

# INFLUÊNCIA DA LUZ UV-C NA BIOPRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM CULTURA DE CALOS DE *Cereus peruvianus* Mill.

Éverton da Silva Santos<sup>1</sup>; Juliana Cristina Castro<sup>2</sup>; Márcia Regina Pereira Cabral<sup>3</sup>; Claudete Mangolin<sup>4</sup>, Arildo Braz de Oliveira<sup>5</sup> e Regina Aparecida Correia Gonçalves<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Bolsista CAPES/CNPq. [everton\\_ds.santos@hotmail.com](mailto:everton_ds.santos@hotmail.com)

<sup>2</sup>Colaboradora Estágio de pós-doutoramento em Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá – UEM. [julianacristinacastro06@gmail.com](mailto:julianacristinacastro06@gmail.com)

<sup>3</sup> Colaboradora Estágio de pós-doutoramento em Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá – UEM. [marciaacabral@hotmail.com](mailto:marciaacabral@hotmail.com)

<sup>4</sup>Colaboradora, Professora Doutora do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá – UEM. [mangolimca@gmail.com](mailto:mangolimca@gmail.com)

<sup>5</sup>Colaborador, Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá – UEM. [ajboliveira@uem.br](mailto:ajboliveira@uem.br)

<sup>6</sup>Orientadora, Professora Doutora do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá – UEM. [racgoncalves@uem.br](mailto:racgoncalves@uem.br)

## RESUMO

*Cereus peruvianus* Mill. é nativo de regiões áridas e apresenta aplicações farmacêuticas e alimentícias. A cultura de calos representa uma alternativa biotecnológica para obtenção de compostos biologicamente ativos. A utilização de elicitores é uma ferramenta para a modulação metabólica vegetal, visando a melhora na produção destes compostos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi determinar compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos dos calos de *C. peruvianus* submetidos a diferentes tempos de exposição a UV-C. Os calos foram expostos a UV-C por diferentes tempos 10 a 60 min e controle negativo sem exposição. Após foram sub-cultivados em meio MS e incubados a 30 °C por 45 dias sob fotoperíodo de 16 h. Após o cultivo foram realizadas extração por Soxhlet (S) EtOH 70% e maceração (M) MeOH, a partir destes foi avaliado o conteúdo de compostos fenólicos nos extratos resultantes e atividade antioxidante contra DPPH. Os resultados mostraram que a elicitação com UV-C por 20 min, apresentou médias superiores de compostos fenólicos totais, no método de maceração foi de 406,58 µg de EAG/mg, seguido do método de Soxhlet 86,72 µg de EAG/mg, corroborando com os resultados encontrados com a atividade antioxidante com CE<sub>50</sub> 8,15 mg/mL para UV-C 20 (M-FD) e de 48,96 mg/mL com o UV-C 20 (S). A elicitação com UV-C em 20 min melhorou a produção de compostos fenólicos alterando o metabolismo dos calos por mecanismo de defesa celular, contribuindo com a melhora da atividade antioxidante.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cultura celular; Metabolismo vegetal; Estresse biótico.

## 1 INTRODUÇÃO

Os humanos desenvolveram um amplo conhecimento nas plantas, devido ao contato contínuo com ambiente natural e a experimentação, moldando a medicina tradicional (Barbulova *et al.*, 2014), a partir disto, sabe-se que a produção das substâncias biotivas produzidas por estas plantas muitas vezes é baixa, muitos dos quais são estruturas complexas e únicas.

*Cereus peruvianus* (Mill.) é conhecida no Brasil como mandacaru, pertencente à *Cactaceae*, nativa de regiões áridas do Brasil com diversas aplicações farmacêuticas e industriais (Jacomini *et al.*, 2015). Produz vários metabólitos, que apresentam atividade anti-ulcerogênica (Jayme *et al.*, 2015) e gastroprotetora (Tanaka *et al.*, 2010). A cultura de calos representa uma alternativa biotecnológica para a obtenção de compostos biologicamente ativos (Oliveira e Silva, 2003). A cultura celular de plantas é uma técnica importante, sendo vantajosa uma vez que os metabólitos podem ser obtidos em condições ambientais controladas, independentes de alterações climáticas, livres de contaminações por microrganismos e insetos (Barz *et al.*, 2012; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015). De acordo com Singh e Dwivedi (2018), podemos preservar a perda de biodiversidade, minimizando o uso da planta intacta, sintetizando a produção de metabólitos *in vitro* por técnicas elicitoras, melhorando a bioprodução para atender demandas comerciais.

