

AVALIAÇÃO DE ELICITORES BIOLÓGICOS PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES EM CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE *Cereus peruvianus*.

Lucas Santos Lima (PIBIC/FA/UEM), Jesieli Beraldo-Borrazzo (Co-orientadora/ DBC-UEM), Claudete Aparecida Mangolin (Orientadora/ DBC-UEM), e-mail: mangolimca@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular /Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas/Genética de microrganismo.

Palavras-chave: cultura de tecidos; elicitação; compostos fenólicos.

RESUMO

Sistemas de cultura de tecidos de calos *in vitro*, têm sido extensivamente estudadas para a produção e otimização de compostos vegetais bioativos de interesse, sendo uma alternativa para a produção de metabólitos secundários de alto valor biológico e financeiro. Associadas a técnicas que simulam fenômenos naturais cruciais em suas defesas e sobrevivência e que conseqüentemente, modulam a produção de metabólitos encontrados nas plantas, a bioelicitação em culturas vegetais *in vitro* visa promover e aumentar a produção destes compostos de interesse, produzindo moléculas antioxidantes com benefícios à saúde humana, incluindo efeitos anticancerígenos e cardioprotetores. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito elicitor de bactérias endofíticas inativadas para a produção de compostos fenólicos e flavonóides em culturas de células em suspensão. Os resultados indicam que a bioelicitação de cultura de células em suspensão de *C. peruvianus* é uma abordagem eficaz e promissora para aumentar a produção de compostos fenólicos, superando métodos convencionais e destacando-se como uma alternativa viável para a elicitação de metabólitos secundários vegetais de importância biotecnológica.

INTRODUÇÃO

Plantas de *C. peruvianus* (Cactaceae) são reconhecidas por sua importância medicinal, nutracêutica e econômica, e a cultura de calos desta espécie tem sido utilizada como fonte de importantes metabólitos primários e secundários (OLIVEIRA e MACHADO, 2003). Os compostos fenólicos, incluindo os flavonóides, desempenham papéis cruciais tanto para as plantas quanto para a saúde humana. Apresentando atividades biológicas desde antioxidantes a anticancerígenas.

A elicitação usando microrganismos endofíticos inativados em culturas de células vegetais é uma abordagem promissora para a produção de biomoléculas oferecendo uma alternativa sustentável e controlada para otimizar a obtenção desses

compostos de alto valor econômico e terapêutico. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de compostos fenólicos, especificamente flavonoides, a partir da elicitação de culturas de células em suspensão de *C. peruvianus* por bactérias endofíticas inativadas e isoladas de regenerantes clonais de *C. peruvianus* de seus fermentados ricos em exopolissacarídeos (EPS) (BERALDO-BORRAZZO *et al.*, 2021).

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Biológico e Células em Suspensão

Calos de *C. peruvianus* mantidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais (LCTEV) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) são subcultivados a cada 30-40 dias em meio MS com adição de 15% de água de coco. Para este estudo, foi utilizada uma linhagem de calos especialmente selecionada por sua resistência à oxidação e friabilidade, ideal para cultivo em suspensão.

Bactérias endofíticas isoladas de plantas regeneradas de *C. peruvianus* foram selecionadas pela capacidade de produzir compostos promotores de desenvolvimento vegetal, seguindo métodos descritos por Beraldo-Borrazzo *et al.* (2021). As linhagens selecionadas apresentam potencial para produção de exopolissacarídeos (EPS) e pertencem às espécies *Bacillus subtilis* (CR04), *Bacillus licheniformis* (CR09) e *Bacillus amyloliquefaciens* (CR10). Essas bactérias foram cultivadas em meio MS para otimizar a produção de EPS, que atua como elicitor para produção de compostos fenólicos e flavonóides.

Três gramas de calos desagregados foram inoculados em Erlenmeyers com 100 mL de meio MS. As células foram cultivadas por 7 dias, 5 mL do meio contendo células desagregadas foram transferidos para novos Erlenmeyers com 40 mL de meio MS. Os frascos foram identificados para a cepa e o tipo de tratamento aplicado: "a" para bactérias inativadas e "b" para caldo fermentado rico em EPS. Após 7 dias de adaptação, os tratamentos foram aplicados.

Inativação das Bactérias e Inserção do Tratamento Elicitor

As bactérias endofíticas foram cultivadas por 72 horas em meio MS, e em seguida inativadas por autoclavagem. O caldo fermentado rico em EPS foi separado das bactérias inativadas por centrifugação a 5000 rpm por 20 min. Após, foi adicionado 1% das bactérias inativadas ao volume total do cultivo de células em suspensão de *C. peruvianus* correspondendo este ao tratamento "a". Enquanto 0,5% o caldo fermentado rico em EPS foi adicionado ao volume total do cultivo de células em suspensão de *C. peruvianus*, correspondendo este ao tratamento "b". Alíquotas de 1 mL foram coletadas a cada 2 dias, durante 6 dias, para quantificação dos compostos fenólicos e flavonóides.

