

# AVALIAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS DE CALOS DE SOJA CULTIVADOS COM NANOPARTÍCULAS

**Palavras-Chave:** Calos embriogênicos, decomposição, extração, nanopartículas

**Autores/as:**

**João Gabriel Veneziani Kamezawa, UG, UNICAMP**

**Elisânia Kelly Barbosa Fonseca, PG, UNICAMP**

**Dr<sup>a</sup> Lilian Seiko Kato, R, UNICAMP**

**Dr<sup>a</sup> Anerise de Barros, R, UNICAMP**

**Prof. Dr. Italo Odone Mazali, R, UNICAMP**

**Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, R, UNICAMP**

## INTRODUÇÃO:

A produção e exportação de soja é uma das bases da economia brasileira. Por ser uma *commoditie* barata, para ser rentável, sua produção precisa ser em larga escala. No entanto, há um limite na expansão do território para o cultivo de soja. Portanto, para manter uma larga produção e com alta qualidade, o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas é de grande interesse para o país. A partir da semente de soja se obtêm diversos derivados, como ração animal, óleo, biodiesel, entre outros(1), e, por isso, possui uma grande demanda. No entanto, a área para o cultivo de soja é limitada e o aumento da produção de grãos passa a ser baseada em um cultivo mais efetivo. Diversas técnicas biotecnológicas são investigadas para potencializar a produção agrícola, como, por exemplo, a embriogênese somática.

A embriogênese somática (ES) é uma técnica de clonagem que consiste na desdiferenciação das células vegetais, ou seja, tornar células diferenciadas e com funções específicas em células não diferenciadas, como um embrião(2). Essas células embrionárias são cultivadas *in vitro* e formam aglomerados chamados de calos. Os calos podem ser multiplicados de forma muito rápida e com baixo custo, produzindo uma grande quantidade de células embrionárias. Além disso, eles podem ser induzidos a começar a diferenciar suas células, dando início a

germinação de uma planta, ou até o crescimento de órgãos específicos(2). Logo, é possível, a partir de um explante de planta, produzir diversos clones, sem a necessidade de semente. Porém, os calos ainda são muito pouco conhecidos, eles possuem características específicas e são diferentes para cada origem de espécie vegetal. De tal maneira, o presente trabalho tem como objetivo investigar os principais micronutrientes dos calos de soja originados por embriogênese somática, e como a presença de nanopartículas de Ouro (AuNPs) no meio de cultura dos calos afeta a absorção desses nutrientes.

## METODOLOGIA:

As amostras empregadas no trabalho foram produzidas no grupo de pesquisa. Os calos foram induzidos a partir do cotilédone de plantas de soja transgênica da linhagem RR. Após a indução, os calos foram transferidos para meios de cultivo de propagação. Diferentes meios de cultivo de propagação foram preparados com AuNP em concentrações de 0.1 mg.L<sup>-1</sup> e 10 mg.L<sup>-1</sup>.

### 1) DECOMPOSIÇÃO ASSISTIDA POR MICROONDAS

A decomposição ácida assistida por microondas foi realizada algumas vezes buscando encontrar quais eram as melhores condições para garantir uma decomposição completa. As amostras utilizadas

foram produzidas pelo grupo de pesquisa e armazenadas a -40 °C. Os calos foram moídos e homogeneizados ainda congelados em um almofariz de porcelana, cerca de 25 mg eram adicionados diretamente nos micros frascos do microondas, em seguida, 250 µL de HNO<sub>3</sub> subdestilado e 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v) também eram adicionados. O programa utilizado foi de 5 min a 240W, 5 min a 420 W, 5 min a 600 W e 15 min 800 W. O aparelho empregado é modelo DGT-100 Plus (Provecto Analítica, Jundiaí, Brasil). Após a decomposição, as amostras eram coletadas fazendo a lavagem dos frascos, e foram armazenadas até a análise. Para avaliar se a decomposição estava sendo efetiva, o mesmo método foi empregado com um material de referência certificado (SRM) de farinha de arroz (NIST 1568a).

## 2) EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

A extração foi realizada em frascos *ependorf*, adicionando 25 mg de amostra, 250 µL de HNO<sub>3</sub> e 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 100 µL de água deionizada. Os frascos eram fechados com um suporte de plástico que impedia sua abertura durante a sonicação e suportava seis frascos simultaneamente. O banho de ultrassom focalizado (*CupHorn*) foi empregado por 10 min com 60% de sua amplitude, no modo de 1 min on/off. A potência máxima do ultrassom foi cerca de 90 W, com uma aplicação de energia por volta de 50 000 J. Após a extração as amostras foram filtradas e armazenadas para análise.