De acordo com Mota *et al.* (2019), estudos que ressaltem a importância de plantas endêmicas da América do Sul, são necessários e importantes dada a escassez de trabalhos. E visto que o impacto da utilização de elicitores em culturas de calos de *C. peruvianus* ainda

não foram descritos, foi estudado a possibilidade de aumentar a bioprodução de compostos fenólicos com a eliciação abiótica com luz UV-C.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CULTURA DOS CALOS

Os tecidos de calos foram obtidos a partir de culturas mantidas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Biologia Celular e Genética - UEM, em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 0,8% de ágar, 4 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético e 4 mg/L de *N*-(2-furanylmethyl)-1H-purine-6 amine (Oliveira *et al.*, 1995). Foram cultivados em estufas a  $30 \pm 1$  °C com fotoperíodo 16 horas ( $15 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  intensidade luminosa) e sub-cultivados em intervalos de 30 dias.

#### 2.1.1 Elicitação com luz UV-C

Culturas de calos de *C. peruvianus* foram elicitados com luz UV-C (< 280 nm) expostas em intervalos de 10, 20, 40 e 60 minutos, além do controle negativo sem a exposição. Subsequentemente, esses calos foram repicados e incubados por 45 dias (descrito no subitem 2.1). As culturas de calos foram liofilizadas e submetidas as extrações.

### 2.2 EXTRAÇÕES

#### 2.2.1 Soxhlet

Cerca de 1 g dos calos foram submetidas a extrações por Soxhlet, no qual foram primeiramente despigmentados com clorofórmio e metanol (3:1,V:V). Para a extração dos compostos fenólicos utilizou-se etanol 70% durante cerca de 6 h (esgotamento) a 50 °C. Após os extratos obtidos foram rotaevaporados, liofilizados e estocados a -20 °C em freezer.

#### 2.2.2 Maceração

Nas macerações foram utilizados aproximadamente 1 g dos calos liofilizados, e adicionados 200 mL de metanol (P.A) em frascos do tipo "Schott". Em intervalos de 2 dias, esses materiais foram filtrados e rotaevaporados (35 °C), com solvente extrator renovado para extrações seguintes, totalizando 4. No final, esses extratos foram liofilizados e estocados a -20 °C.

##### 2.2.2.1 Partição dos extratos macerados

Os extratos brutos (EB) obtidos por maceração foram então submetidos a um fracionamento líquido-líquido, com hexano e diclorometano. Para isso o EB foi solubilizado em uma solução metanol:água (1:1,V:V). Em um funil de separação o EB foi particionado primeiramente com adição de 50 mL de hexano (4x), obtendo a fração hexânica. Em seguida a extração foi feita adicionando-se 50 mL de diclorometano, obtendo a fração diclorometânica (3x). O remanescente do fracionamento foi coletado como a fração hidrometanólica.

## 2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada pela técnica colorimétrica, método Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). Para os ensaios foram adicionados 40 µL das amostras (20 mg/mL em MeOH) aos tubos de ensaios, 3.160 µL de H<sub>2</sub>O deionizada, 600 µL de uma solução de NaCO<sub>3</sub> e 200 µL de Folin-Ciocalteu e agitados. Após 30 min., as leituras das amostras foram registradas em espectrofotômetro a 765 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Para quantificação foram empregadas uma curva analítica com solução de ácido gálico nas concentrações: 50 a 250 µg/mL. Foram calculados o coeficiente de correlação através da curva e o teor de compostos fenólicos totais foram expressos em µg/mg equivalente de ácido gálico (EAG)/mL.

