CINÉTICA DE CRESCIMENTO E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE CALOS DE
***Amburana cearensis* (ALLEMÃO) A. C. SMITH**
DINAH ISE J. G. E C. PINTO¹; JÉSSICA NASCIMENTO COSTA
VASCONCELOS²; JOSÉ RANIERE F. DE SANTANA³; ALONE LIMA BRITO⁴;

1. Bolsista Probioc/UEFS, Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: dinahagro@hotmail.com

2. Doutora em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana; e-mail: jejesmile@hotmail.com

3. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail alone@uefs.br:

4. Professor Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ranieri@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: cultura de tecidos; calogênese; cumaru.

INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários são compostos conhecidos por desempenharem um papel importante na adaptação da planta ao seu ambiente, atuando na defesa contra patógenos e na proteção contra fatores ambientais como os raios ultravioletas (ALVES, 2001). Além disso, estes compostos representam uma fonte relevante de substâncias farmacologicamente ativas, sendo utilizados na fabricação de fitoterápicos.

Diversas espécies de plantas com uso medicinal são encontradas na Caatinga, bioma cuja diversidade biológica abriga espécies caracterizadas pela multiplicidade de usos (CUNHA; FERREIRA, 2003). Um terço da riqueza desse bioma é representado pelas espécies da família Fabaceae (QUEIROZ, 2009). Dentre estas, destaca-se *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Sm. conhecida popularmente como umburana de cheiro, cumaru e amburana de cheiro; espécie muito utilizada pela população devido ao seu potencial medicinal e madeireiro (CARVALHO, 1994).

De acordo com os critérios da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais, *A. cearensis* é uma espécie em perigo; sendo necessário o desenvolvimento de pesquisas que visem a elaboração de modelos de exploração racional e autossustentável para evitar consequências mais danosas (IUCN, 2014).

Técnicas de cultura de tecidos vegetais possibilitam a produção de mudas uniformes e de alta qualidade, bem como de metabólitos de interesse medicinal (OKSMAN – CALDENTY et al., 2004) sem a dependência da planta do campo, consistindo em uma vantagem tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico.

A formação de calos *in vitro* é uma estratégia para a produção de plantas e de metabólitos secundários. Calos são aglomerados celulares que podem ser formado em qualquer tecido vegetal *in vitro* em resposta a uma lesão no tecido ou induzido pelo uso de reguladores vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Diversos estudos com espécies medicinais têm buscado conhecer os fatores que induzem a formação de calos bem como suas características morfológicas e bioquímicas, tendo em vista avaliar o potencial de utilização dos calos para a micropropagação de plantas via organogênese indireta e para a produção de metabólitos com potencial fitoterápico.

O estabelecimento da curva do crescimento dos calos permite a identificação do período adequado para a repicagem e utilização dos calos. O padrão típico de crescimento de calos é sigmoidal, geralmente, apresentando cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária (SOARES, 2003).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a cinética de crescimento e estabelecer o perfil bioquímico dos calos de *A. cearensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção de plantas *in vitro*, sementes de amburana foram lavadas em água corrente por 10 minutos, em seguida desinfestadas em câmara de fluxo laminar com imersão em etanol a 70% por 1 minuto e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio - NaOCl [água sanitária comercial (Qboa ®) - 2,5% de cloro ativo] com 2 gotas de detergente neutro (Ypê ®) por 10 minutos. Após esse período, as sementes foram lavadas quatro vezes com água destilada estéril e inoculadas em tubos contendo 15 mL de meio de cultura, conforme metodologia estabelecida por Campos (2009).

- Indução de calos *in vitro*

O meio de cultura utilizado foi o WPM (Wood Plant Medium), suplementado com 3% de sacarose (Synth ®) e solidificado com 0,7% de Agar (Himedia ®). O pH do meio de cultura foi aferido para $5,7 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N antes da autoclavagem, que foi realizada a temperatura de 121°C e pressão de 1 atm por 15 minutos. Explantes cotiledonares e foliares foram retirados de microplantas com 45 dias de cultivo e cultivados em meio WPM suplementado com 20,67 μM e 26,46 μM de 2,4-D, respectivamente, para a indução dos calos.

- Obtenção da curva de crescimento

A curva de crescimento dos calos foi determinada pela quantificação da matéria fresca (mg) dos calos formados, a partir do dia zero (explantes no dia da inoculação), em intervalos de 7 dias, por um período de 28 dias. O percentual de crescimento dos calos foi determinado por meio da equação: $\text{Pf} - \text{Pi} / \text{Pi} \times 100$, onde Pi = Peso inicial e Pf = Peso final de calos (LAMEIRA, 1997). Foram utilizadas cinco repetições, sendo cada repetição constituída por duas unidades experimentais (dois calos).