## 3) DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS

As determinações dos analitos foram realizadas por meio de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). O equipamento empregado foi o iCAP TQ (Thermo Fischer Scientific, Alemanha), as condições do equipamento foram ajustadas para passar no teste performance do próprio instrumento. A potência do plasma é de 1550 W, a vazão do gás do plasma 14 L.min<sup>-1</sup>, do gás auxiliar 0.8 L.min<sup>-1</sup> e do gás nebulizador de 0.950 – 1.013 L.min<sup>-1</sup>. O sistema de introdução é composto de uma câmara de nebulização ciclônica e um nebulizador concêntrico MicroMist. As razões massa/carga monitoradas e os gases de reação ou colisão empregados estão apresentados na Tabela 1.

Para melhor monitorar possíveis variações de leitura foi utilizada uma conexão em Y no sistema de introdução de amostra para adição de uma solução 10 µg.L<sup>-1</sup> de Sc, Rh e Y, empregados como padrão interno, sendo o Rh para avaliar as medidas feitas no modo KED, e o Sc e Y para as medidas feitas no modo TQ-O<sub>2</sub>, triplo quadrupolo com cela de reação. As razões massa/carga finais monitoradas dos padrões interno são <sup>45</sup>Sc<sup>16</sup>O, <sup>89</sup>Y<sup>16</sup>O e <sup>103</sup>Rh.

Tabela 1. Razões massa/carga (m/z) monitoradas e modo de aquisição do ICP-MS.

	1° Quadrupolo	Cela de Reação/Colisão	2° Quadrupolo
Cu	NDA*	KED (He)	<sup>63</sup> Cu
Cu	<sup>63</sup> Cu	O <sub>2</sub>	<sup>63</sup> Cu
Fe	NDA*	KED (He)	<sup>57</sup> Fe
Mn	NDA*	KED (He)	<sup>55</sup> Mn
Mo	<sup>98</sup> Mo	O <sub>2</sub>	<sup>98</sup> Mo <sup>16</sup> O
Zn	NDA*	KED (He)	<sup>66</sup> Zn
Zn	<sup>66</sup> Zn	O <sub>2</sub>	<sup>66</sup> Zn <sup>16</sup> O

\*NDA – Nenhuma massa carga filtrada

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Utilizando o método de decomposição, a concentração dos analitos determinados estão apresentados na Tabela 2. É possível observar que os valores obtidos para os micronutrientes, com exceção do Zn, estão entre 80% e 110% dos valores certificados, o que é uma recuperação aceitável dada a concentração no material de referência(3). Tendo em vista que a matriz de farinha de arroz é mais complexa e robusta em comparação aos calos, considerou-se que o método seria o suficiente para a decomposição completa das amostras de calos de soja.

Tabela 2. Recuperação dos analitos pelo método de decomposição ácida assistida por microondas do material certificado NIST1568a.

Analito	Valor Certificado (mg.kg <sup>-1</sup> )	Valor Obtido (mg.kg <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
Cu	2.4 ± 0.3	2.1 ± 0.5	87.50
Fe	7.4 ± 0.9	6.4 ± 2.1	86.49
Mn	20.0 ± 1.6	20.1 ± 2.1	100.50
Mo	1.46 ± 0.08	1.5 ± 0.2	102.74
Zn	19.4 ± 0.5	14.3 ± 3.1	73.71

Os valores de concentrações dos analitos encontrados nos calos de soja utilizando esse método (Tabela 3) foram tomados como referência. Nota-se que a concentração do Cu ficou abaixo do limite de detecção, de  $1.56 \text{ mg.L}^{-1}$ , indicando uma concentração muito baixa. O Cobre é um micronutriente que exerce diversas funções no metabolismo das plantas. Em especial, uma de suas importantes funções é participar nos mecanismos de transferência de elétrons, podendo ser um agente tanto oxidante como redutor(4). Por conta disso, altas concentrações de Cobre nas células podem ser potencialmente tóxicas, devido à alta formação de espécies reativas que diminuem o seu tempo de vida(4, 5). Outro elemento que apresenta menores concentrações que os demais é o Molibdênio, no entanto, essa menor concentração está relacionada com uma menor quantidade de proteínas dependentes de Molibdênio(4). Os demais micronutrientes como Fe, Mn e Zn estão presentes nos calos em uma maior concentração, por volta de  $10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Tabela 3. Concentração dos micronutrientes em calos de soja.