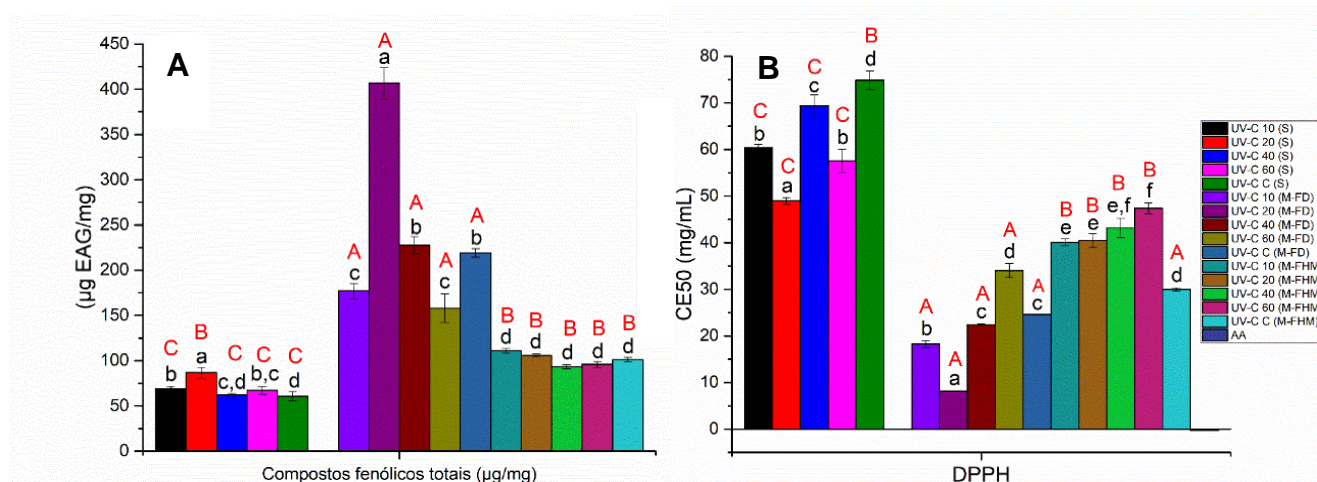
## 2.4 TESTE ANTIOXIDANTE

A capacidade de remoção do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazil) foi medida utilizando o método descrito por Ma *et al.* (2011). A solução de DPPH• (6,25×10<sup>-5</sup>M) foi diluída em MeOH (absorbância inicial de 0,700) a 517 nm. Foram realizadas curvas com as amostras, no qual foram solubilizadas com H<sub>2</sub>O deionizada obtendo concentrações de 22 mg/mL, e dessas soluções foram realizadas diluições: 12, 10, 6, 3 e 1 mg/mL. Para os ensaios foram adicionados 25 µL das amostras, 2.000 µL de solução de metanol de DPPH•, seguidas de agitação. Após 30 min, as leituras foram registradas em espectrofotômetro (λ= 517 nm). Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Soluções de trolox em concentrações de 200 a 2.000 µmol/L foram utilizadas para construir a curva analítica. As atividades antioxidantes dos compostos foram expressas em Concentração Efetiva de 50% (CE<sub>50</sub>) (Juntachote e Berghofer, 2005).

## 3 RESULTADOS

Os resultados obtidos do doseamento colorimétrico de compostos fenólicos totais (Figura 1.A) mostraram que quando comparados dentro do método (Soxhlet) a elicitação em 20 min, o extrato UV-C 20 (S) apresentou o melhor resultado de 86,72 ± 6,06 µg AGE/mg, seguidos do UV-C 10 (S) com 69,10 ± 6,06 µg AGE/mg, e os outros tratamentos não apresentaram diferença estatística. Da mesma forma, o método de maceração em 20 min foi o que apresentou o melhor resultado com o UV-C 20 (M-FD) com 406,58 ± 17,33 de µg EAG/mg, seguido dos extratos UV-C 40 (M-FD) 227,96 ± 9,62 e UV-C C (M-FD) 219,00 ± 4,86 de µg EAG/mg, aos quais não diferiram estatisticamente, da mesma forma que os extratos com 10 e 60 min. Todos as frações hidrometanólicas obtidas pelo método de maceração não apresentaram diferença significativa. Quando comparados os dois métodos de extração, a maceração foi mais eficiente, apresentando os melhores resultados, especificamente as frações diclorometânicas. O aquecimento utilizado na extração por *Soxhlet* pode estar associado a diminuição expressiva no conteúdo de fenólicos, considerando alto grau de degradação de ácidos fenólicos e flavonoides, substâncias estas sensíveis ao calor.

