utilizando Cromatografia a Gás acoplada a Detector por Ionização de Chamas (CG-DIC) dos extratos de *C. hildmannianus* cultivados em meio Murashige & Skoog (MS) tradicional, e em meio MS com diferentes concentrações do elicitor ácido salicílico (AS).

Materiais e métodos

Cultura de calos

A cultura de calos é mantida em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementada com vitaminas B5, ágar (8%), sacarose (3%), 4 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), e 4 mg L⁻¹ de N-(2 furanilmetil)-1H-

purina-6-amina (cinetina). Os calos são sub-cultivados a cada 45 dias em novos meios MS (cultura controle experimental).

Elicitação

A partir da solução estoque 5.000 $\mu\text{mol AS}$ ($\geq 99,0\%$; Sigma-Aldrich), filtrada em membranas de polietersulfona (PES; 0,22 μm), foram preparados meios MS com diferentes concentrações de AS (50, 100, 150, e 200 μmol). Os calos foram sub-cultivados nestes meios e incubados por 45 dias a 32 ± 1 °C com fotoperíodo de 16 h ($15 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$; *Photosynthetic Photon Flux Density* PPF) e após foram separados do meio de cultivo e liofilizados.

Metilação direta de ácidos graxos

Cerca de 100 mg de amostras de calos liofilizados (controle e elicitados), foram misturados em tubos com 2 mL de NaOH 1,25 mol L⁻¹ (em metanol). Os tubos foram colocados em banho ultrassônico, com 135 W de potência e 40 kHz, por 15 min. Decorrida a reação alcalina, 2 mL de H₂SO₄ 1,5 mol L⁻¹ (em metanol) foram adicionados e os tubos colocados em banho ultrassônico por 15 min; 1 mL de hexano foi adicionado, seguidos de agitação e centrifugação (2.000 rpm por 5 min, 3x). Por fim, as fases superiores foram coletadas e as amostras foram encaminhadas para análises por Cromatografia a Gás.

Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para a CCD, as amostras foram preparadas conforme descrito em Metilação direta de ácidos graxos. Foram utilizadas cromatoplasmas de alumínio (10x10 cm) da Merck recobertas com gel de sílica 60. Utilizou-se hexano:éter:ácido acético (80:20:2, V/V/V) como fase móvel e *p*-anisaldeído como agente revelador.

Cromatografia a Gás acoplada a Detector por Ionização de Chamas (CG-DIC)

As amostras foram quantificadas no Laboratório Interdisciplinar de Análises Biológicas e Químicas (LIABQ) da UNICESUMAR, utilizando o cromatógrafo a gás-Agilent®-7890B, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida HP5 (30 m x 250 μm d.i x 0,25 μm de espessura do filme). Para a análise foram injetados 2 μL das amostras (1:71), nas seguintes condições: temperatura inicial de 65 °C (4 min), em seguida rampa de 16° C min⁻¹ até 185°C (12 min), aquecimento de 20 °C min⁻¹ até 235 (14 min) e rampa de 35 °C min⁻¹ até 300 °C (1 min). As demais condições do método de análise foram: fluxo do gás de arraste (He, pureza 99,99%) igual a 1,4 mL min⁻¹, temperaturas do injetor de 235 °C, e do detector de 350 °C com fluxo de H₂ de 35 mL min⁻¹, fluxo de ar sintético de 300 mL min⁻¹ e fluxo reposição de N₂ de 25 mL min⁻¹. Os lipídeos foram identificados por comparação com padrão C4-C24 (*Fatty Acid Methyl*

Esthers, F.A.M.E.; Sigma–Aldrich). Através da integração dos picos e do cálculo com base na área correspondente, foi realizada a quantificação absoluta dos ácidos graxos nas culturas de calos controle e elicidadas de *C. hildmannianus*.

Resultados e Discussão

Cultura de calos elicidados e controle:

