

Análise qualitativa dos polissacarídeos obtidos da cultura de calos de *Cereus peruvianus* Mill. (*Cactaceae*)

Milena de Oliveira Jayme¹, Edilainy Rizzieri Caleffi¹, Débora Jacomini¹, Sheila Mara Sanches Lopes¹, Regina Aparecida Correia Gonçalves¹, Arildo José Braz de Oliveira¹

¹ Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Farmácia - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Av. Colombo, 5.790 bloco K80 CEP 87020-900 Maringá – Paraná - E-mail: mi_jayme@hotmail.com

RESUMO

O cacto "Mandacaru", Cereus peruvianus Mill. (Cactaceae), possui muitas aplicações com fins econômicos e industriais por produzirem alcalóides, ésteres de cera com potencial de aplicação como barreira impermeável e uma goma viscosa com diversas aplicações industriais, tais como: adjuvante na floculação de impurezas da água e em formulações cosméticas, tratamento de efluentes, produção de polieletrólitos e clarificação de extratos. A cultura de calos e de células em suspensão de Cereus peruvianus representa uma fonte alternativa para a síntese em escala industrial de produtos originalmente produzidos pelas plantas, tais como: alcalóides, polissacarídeos e ácidos graxos insaturados, com aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica, de tintas, detergentes e de plástico. O presente trabalho teve como objetivo extrair e determinar o perfil químico de polissacarídeos a partir da cultura de calos do Cereus peruvianus. Através das análises espectrofotométricas e por cromatografia em camada delgada (CCD) foi possível caracterizar preliminarmente carboidratos pécnicos, sugerindo a presença de pectinas.

Palavras-chave: *Cereus peruvianus*; Cultura de calos; Polissacarídeos, pectinas.

INTRODUÇÃO

Cereus peruvianus é uma espécie de cacto popularmente conhecida no Brasil como Mandacará. Apresenta interesse econômico e industrial por produzirem alcalóides¹, ésteres de cera com potencial de aplicação como barreira impermeável² e uma goma viscosa com diversas aplicações industriais, tais como: adjuvante na floculação de impurezas da água e em formulações cosméticas³, tratamento de efluentes⁴, produção de polieletrólitos⁵, clarificação de extratos⁶.

A tecnologia do cultivo *in vitro* além de ser aplicada a plantas medicinais para propagação clonal pode ser utilizada para produção de culturas de calos e de células em suspensão, visando a produção de compostos de interesse farmacêutico, cosmético e alimentar⁷. Desta maneira, o cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui uma alternativa promissora para o suprimento de material vegetal.

Células mucilaginosas e de produção de mucilagem são caracteres adaptativos das cactáceas ao ambiente xérico, uma vez que a mucilagem está relacionada ao armazenamento de água. A mucilagem obtida de cactos é descrita como um polissacarídeo tipo pectina solúvel em água⁸.

A facilidade de obtenção faz com que muitos polissacarídeos e mucilagens de plantas tenham menor custo em comparação a polímeros sintéticos, com a vantagem de serem biodegradáveis.



Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo o cultivo da cultura de calos bem como a obtenção e determinação do perfil químico dos polissacarídeos obtidos da cultura de calos de *C. peruvianus*.

MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo de calos de *Cereus peruvianus* foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Oliveira e colaboradores (1995)⁹. O processo induz a proliferação celular a partir de fragmentos de hipocótilo em meio MS (MURASHIGE e SKOOG).

A cultura de calos de *Cereus peruvianus* liofilizada foi submetida primeiramente ao processo de extração em extrator de Soxhlet com uma mistura de solventes orgânicos (clorofórmio e metanol) por 4 horas para remoção de clorofila e ácidos graxos. A amostra deslipidificada e sem clorofila foi submetida a tratamento com uma solução de ácido clorídrico (pH 4.0) à 50°C por 2 horas. Em seguida, a biomassa foi filtrada e lavada com água e, posteriormente extraída com uma solução aquosa de oxalato de amônio 0,7% à 68°C por 3 horas. O extrato obtido foi filtrado a quente, concentrado em rotaevaporador até redução do volume e dialisado em membranas de 10 kDa. Após a diálise a amostra foi centrifugada (4500 rpm, 25 minutos, 5°C) e o sobrenadante (fração polissacarídica solúvel em água) foi precipitado em etanol e, por fim, liofilizado.

