



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

# Desenvolvimento de materiais poliméricos-suportes inteligentes como meio de cultura para germinação *in vitro* de sementes de orquídeas

## *Development of intelligent polymeric-support materials as a culture medium for *in vitro* germination of orchid seeds*

Gabriela Pereira\*, Betty C. Kuhn<sup>†</sup>, Reinaldo Y. Morita<sup>‡</sup>

### RESUMO

O presente estudo visou avaliar a substituição do ágar nos meios de cultivos de plantas por gelatina extraída da pele de tilápia do Nilo, gerando assim economia por se tratar de um subproduto nacional, além de gerar valor agregado ao subproduto. As peles utilizadas foram obtidas por meio de parceria entre a UTFPR e uma empresa regional. A extração da gelatina de tilápia se deu através de uma extração físico-química e o preparo do meio de cultivo utilizando o meio de cultivo MS e sacarose. Não foi possível fazer a inoculação das plantas no meio, devido o gel extraído ser líquido em temperaturas acima de 20°C e o agente reticulante utilizado não favorecer a reticulação para o coloide extraído. Porém a incorporação do meio de cultivo MS e da sacarose no gel gerou um ótimo resultado. Para fins favoráveis de pesquisa, sugere-se utilizar um outro agente reticulante, a transglutaminase e avaliar a reação.

**Palavras-chave:** Gelatina, Meio de cultivo, Pele de tilápia do Nilo.

### ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the replacement of agar in the plant growth media by gelatin extracted from the skin of Nile tilapia, thus generating savings because it is a national by-product, besides generating added value to the by-product. The skins used were obtained through a partnership between the UTFPR and a regional company. The extraction of the tilapia gelatin was done through a physical-chemical extraction and the preparation of the culture medium using MS culture medium and sucrose. It was not possible to inoculate the plants in the medium, because the extracted gel is liquid at temperatures above 20°C and the crosslinking agent used does not favor crosslinking for the extracted colloid. However, the incorporation of the MS medium and sucrose in the gel generated an excellent result. For favorable research purposes, it is suggested to use another cross-linking agent, transglutaminase, and evaluate the reaction.

**Keywords:** Gelatin, Culture medium, Nile tilapia skin.

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* de plantas é de extrema importância e de grande interesse econômico, visto que propaga um número significativo de plantas com qualidade e via de crescimento celular com controle microbiológico rigoroso e assertivo. Esse cultivo se dá por meio da cultura de células e tecidos vegetais, chamados explantes, em condições sanitárias e fatores ambientais controlados, em um meio nutritivo sintético líquido ou semissólido, no qual há a adição de um agente gelificante no meio (QUISEN & ANGELO, 2008).

\* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; gabrielap.2016@alunos.utfpr.edu.br

<sup>†</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; bettykuhn@utfpr.edu.br

<sup>‡</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; rmorita@utfpr.edu.br



Usualmente na cultura de tecidos vegetais, o meio sólido ou semissólido é o mais utilizado, nos qual utiliza-se o ágar, extraído de algas marinhas, como agente gelificante para dar estabilidade ao meio (QUISEM & ANGELO, 2008). Porém no Brasil, o ágar utilizado geralmente é importado, tornando o uso mais caro. Por isso, utilizar outros agentes gelificantes, de outras fontes naturais e presentes no país geraria uma grande economia para esse tipo de cultura.

Já há trabalhos em que se substitui o ágar por outros gelificantes como amido de milho (PEREIRA, M.R et al, 2015), amido de mandioca (COSTA et al, 2007), goma de Angico (PEREIRA et al, 2013), hidrogel (VIEIRA, 2018), entre outros.

A tilápia do Nilo é um peixe muito cultivado no Brasil, sendo o Paraná o produtor de 34,14% de toda a produção nacional (LOPES et al, 2021). Dentre os resíduos gerados pela indústria alimentícia de filetagem do peixe em questão, está a pele. A pele da tilápia do Nilo é rica em colágeno do tipo I, que quando hidrolisado forma a gelatina, que possui alta propriedade gelificante e é solúvel em água (SILVA & PENNA, 2012). Esta pode ser vista como uma alternativa para o uso do ágar, visto que o colágeno em si possui a característica de dar sustentação aos tecidos nos quais se encontra além de ser biodegradável (OLIVEIRA et al, 2017).