	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn
Conc. em calos de soja ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	<LOQ	$15.4 \pm 4.0$	$15.7 \pm 3.0$	$0.50 \pm 0.08$	$9.5 \pm 1.5$

\* <LOQ - Abaixo do limite de quantificação ( $1.56 \text{ mg.L}^{-1}$ )

A avaliação do método de extração foi feita em base com os valores encontrados pela decomposição. Os valores encontrados pela extração foram comparados por meio do teste t-student com 95% de confiança. Para Fe, Mn, Mo e Zn foram encontrados valores estatisticamente iguais para os dois métodos (Figura 1). Não foi possível realizar a comparação para o Cu, pois não foi possível determiná-lo pelo método de decomposição.

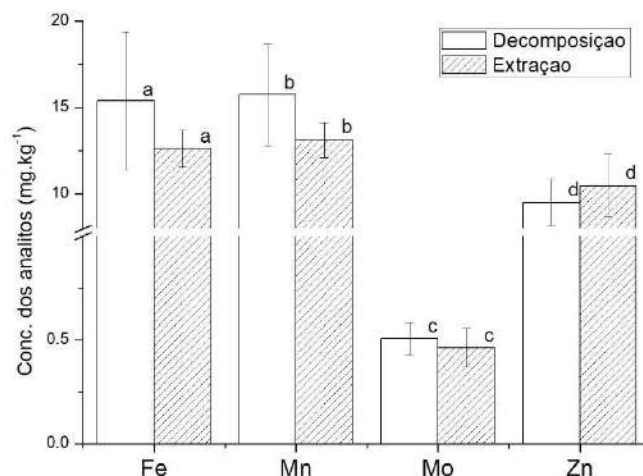


Figura 1. Concentrações dos micronutrientes em calos de soja preparados pelo método de decomposição ácida assistida por microondas e por extração ácida assistida por ultrassom.

Portanto, o método de extração se mostra confiável para a determinação de Fe, Mn, Mo e Zn na amostra. Vale ressaltar que por se tratar de uma amostra biológica e empregar a massa úmida dos calos é esperado que haja uma grande variância das medidas.

O método de extração desenvolvido foi empregado para determinação dos micronutrientes nos calos cultivados em meios de cultura com nanopartículas de ouro (AuNP) de 15 nm, em concentração de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ . Comparando as medidas encontrou-se uma diminuição na concentração dos micronutrientes com exceção do Zn, que não teve alteração independente da concentração de AuNPs (Figura 3). No caso do Fe e Mo a diminuição foi igual ( $p > 0.05$ ) indicando que a diferença de concentração não causou mudança significativa. No entanto, no caso do Mn a maior concentração de AuNPs causou uma diminuição significativamente menor.

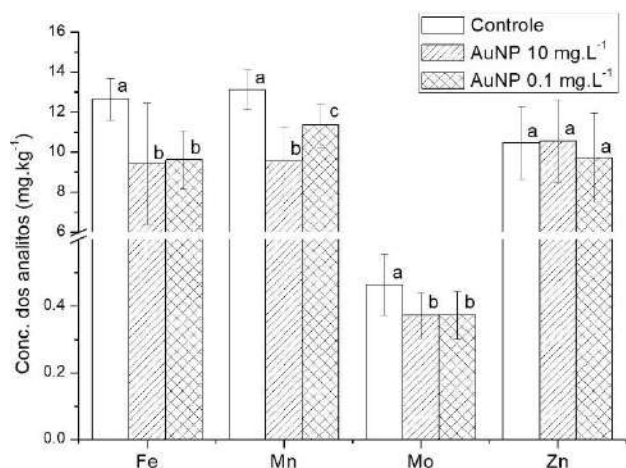


Figura 2. Concentrações dos micronutrientes em calos de soja cultivados em meio de cultura com AuNPs em concentrações de 0.1 mg.L<sup>-1</sup> e 10 mg.L<sup>-1</sup> preparados pelo método de extração ácida assistida por ultrassom.

Em plantas, os íons de Fe participam da respiração mitocondrial e na biossíntese de hormônios, participando principalmente na forma de proteínas Fe-S ou proteínas heme(4). Já o Mn ocorre normalmente nas plantas nas formas Mn<sup>2+</sup>, Mn<sup>3+</sup> e Mn<sup>4+</sup> e participa da ativação de diferentes enzimas, no entanto, a maioria delas podem substituir o cátion metálico por Magnésio(6). Existem quatro principais enzimas dependentes de Mo que ocorrem principalmente em plantas e atuam na assimilação de nitrogênio(4, 7). O Zn por sua vez participa em reações de oxirredutase, além de exercer função estrutural em diversas proteínas e em interações proteína-proteína(4, 8).