Foram realizadas análises por CCD da fração hidrolisada e comparado com padrões de ácido galacturônico, galactose, arabinose, ramnose, glicose e manose. Para a CCD foram utilizadas placas de gel de sílica 60 F₂₅₄ Macherey-Nagel[®] utilizando sistema de solvente como fase móvel (FM) acetato de etila: propanol:ácido acético:água (4:2:2:1 v/v) e reveladas com reagente de Orcinol-Sulfúrico¹⁰. A hidrólise da amostra foi realizada com ácido trifluoroacético 2 mol.L⁻¹ por 8h a 100°C.

Os componentes bioquímicos foram quantificados a partir de reações colorimétricas com leitura em espectrofotômetro Varian[®] modelo Cary 1E e analisados em triplicata. As técnicas utilizadas foram: açúcares totais pelo método do Fenol-Sulfúrico¹¹, proteínas método Lowry modificado¹², e ácido urônico método de Carbazol¹³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento de extração na cultura de calos de *Cereus peruvianus* resultou em um rendimento de 4,72g% do polissacarídeo (POX) (Figura 1). O teor de proteínas encontrado (4,13%) (Tabela 1) indica que o procedimento favoreceu a extração dos carboidratos. Este tipo de extração em solução de oxalato de amônio é utilizado para extração de pectinas. A estrutura química da pectina é constituída de uma cadeia principal linear de unidades repetidas de ácido D-galacturônico ligados covalentemente. Essa cadeia principal pode ser interrompida por unidades de L-ramnose, às quais estão ligadas cadeias laterais, formadas por açúcares neutros, principalmente unidades de galactose e arabinose¹⁴.

De acordo com as análises espectrofotométricas (Tabela 1), confirmadas com a CCD, pode-se observar que o polissacarídeo é composto de uma grande quantidade de ácidos urônicos (19,80%). Considerando que o teor de açúcares totais (27,48%) inclui açúcares neutros e ácidos urônicos, pode-se estimar que o teor de ácido urônico (AU) representa cerca de 72% do conteúdo de açúcares contido no polissacarídeo, e que apenas 28% são referentes aos açúcares neutros (AN). A relação de AU/AN foi de 2,57, típico de polissacarídeos pécticos. Os teores de AU e AN assemelham-se aos da pectina extraída de *Camellia sinensis* por Ele-Ekouna e colaboradores¹⁵.



III SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

A análise preliminar por CCD (Figura 2) do polissacarídeo mostrou que o ácido urônico presente na amostra é o ácido galacturônico. Ainda pela CCD, nota-se que os monossacarídeos presentes em maior quantidade são a galactose e o ácido galacturônico, sugerindo que realmente trata-se de uma pectina. Além disso, o polissacarídeo obtido possui propriedade de formar gel em solução aquosa, típico de pectinas¹⁶.

Figura 1. (A) Cultura de calos de *Cereus peruvianus*, (B) polissacarídeo após extração com a solução de oxalato de amônio.

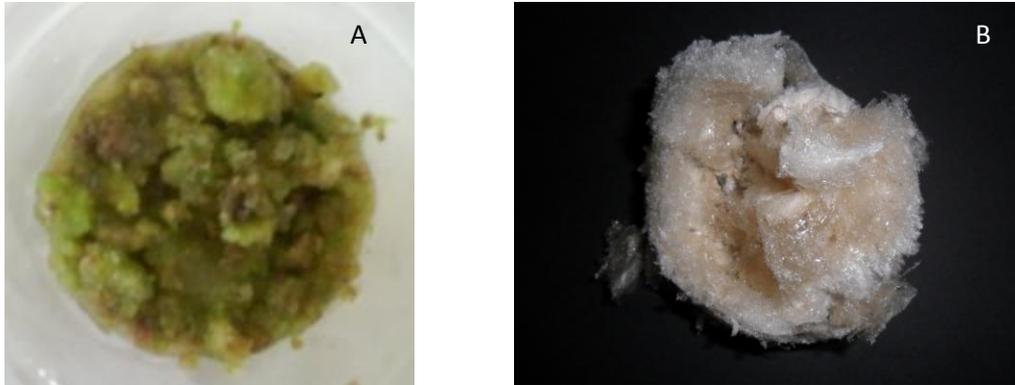


Figura 2. CCD utilizando acetato de etila: *n*-propanol: ácido acético: água (4:2:2:1 v/v). GalA: Ácido Galacturônico, Ara: Arabinose, Gal: Galactose, POX: Polissacarídeo extraído em oxalato de amônio, GLI: Glicose, Man: manose, Rha: rhamnose.