A gelatina pode ser extraída através de um processo físico-químico, utilizando bases fortes para a remoção dos pigmentos e gorduras presentes na pele do peixe e ácidos fortes para hidrolisar o colágeno, sendo de extrema importância o controle de temperatura de extração em banho termostático, visando evitar a diminuição da massa molecular do colágeno que ocasionaria numa baixa taxa de viscosidade e gelificação, não formando gel. Diante disto, seria a gelatina extraída da pele de tilápia do Nilo um próspero substituto do ágar? O presente trabalho teve como objetivo avaliar a substituição do ágar na composição de meios semissólidos, pela gelatina de pele de tilápia, visando o estabelecimento do cultivo in vitro de plantas.

## 2 MÉTODO

### 2.1 Material

As peles utilizadas para a extração do colágeno foram obtidas em parceria com o Frigorífico de filetagem de peixes Santa Clara, localizado na cidade de Francisco Beltrão – PR. Já as plantas para o cultivo foram utilizadas do próprio acervo de cultivares da UTFPR-DV.

### 2.2 Extração da gelatina de tilápia do Nilo

As peles em tamanho original passam por um tratamento básico, visando a remoção de gordura e pigmentos, seguido de um banho ácido, no intuito de promover a hidrólise ácida do gel.

Tratamento básico: as amostras são colocadas em uma solução de NaOH, 2 mol L<sup>-1</sup>, onde permanecem por 40 min sob agitação constante num agitador magnético. Após esse processo as peles são lavadas com água destilada, para neutralização de pH.

Tratamento ácido: nesta etapa, as peles são imersas numa solução de HCl 1 mol L<sup>-1</sup>, onde permanecem em agitação, durante 40 min. As peles são lavadas com água destilada para neutralização e ajuste de pH, medido com auxílio de tiras universais de pH.

Após o tratamento ácido e básico a pele está pronta para a extração em banho termostático a 40 °C, por aproximadamente 75 min. A solução é filtrada num funil de Buchner com papel filtro, utilizando bomba a vácuo. E a solução foi armazenada em um local adequado para posterior uso.



### 2.3 Preparo do meio de cultura

O meio foi preparado utilizando o colágeno extraído em duas concentrações, sendo os experimentos em triplicata:

1. 10 % do gel extraído em 200 mL de água e acrescido com o meio de cultivo MS e sacarose
2. 100 % do gel, ou seja, 200 mL de gel acrescido com meio de cultivo MS e sacarose.

Então os frascos foram autoclavados e resfriados para determinar se o meio de cultivo e a sacarose incorporaram no gelificante utilizado, fazendo uma análise qualitativa em relação ao meio preparado com ágar, que consiste em analisar a gelificação do meio, a dispersão total do meio MS e da sacarose no coloide e a cor do meio formada. tratamento ácido e básico a pele está pronta para a extração em banho termostático a 40 °C, por aproximadamente 75 min. A solução é filtrada num funil de Buchner com papel filtro, utilizando bomba a vácuo. E, a solução é armazenada em um local adequado para posterior uso.

### 2.4 Reticulação do meio de cultura

A inoculação das plantas acontece em temperatura ambiente, para que o meio ficasse estável e gelificasse a 25 °C, foi adicionado ao meio preparado 4 % (m/v) de cloreto de cálcio, um agente reticulante usualmente utilizado para reticular soluções de alginato de sódio.

## 3 RESULTADOS

A extração do colágeno de tilápia do Nilo obteve êxito em extrair um gel com temperatura e concentração dos reagentes usados no processo que não interferissem na qualidade do produto, sendo de boa gelificação.