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, enquanto a dos flavonóides utilizou o método com cloreto de alumínio.

Ambos os testes foram realizados por espectrofotometria, com resultados expressos em equivalentes de ácido gálico e quercetina, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os elicitores do grupo “a”, que correspondem ao tratamento com bactérias inativadas apresentaram maior capacidade de elicitação de compostos fenólicos totais, quando comparados aos tratamentos com os elicitores do grupo “b” que são os tratamentos com EPS bacterianos. Ambos os tratamentos elicitores foram superiores quando comparados ao controle (Tabela 1). O tratamento CR04a, com abactéria inativada da espécie *B. subtilis*, foi o que apresentou maior capacidade de elicitação, com uma média de produção de 1033,62 $\mu\text{g}\cdot\text{GAE}/\text{mL}^{-1}$ de fenólicos totais por 6 dias. O tratamento CR10a (*B. amyloliquefaciens*), apresentou capacidade de elicitação de 917,81 $\mu\text{g}\cdot\text{GAE}/\text{mL}^{-1}$ de compostos fenólicos totais. As análises estatísticas mostraram que os tratamentos CR04a, CR10a, CR09a e CR10b apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. O teste ANOVA revelou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e o controle, eficácia dos tratamentos CR04a, CR10a, CR09a e CR10b confirmada pelo teste *pós-hoc* de Tukey (Figura1).

Tabela 1 – Teor de fenólicos totais nas amostras de sobrenadante das células de *Cereus peruvianus* em suspensão, avaliado como equivalentes em $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de Ácido Gálico (GAE).

Tratamentos	Dia 1	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Concentração de fenólicos totais ($\mu\text{g}\cdot\text{GAE}/\text{mL}^{-1}$)
CONTROLE	286.7044	301.3473	444.5616	363.3116	348,98
CR04a	940.3949	1007.062	1174.026	1013.014	1033,62
CR04b	661.2282	661.2282	542.1806	542.1806	601,70
CR09a	686.2282	823.7282	823.7282	735.0378	767,18
CR09b	632.0616	727.5973	561.8235	208.2521	532,43
CR10a	667.1806	935.0378	1056.615	1012.419	917,81
CR10b	591.883	673.7282	687.4187	657.6568	652,67

*a Tratamento com bactérias endofíticas inativadas. *b Tratamento com EPS bacteriano.

Esses resultados superam os obtidos com outros elicitores testados em culturas de calos de *C. peruvianus* como o ácido jasmônico e o ácido salicílico (DA SILVA SANTOS et al., 2023), indicando que a cultura de células em suspensão e a elicitação com bactérias endofíticas inativadas é uma alternativa mais eficiente. Ao avaliar a concentração de flavonóides, os dados sugerem que os tratamentos elicitores não causaram uma diferença significativa na produção desses metabólitos.

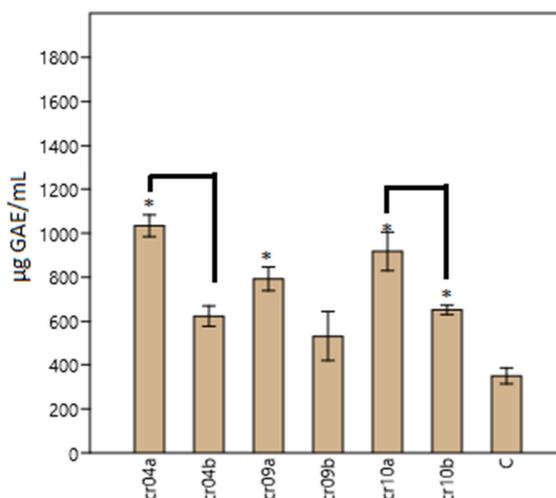


Figura 1 – Produção de compostos fenólicos totais em cultivo de células em suspensão de *C. peruvianus* elicidadas com bactérias endofíticas inativadas e com EPS bacteriano. O símbolo “*” indica a diferença significativa pelo teste de Tukey $p < 0,05$ entre os tratamentos e o controle. As linhas escuras destacam as diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a cultura de células em suspensão de *C. peruvianus* combinada com uso de elicitores biológicos, representa uma alternativa mais eficiente para a produção de compostos fenólicos. Os tratamentos com EPS bacteriano, foram menos eficazes do que os tratamentos com bactérias inativadas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a UEM pela estrutura, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Araucária pelo aporte financeiro para a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

BERALDO-BORRAZZO, J. et al. Communities of endophytic bacteria from *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) plants obtained from seeds and from in vitro-regenerated somaclone. **South African Journal of Botany**, 142: 335-343, 2021.

SILVA SANTOS, É. et al. Improvement of phenolic compounds production in callus cultures of *Cereus hildmannianus* (K.) Schum. by elicitation. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 153, 37–51 2023.

OLIVEIRA, S.A. et al. Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Applied biochemistry and biotechnology**, 104 (2003): 149-155.