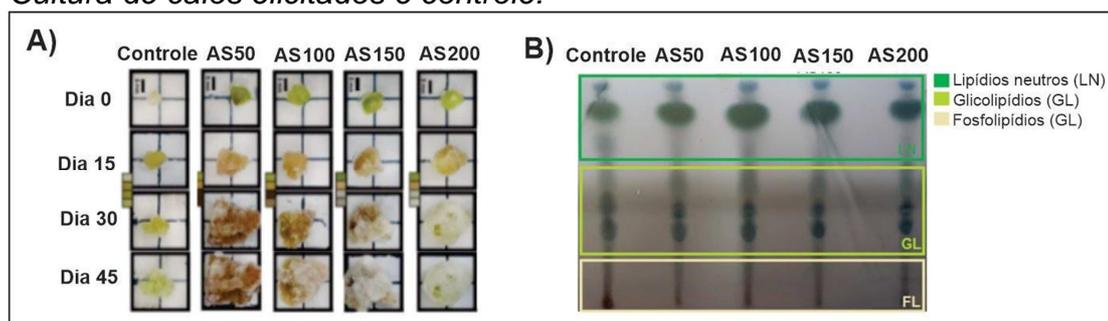


Figura 1: **A** - Crescimento de culturas de calos no dia zero, aos 15 dias, aos 30 dias e aos 45 dias das culturas de calos controle (sem elicitor) e elicidadas com 50µmol de AS (AS50), 100µmol AS (AS100), 150µmol de AS (AS150) e 200µmol (AS) com de *C. hildmannianus*, controle e com AS; **B** - Placa cromatográfica (CCD) - hexano:éter:ácido acético (80:20:2, V/V/V)

Com o uso do elicitor AS, houve um maior crescimento, e uma mudança na tonalidade das células (avermelhadas), sendo concentração-dependente, quando comparadas à cultura controle que apresentaram células esverdeadas e com aspecto friável (Figura 1A). A cultura *in vitro* é uma ferramenta que alia a conservação da espécie e a obtenção de produtos de interesse como os PUFAs. Contudo, até hoje, a aplicação em larga escala dessa técnica é limitada porque muitos dos metabólitos de interesse são produzidos em maior quantidade no espécime *in natura* em decorrência da interação da planta com o ambiente, que não ocorre no sistema *in vitro*. Nesse sentido a elicitação das culturas *in vitro* é uma técnica biotecnológica efetiva na indução da produção desses metabólitos, uma vez que, o AS, por exemplo, atua como sinalizador, ativando a expressão gênica da biossíntese desses compostos (Halder, 2019).

Cromatografia em Camada Delgada

Foi possível separar três regiões lipídicas baseadas em suas polaridades: Fosfolipídeos, mais polares; glicolipídeos, de polaridade intermediária e lipídeos neutros, apolares e, por essa razão com maior deslocamento pela placa (Figura 1B).

Cromatografia Gasosa acoplada a Detector por Ionização de Chamas.

Com a quantificação absoluta nos calos elicitados com AS, obteve-se uma maior produção dos ácidos: láurico, erúcido, lignocérico e capríco com AS200; ácidos láurico, erúcido, araquidônico e *cis*-8,11,14-eicosatrienoico com AS150 e linoleico e palmítico com os tratamentos AS50 e AS100. No total de ácidos graxos, foi obtida uma maior produção de ácidos graxos insaturados com AS50 e saturados com AS200. O sucesso da elicitação depende de diversos fatores como a escolha do elicitor e sua concentração, e a espécie vegetal. O aumento na produção de PUFA resultante da elicitação com AS foi também relatado em culturas de *Nigella sativa* (Ibrahim et al, 2015). Uma hipótese é que esse aumento se deve ao estímulo da atividade fotossintética ou indução de enzimas responsáveis pela síntese de açúcares - que indica um aumento da atividade metabólica da planta frente ao estresse. Esses açúcares são precursores na via de formação dos lipídios de reserva da planta, uma vez que o malonil Coa, substrato onde ocorre a construção da cadeia carbônica dos ácidos graxos, é derivado do acetil Coa formado na via glicolítica (Gorni, 2018).

Conclusão

A elicitação com AS se mostrou uma estratégia eficiente no aumento da produção de ácidos graxos, sobretudo ácidos graxos insaturados e ácidos graxos incomuns/raros, como o *cis*-8,11,14-eicosatrienoico, que possuem valor econômico e potencial aplicação industrial.

Agradecimentos

Aos grupos de pesquisas LABIPROS, LABIOTEC, e LCTEV, à Universidade Estadual de Maringá e, em especial, à Fundação Araucária.

Referências

GORNI, P. H. **Atividade elicitora do ácido salicílico sobre o perfil de metabólitos primários e secundários com potencial antioxidante de *Achillea millefolium* L. cultivada a campo.** 2018. 114f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2018.

HALDER M. et al. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. **Engineering in Life Sciences**, v.19, n.12, p.880-895, 2019.

IBRAHIM, M. et al. Effect of some elicitors on chemicals composition for *Nigella sativa* callus cultures. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.10, p. 2160-2166, 2015.

JACOMINI, D. et al. Lipid profile and antiproliferative activity of callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 408-414, 2015.