O meio preparado com 10 % de gel, não obteve êxito, pois ficou muito diluído impedindo a gelificação do meio. Já com 100 % e incorporação do meio MS e Sacarose teve um bom resultado no que tange a incorporação com o agente gelificante e formação de gelatina quando resfriado a -4 °C em refrigerador. Além disso, a cor do gel extraído ficou muito próxima ao ágar, como podemos ver na Fig. 1 e 2 a seguir.

**Figura 1 - Gel extraído acrescido de meio de cultivo e sacarose resfriado**



Fonte: Autoria própria (2021)

**Figura 2 - Gel extraído acrescido de meio de cultivo e sacarose**



Fonte: Autoria própria (2021)

A utilização de cloreto de cálcio como agente reticulante para a gelatina não obteve um bom resultado, não interferindo em nada no meio, que continuou líquido. Isso pode ter ocorrido porque o reticulante utilizado não conseguiu promover uma grande interação entre cadeias para promover a diminuição da solubilidade do meio. Para que este inconveniente seja resolvido, propomos utilizar um outro agente reticulante a transglutaminase. Uma proteína amplamente utilizada na reticulação de proteínas de origens diversas, que age através da catalização de reação de transferência de grupos C carboxi-amida de peptídeos ou resíduos de glutamina ligados a proteínas, fazendo uma reticulação intra/intermolecular das ligações peptídicas (WANG et al, 2015). Sendo assim, uma boa alternativa para o problema exposto.

O fato de o meio ficar líquido em temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C se deve ao fato do hidrocóide utilizado ser líquido em temperaturas acima de 20 °C e ao retirarmos da geladeira e deixarmos em temperatura ambiente ele voltou a ser líquido.

#### 4 CONCLUSÃO

Diante do exposto, podemos concluir que a gelatina extraída da pele da tilápia do Nilo possui um grande potencial para substituir o ágar, tendo como base o resultado relacionado a incorporação do meio de cultivo MS e a sacarose. E, para que o resultado seja ainda mais próspero é necessário resolver a questão da temperatura de transição de fase do gel extraído, utilizando reticulação, visando uma maior união das cadeias polipeptídicas presentes no meio em temperatura ambiente, para então poder realizar análises quanto a inoculação de plantas no meio de cultivo.

#### REFERÊNCIAS

COSTA, F. H. S. et al. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio cultura no cultivo in vitro de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência Agrotecnica** Lavras, v. 31, n.1, p. 41-46, jan./fev., 2007. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2021/> . Acesso em: 21 abr. 2021.

LOPES, Ana Livia et al. **Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2021**. 2021.

OLIVEIRA, V. D. M et al. Colágeno : características gerais e produção de peptídeos bioativos - uma revisão com ênfase nos subprodutos do pescado Collagen : general characteristics and



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um  
mundo em transformação

- production of bioactive peptides. **Acta Fish**, v. 5, p. 56–68, 2017. Disponível em: <https://seer.ufs.br/index.php/ActaFish/article/view/5833/5614>. Acesso em: jun 2021.
- PEREIRA, M.R; CARVALHO, V.S; LUCAS, E.F; GRAVINA, G.A. Amido de Milho e Hipoclorito de Sódio no enraizamento in vitro do abacaxizeiro Vitória e seu efeito na aclimação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 528- 533 , Jaboticabal, 2015.
- PEREIRA, W.J, *et al.* Uso de goma de angico em substituição ao ágar em meio de cultura. **Revista de Biotecnologia e Ciência**, v.2, n.2, 2013.
- QUISEN R.C; ANGELO P. C. S. Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus. Embrapa Amazônia Ocidental, 2008, 44p.
- SILVA TF, PENNA ALB. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 2012.
- VIEIRA, K.M. O Hidrogel pode ser uma alternativa ao uso de ágar em cultura de tecidos vegetais? **Dissertação**, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 148 pg, 2018.
- WANG. Y, *et al*, Transglutaminase-induced crosslinking of gelatin–calcium carbonate composite films, **Food Chemistry**, v. 166, 2015.