A presença ou falta de alguns micronutrientes pode afetar a indução e o desenvolvimento dos calos. Kintzion *et al.* mostrou que adicionar sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) pode auxiliar no crescimento dos calos de *Rosa hybrids* L. e de *Capsicum annum* L., e que a diminuição da concentração de sulfato de manganês (MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O) ou de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) não altera o crescimento dos calos de forma significativa em relação ao grupo controle(9, 10). Esses estudos podem indicar alguns possíveis comportamentos dos calos tratados com AuNPs, ainda que haja uma importante diferença entre disponibilidade de nutriente e sua absorção. Não há indicações se com o aumento da presença de Cu os calos absorvem mais Cu, nem a diminuição de absorção de Mn ou Zn com a diminuição da presença dos respectivos sais. Por isso é importante estudos que investigam a incorporação dos micronutrientes e como isso pode afetar no desenvolvimento dos calos.

Mais ainda, também é importante ressaltar que as diferentes espécies vegetais podem levar a comportamentos distintos nas mesmas condições.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS:

Os métodos desenvolvidos foram empregados para determinação dos micronutrientes Fe, Mn, Mo e Zn em calos de soja. A decomposição ácida assistida por microondas foi realizada com uma matriz mais complexa para garantir a total decomposição da amostra, se apresentando como um método válido para os calos de soja. O método de extração assistida por ultrassom mostrou concordância com os valores obtidos, sendo um método mais simples, menos trabalhoso e que apresenta menor risco. No entanto, para ambos não foi possível determinar a concentração de Cu nas amostras, devido à baixa concentração.

Avaliando os calos de soja controle e os cultivados em meio de cultura com AuNPs nota-se que houve uma queda na concentração dos micronutrientes, com exceção do Zn. É preciso investigar melhor se as AuNPs estão afetando a capacidade dos calos de absorção dos micronutrientes ou se estão influenciando a extração dos micronutrientes. Além disso, a avaliação da incorporação de ouro pelos calos ainda precisa ser avaliada.

## BIBLIOGRAFIA

- HIRAKURI, M. and LAZZAROTTO, J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. **Embrapa Soja [online]**. v. 1<sup>a</sup> Edição, n. 2176–2937, p. 37. 2014. Available from: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104753/1/O-agronegocio-da-soja-nos-contextos-mundial-e-brasileiro.pdf>. Acesso em: 03 de Novembro de 2021.
- MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, Hugo A.; LEDEZMA-RODRÍGUEZ, Maharshi; AVILEZ-MONTALVO, Randy N.; JUÁREZ-GÓMEZ, Yary L.; SKEETE, Analesa; AVILEZ-MONTALVO, Johnny; DE-LA-PEÑA, Clelia and LOYOLA-VARGAS, Víctor M. Signaling Overview of Plant

- Somatic Embryogenesis. **Frontiers in plant science**. v. 10, p. 77. 2019. DOI 10.3389/fpls.2019.00077.
3. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. **Association of Official Analysis Chemists International**. 2005.
  4. HÄNSCH, Robert and MENDEL, Ralf R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in plant biology**, v. 12, n. 3, p. 259-266, 2009.
  5. TADDEI, S.; BERNARDI, R.; SALVINI, M.; PUGLIESI, C. and DURANTE, M. Effect of copper on callus growth and gene expression of in vitro-cultured pith explants of *Nicotiana glauca*. **Plant Biosystems**. v. 141, n. 2, p. 194–203, 2007. DOI 10.1080/11263500701401521.
  6. HEBBERN, Christopher A.; LAURSEN, Kristian Holst; LADEGAARD, Anne H.; SCHMIDT, Sidsel B.; PEDAS, Pai; BRUHN, Dan; SCHJOERRING, Jan K.; WULFSOHN, Dvoralai and HUSTED, Søren. Latent manganese deficiency increases transpiration in barley (*Hordeum vulgare*). **Physiologia Plantarum**. v. 135, n. 3, p. 307–316. 2009. DOI 10.1111/j.1399-3054.2008.01188.x.
  7. SCHWARZ, Günter and MENDEL, Ralf R. Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 57, n. 1, p. 623-647, 2006.
  8. KRÄMER, Ute; CLEMENS, Stephan. Functions and homeostasis of zinc, copper and nickel in plants. **Molecular biology of metal homeostasis and detoxification: From microbes to man**, p. 215-271, 2006.
  9. KINTZIOS, S; DROSSOPOULOS, J B and LYMPEROPOULOS, C. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 67, p. 55-62, 2001.
  10. KINTZIOS, S.; DROSSOPOULOS, J. B. and LYMPEROPOULOS, C. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from young mature leaves of rose. **Journal of Plant Nutrition**. v. 23, n. 10, p. 1407–1420. 2000. DOI 10.1080/01904160009382111.