Os resultados da atividade antioxidante usando DPPH para os extratos dos calos de *C. peruvianus* elicitados com luz UV-C (figura 1.B), foram concordantes com os dados obtidos no teor de fenólicos, onde a elicitação com 20 min UV-C apresentou a melhor capacidade na redução do radical DPPH•, com CE<sub>50</sub> de 8,15 ± 0,10 mg/mL para UV-C 20 (M-FD), o resultado observado mais próximo ao do controle (ácido ascórbico, CE<sub>50</sub> -0,29 ± 0,10 mg/mL), e 48,96 ± 0,75 mg/mL para UV-C 20 (S), estatisticamente esses tratamentos foram os melhores, dentro dos seus respectivos métodos de extrações. Já quando comparados os métodos extrativos, a maceração foi mais eficiente, especificamente as frações diclorometânicas.



**Figura 1.A.** Compostos fenólicos totais das extrações por Soxhlet e maceração, dos calos elicitados com luz UV-C. **B.** EC<sub>50</sub> dos extratos elicitados com UV-C, na comparação entre os métodos de extração.

Notas: Teste de Tukey, letras diferentes apresentaram diferença estatística com  $p < 0,05$  (letras minúsculas comparação dos tratamentos dentro do método de extração e maiúsculas comparação dos tratamentos entre os métodos de extração).

#### 4 CONCLUSÃO

A elicitação com a luz UV-C atuou no metabolismo dos calos de *C. peruvianus*, alterando a produção de isoenzimas esterases e modulando a produção de compostos fenólicos. Na comparação entre os métodos de extração, a maceração foi o mais eficiente para esta classe de metabólitos de interesse, não degradando os compostos fenólicos presentes nos calos.

#### REFERÊNCIAS

BARBULOVA, A.; APONE, F.; COLUCCI, G. Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients. **Cosmetics**, v. 1, n. 2, p. 94-104, 2014.

BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M. **Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application: Proceedings of the First International Congress on Medicinal Plant Research, Section B, Held at the University of Munich, Germany September 6–10, 1976.** Springer Science & Business Media, 2012.

GAMBORG, O. L. C.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental cell research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

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.

JAYME, M. O. et al. Primary Characterization and Evaluation of Anti Ulcerogenic Activity of an Aqueous Extract from Callus Culture of *Cereus peruvianus* Mill.(Cactaceae). **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 462-467, 2015.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 193-202, 2005.

MA, X. et al. Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 1, p. 102-107, 2011.

MOTA, T. R. et al. Protein extract from *Cereus jamacaru* (DC.) inhibits *Colletotrichum gloeosporioides* growth by stimulating ROS generation and promoting severe cell membrane damage. **Microbial pathogenesis**, 2019.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, A. J. B.; SILVA, M. D. F. P. Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 104, n. 2, p. 149-155, 2003.

OLIVEIRA, S. A. et al. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill.(Cactaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 31, n. 1, p. 47-50, 1995.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. et al. Tissue culture of ornamental cacti. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 6, p. 540-561, 2015.

SALA, J. et al. Esterase polymorphism and the analysis of genetic diversity and structure in cactus populations descended from *Cereus peruvianus* plants regenerated in vitro. **Biochemical genetics**, v. 49, n. 3-4, p. 270-282, 2011.

SINGH, A.; DWIVEDI, P. Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 1, p. 750-757, 2018.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

TANAKA, L. Y. A. et al. An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 714-721.