

Estabelecimento de cultura de células em suspensão de *Cereus hildmannianus*

Giovanna Carla Cadini Ruiz (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Susana Tavares Cotrim Ribeiro, Alive Savam, José Eduardo Gonçalves, Éverton da Silva Santos (Coorientador), Regina Aparecida Correia Gonçalves (Orientador) e-mail: giovannaccruiz@gmail.com.

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

Farmácia – Farmacognosia.

Palavras-chave: células em suspensão, *Cereus hildmannianus*, cultura *in vitro*.

Resumo:

A cultura *in vitro* apresenta vantagens sobre a espécie *in natura*, visto que não sofre influência de fatores ambientais, permitindo uma produção controlada e contínua de metabólitos de interesse, além de ser uma alternativa sustentável. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento da cultura de calos de *Cereus hildmannianus* em meio líquido em agitador orbital e identificação de seu perfil lipídico por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM). Foram identificados putativamente 6 ácidos graxos, dentre eles 4 saturados (ácido palmítico, ácido margárico, ácido araquídico e ácido behênico) e 2 insaturados (ácido linoléico e ácido linolênico). A cultura de calos em suspensão mostrou-se uma alternativa viável e eficaz para obtenção de ácidos graxos de calos de *C. hildmannianus*.

Introdução

Nos últimos anos, as plantas medicinais ganharam destaque quanto ao seu uso farmacológico e alimentício, pois apresentam a capacidade de produzir metabólitos primários e especializados, que além de participarem do desenvolvimento vegetal, muitas vezes, são bioativos. Como exemplos de metabólitos primários tem-se os lipídios, que têm destaque na saúde e atuam na prevenção de diversas doenças (SIMÕES *et al.*, 2016).

A espécie *Cereus hildmannianus*, pertencente à família Cactaceae, é uma espécie promissora, pois possui grande variedade de substâncias com propriedades farmacológicas, nutricionais e biotecnológicas de interesse. Seu uso abrange desde a indústria de cosméticos até o tratamento de doenças. Porém sua aplicação é majoritariamente a partir da espécie *in natura*, o que pode levar a superexploração e ameaçar a sobrevivência da espécie, desta forma uma alternativa biotecnológica sustentável seria o uso da cultura vegetal *in vitro* (SANTOS *et al.*, 2021).

Para iniciar a cultura *in vitro* quaisquer fragmentos da planta podem ser utilizados como explante, esse fragmento então será colocado em um meio de cultura que contenha macro e micronutrientes, hormônios e vitaminas necessários para o desenvolvimento vegetal. Como vantagens dessa técnica tem-se a preservação da espécie vegetal e a produção de metabólitos de interesse de forma mais controlada,

pois estes não são influenciados por fatores ambientais, tais como predadores, patógenos, sazonalidade e composição do solo. Porém, como desvantagem pode-se relatar seu alto custo. Uma alternativa que viabiliza economicamente a técnica é o uso da cultura em suspensão, visto que não se utiliza o ágar como agente solidificante e facilita a extração dos metabólitos de interesse (DJILIANOV *et al.*, 2005).

Sendo assim, o objetivo deste projeto foi estabelecer a cultura de calos em suspensão do *C. hildmannianus* em meio Murashige e Skoog (MS) (1962) líquido mantido em agitador orbital e caracterizar o perfil lipídico por meio da Cromatografia à gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).

Materiais e Métodos

Estabelecimento da cultura de calos de C. hildmannianus em suspensão

Os tecidos de calos são mantidos em placas de Petri contendo meio MS, em fotoperíodo 16h luz/8h escuro. Foi transferido 1g desse material para Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio MS sem adição de ágar, mantidos em agitador orbital durante um período de tempo de 35 dias (5 semanas). Os calos obtidos após esse período foram liofilizados e mantidos em refrigerador até quantidades suficientes para análises químicas.

Esterificação direta dos ácidos graxos nos tecidos de calos

Em tubos de ensaio foram adicionados 100 mg do material liofilizado, em seguida foram adicionados 2,0 mL de hidróxido de sódio (NaOH) ($1,25 \text{ mol L}^{-1}$) preparado em metanol e submetidos a banho ultrassônico por 15 min. Após realizada a reação, foram adicionadas 2,0 mL de ácido clorídrico (HCl) ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$) preparado em metanol e novamente submetidos a banho ultrassônico por 15 min. Os ácidos graxos metilados contidos nas amostras foram então extraídos com a adição de 1,0 mL de hexano e agitação em vórtex por 30 segundos seguido de centrifugação 2.000 rpm por 5 min (o processo de extração foi realizado três vezes). As fases superiores foram coletadas e injetadas no CG-EM (SANTOS *et al.*, 2018).

Caracterização do perfil de ácidos graxos por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados em um Cromatógrafo à Gás (Agilent 7890B) acoplado a um espectrômetro de massas (Agilent 5977A MSD), equipado com uma coluna capilar Agilent HP-5MS UI de sílica fundida (30,0 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e um injetor automático (CTC PAL Control), utilizando: temperatura do injetor de 235 °C, volume de injeção 1 μL na razão de 1:20 no modo *split*, temperatura inicial da coluna de 50 °C com aquecimento gradual até 220 °C em uma rampa de aquecimento de 40 °C min^{-1} . O He foi utilizado como gás de arraste no fluxo de 1 mL min^{-1} . As temperaturas da linha de transferência, fonte de ionização

e quadrupolo foram 235, 230 e 150 °C, respectivamente. Os espectros de massas foram obtidos no modo *scan* em um intervalo de 50 - 600 (*m/z*). A identificação dos compostos foi realizada comparando seus espectros de massas com os dados da biblioteca NIST 11.0 (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, EUA).