- Preparo do extrato

Em estufa de circulação de ar, os calos foram submetidos a secagem durante um período de 7 dias à temperatura de 40°C. Para o preparo do extrato bruto, o material seco (10 g) foi submetido à maceração em metanol (10 ml) através de extrações consecutivas no intervalo de 72h cada. Posteriormente, a solução foi concentrada para eliminação do solvente orgânico e obtenção do extrato bruto.

- Análises bioquímicas dos calos

As análises bioquímicas foram realizadas em calos obtidos aos 0°, 10°, 20°, 30° e 40° dias de cultivo, através do extrato aquoso, conforme metodologia descrita por Nogueira et al. (2008). A quantificação dos açúcares redutores (AR) foram realizadas pelo método do DNS (MILLER, 1959); e da proteína bruta (PB) pelo método de Bradford (1976). Para todas as análises bioquímicas foram utilizadas três repetições experimentais.

- Condições de cultivo

Os experimentos *in vitro* foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de $26 \pm 2^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 16 h e radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtida através de lâmpadas brancas fluorescentes.

- Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo Teste de Tukey para os fatores qualitativos, e ajustes de equação de regressão polinomial para fatores quantitativos. Os dados foram analisados usando o programa SISVAR, desenvolvido pela UFLA (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS

- Curva de crescimento dos calos

Cinco dias após a inoculação, os explantes exibiram aumento de tamanho, provavelmente ocasionado pelo alargamento dos tecidos, seguido da formação dos calos.

Observou-se um crescimento exponencial com 2 fases de crescimento (lag e exponencial) para os calos formados a partir de segmentos foliares e cotilédones de *A. cearensis*. (Figura 1).

Figura 1: Curva de crescimento de calos de *Amburana cearensis* obtidos a partir de folhas (A) e cotilédones (B) inoculados em meio WPM suplementado com 26,46 e 26,46 μM de 2,4-D, respectivamente, aos 0°, 7°, 14°, 21° e 28° dias de cultivo. Feira de Santana, 2017.

- Análises bioquímicas

A análise bioquímica dos calos de *A. cearensis* revelou uma diminuição dos teores de açúcar redutores e aumento dos teores de proteínas totais ao longo do tempo de cultivo para ambos os explantes. Os teores de proteínas totais dos calos originados de cotilédones aumentaram expressivamente a partir do 7° dia, já o aumento significativo desse teor nos calos originados de segmentos foliares foi observado a partir do 21^o de cultivo (Figura 2).

Figura 2: Teores de proteínas (A) e açúcares redutores em calos de *Amburana cearensis* obtidos a partir de cotilédones e folhas inoculados em meio WPM suplementado com 26,46 e 20,67 μ M de 2,4-D respectivamente, aos 0°, 7°, 14°, 21° e 28° dias de cultivo. Feira de Santana, 2016.

Considerando o teor de açúcares redutores, verificou-se uma redução durante o tempo de cultivo com o teor máximo de açúcares redutores no dia da inoculação dos explantes. Essa diminuição está relacionada com o aumento do teor de proteínas visto que a energia necessária para a síntese proteica é liberada do catabolismo dos carboidratos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o crescimento dos calos em *Amburana cearensis* há aumento de proteínas e diminuição do teor de açúcares redutores.

Sugere-se um maior período de avaliação da curva de crescimento para determinar quando o calo deve ser transferido para um novo meio de cultura.

REFERÊNCIAS

- ALVES H.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. 3: 10-15, 2001.
- CAMPOS, V. C. A. **Micropropagação de Amburana cearensis (ALLEMÃO) A. C. SMITH**. Dissertação (mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, p.102, 2009.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturas, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA, 1994.
- CUNHA, M.C.L.; FERREIRA, R.A. Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A.C. Smith -cumaru – LeguminosaePapilionoideae. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.2, p.89-96, 2003.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computerstatisticalanalysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EDUFSCAR, 152 p, 2003.
- IUCN - International Union for Conservation of Nature. **The IUCN RedList of threatened species**. 2014. Disponível em : <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em 13/03/2016.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- SOARES, G. de A. **Aspectos do cultivo in vitro do ingazeiro (Inga vera Willd. Subsp. Affinis (DC) T. D. Penn.)** 90 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003
- NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; LIMA, E.C.; SOARES, G.A.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, B.R.; EMRICH, E.B.; CASTRO, A.H.F. **Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (Byrsonima intermédia A Juss.)** Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v.10, n.1, p.44-48. 2008.
- OKSMAN-CALDENTY, K. & INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 433-440, 2004.
- QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da Caatinga. Feira de Santana**. Universidade Estadual de Feira de Santana. Kew: **Botanic Gardens**, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.