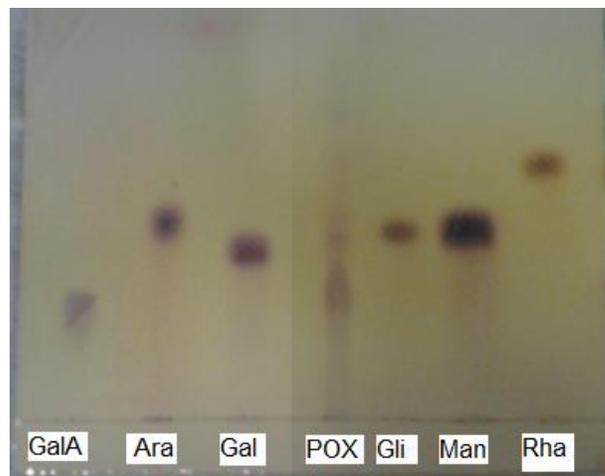


Tabela 1. Resultados dos doseamentos do polissacarídeo POX extraído da cultura de calos de *C. peruvianus*.

Polissacarídeo	Açúcar total	Proteínas	Ácidos Urônicos
POX	27,48%	4,13%	19,80%



Assim, o estudo da composição qualitativa polissacarídeos a partir do calo *C. peruvianus* indicam que células indiferenciadas são capazes de produzir pectinas típicas de uma planta intacta.

CONCLUSÕES

Através das análises espectrofotométricas e CCD foi possível caracterizar preliminarmente o polissacarídeo extraído da cultura de calos de *Cereus peruvianus*. Foram encontrados ácidos urônicos na amostra, o que sugere a presença de pectinas. Em estudos futuros, pretende-se realizar a determinação estrutural do polissacarídeo obtido e avaliar uma provável aplicação farmacêutica.

REFERÊNCIAS

- (1) OLIVEIRA, A. J., MACHADO, M. F. Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Appl Biochem Biotechnol**, v. 104, n. 2, p. 149-55, Feb 2003.
- (2) REZANKA, T., DEMBITSKY, V. M. Very-long-chain alkyl esters in *Cereus peruvianus* wax. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1145-1148, Mar 1998.
- (3) ALVAREZ, M., COSTA, S. C., UTUMI, H., HUBER, A., BECK, R., FONTANA, J. D. The Anionic Glycan from the Cactus *Cereus-Peruvianus* - Structural Features and Potential Uses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34-5, p. 283-295, Spr 1992.
- (4) BARROS, M. J., NOZAKI, J. Pollutants abatement from effluents of paper and pulp industries by flocculation/coagulation and photochemical degradation. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 736-740, Sep-Oct 2002.
- (5) OLIVEIRA, M. A., REIS, E. M., NOZAKI, J. Biokinetic parameters investigation for biological treatment of cassava meal effluents. **Water Air and Soil Pollution**, v. 126, n. 3-4, p. 307-319, Mar 2001.
- (6) FERNANDES, L. M., PEREIRA, N. C., MENDES, E. S., LIMA, O. C. M., COSTA, S. C. Clarificação do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni utilizando o cacto *Cereus peruvianus*. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 6, p. 1369-1374, 2001.
- (7) GOMEZ-GALERA, S., PELACHO, A. M., GENE, A., CAPELL, T., CHRISTOU, P. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 10, p. 1689-1715, Oct 2007.
- (8) GOYCOOLEA, F. M., CARDENAS, A. Pectins from *Opuntia* spp.: A short review. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, v. 5, p. 17-29, 2003.
- (9) 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.
- (10) SASSAKI, G. L., SOUZA, L. M., CIPRIANI, T. R., IACOMINI, M. TLC of carbohydrates. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. e KOWALSKA, T. (Ed.). **Thin layer chromatography in phytochemistry**. Boca Raton, USA: CRC Press, 2008. p. 255-276.
- (11) DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, 1956.
- (12) HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-7, Aug 1972.
- (13) DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L. e WOLFRAN, M. L. (Ed.). **Carbohydrates chemistry**. New York: Academic Press, v. 1, 1962. p. 477-512.
- (14) YAPO, B. M., ROBERT, C., ETIENNE, I., WATHELET, B., PAQUOT, M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1356-1364, 2007.
- (15) CARPITA, N. C., GIBEAUT, D. M. Structural Models of Primary-Cell Walls in Flowering Plants - Consistency of Molecular-Structure with the Physical-Properties of the Walls during Growth. **Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-30, Jan 1993.
- (16) ELE-EKOUNA, J. P., PAU-ROBLOT, C., COURTOIS, B., COURTOIS, J. Chemical characterization of pectin from green tea (*Camellia sinensis*). **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1232-1239, Jan 30 2011.