Resultados e Discussão

Estabelecimento da cultura de calos de C. hildmannianus em suspensão

Após o período de cinco semanas, a massa de calos cresceu de forma significativa ($78,77 \pm 14,38\%$) e consumiu todo o meio líquido fornecido. A cultura apresentou uma coloração esbranquiçada, levemente translúcida e homogênea (Figura 1).

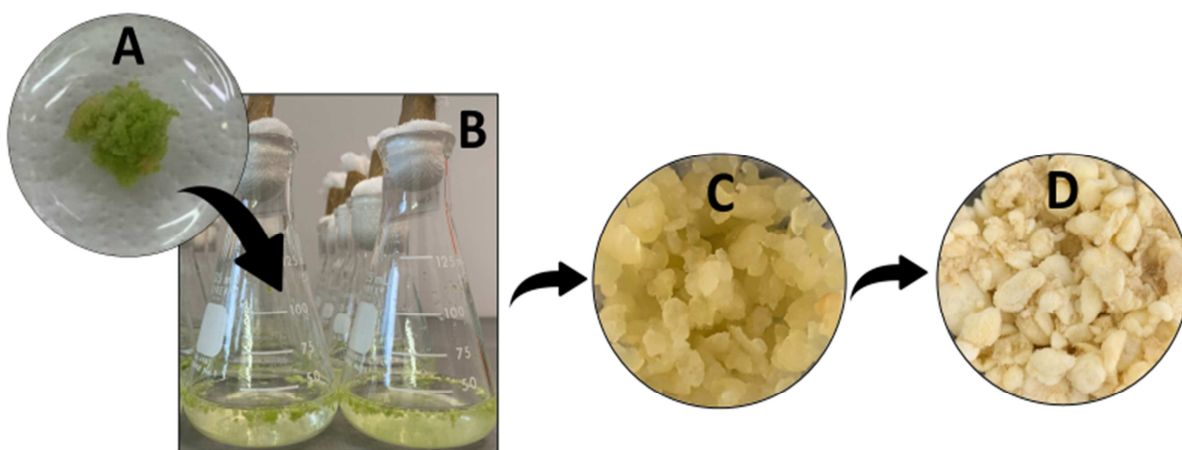


Figura 1 – A: Inóculo de calos de *C. hildmannianus*. B: Cultura recém preparada. C: Aspecto da cultura após 35 dias de cultivo. D: Calos liofilizados.

Esterificação direta dos ácidos graxos nos tecidos de calos

A metilação direta, por não requerer a extração prévia dos lipídios, é uma alternativa mais rápida, econômica e sustentável se comparada a metodologias convencionais de extração (SANTOS *et al.*, 2018).

Caracterização do perfil de ácidos graxos por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas

Foram identificados putativamente por CG-EM na cultura de calos de *C. hildmannianus* em suspensão, seis ácidos graxos, dentre eles quatro saturados: ácido palmítico (C16:0) com tempo de retenção (t_R) 10,37 min; ácido margárico (C17:0), t_R 11,13 min; ácido araquídico (C20:0), t_R 15,29 min; e ácido behênico (C22:0), t_R 20,78 min. Além disso, foram identificados dois ácidos graxos insaturados: ácido linoléico (C18:2n6c), t_R 11,83 min e ácido linolênico (C18:3n3), t_R 11,90 min. Nas próximas etapas do trabalho será realizada a quantificação destes ácidos graxos por CG/FID, utilizando uma mistura de ésteres metílicos de ácidos

graxos padrões C4-C24 (F.A.M.E.). É importante destacar que os ácidos graxos insaturados são essenciais para a saúde humana, pois desempenham importantes funções no organismo, como a diminuição dos níveis de triglicerídeos no sangue; prevenção do desenvolvimento de placas de gordura na parede das artérias; estabilização da pressão arterial; e diminuição da concentração de glicose, contribuindo para redução da incidência de diabetes (SIMÕES *et al.*, 2016).

Conclusões

A cultura de calos em suspensão mostrou-se uma alternativa viável à cultura tradicional, uma vez que não é utilizado ágar, e eficaz para obtenção de ácidos graxos saturados e insaturados de calos de *C. hildmannianus*.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Dra. Regina Aparecida Correia Gonçalves e ao meu coorientador Dr. Éverton da Silva Santos, pelo apoio e incentivo durante o projeto, agradeço ao CNPQ e a Universidade Estadual de Maringá pela bolsa concedida e a todo Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos (LABIPROS/UEM) e Laboratório Interdisciplinar de Análises Biológicas e Químicas (LIABQ/UNICESUMAR) pelo auxílio na pesquisa.

Referências

- DJILIANOV, D.; GENOVA, G.; PARVANOV, D.; ZAPRYANOVA, N.; KONSTANTINOVA, T.; ATANASSOV, A. *In vitro* culture of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.80, p.115-118, 2005.
- MURASHIGE, T. & SKOOG F. S. (1962). A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v. 15, p. 433-497.
- SANTOS, S. E.; OLIVEIRA, A. J. B.; MACHADO, M. F. P. S.; MANGOLIN, C. A.; GONÇALVES, R. A. C. G. *Cereus hildmannianus* (K.) Schum.(Cactaceae): Ethnomedical uses, phytochemistry and biological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 113339, 2021.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.
- SANTOS, P. D.; SILVEIRA, R.; REIS, N. V.; VISENTAINER, J. V.; SANTOS, O. O. Analytical method development for fatty acid direct methylation in fruits. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 8, p. 1645-165, 2018.