

Estabelecimento de culturas *in vitro* de *Sinningia warmingii* (Hiern) Chautems (*Gesneriaceae*) para a prospecção de bioativos com aplicação potencial na psoríase

Palavras-Chave: Culturas de plantas *in vitro*, Bioativos, Psoríase

Autores:

André Líbero Garcia, FCF – UNICAMP

Prof. Dr. Marcos José Salvador (orientador), IB – UNICAMP

Me. Carlos José Alvarez Cantero (coautor), IB – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O uso de cultura de tecido vegetal para produção de metabólitos secundários *in vitro* é promissor, permitindo rápida proliferação celular e estudos sob condições controladas. Pesquisas com *Sinningia*, da família Gesneriaceae, revelaram grande diversidade química em seus metabólitos, os quais incluem substâncias com atividades antioxidante, anticancerígena e anti-inflamatória, havendo potencial terapêutico para condições como a psoríase. Muitos desses metabólitos, no entanto, são obtidos de partes subterrâneas, exigindo o desenraizamento da planta. A cultura de células e tecidos vegetais *in vitro* surge como alternativa para o estudo desses compostos.

O cultivo de células vegetais *in vitro* é realizado em busca de mais praticidade e controle sobre o material vegetal estudado, ao passo que o cultivo *in natura* tem por objetivo estabelecer condições fidedignas àquelas existentes no hábitat natural da planta. Devido a tal disparidade entre as condições às quais ambos os tecidos vegetais estão expostos, é possível traçar um paralelo entre o metabolismo secundário de ambas, e isso será feito posteriormente por meio de análises cromatográficas.

Este projeto é inédito, e visa estabelecer culturas celulares da planta *Sinningia warmingii* para avaliar respostas metabólicas e prospecção de moléculas bioativas para tratamento da psoríase, utilizando abordagens de desreplicação, avaliação da atividade antioxidante (ORAC-FL), citotoxicidade e avaliação do efeito anti-inflamatório *in vitro* do extrato com melhores resultados em termos de rendimento em massa, perfil químico HPLC-UV/DAD-ESI-MS e bioatividade, buscando desenvolver novos agentes terapêuticos naturais com potencial aplicação clínica.

1. Cultivo, coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal da planta *in natura* de *Sinningia warmingii* (Hiern) Chautems foi coletada em seu hábitat natural, na cidade de Corupá (SC). A identificação botânica foi realizada pelo Dr. Alain

Chautems (Conservatorio y Jardín Botánico de Genebra, Genebra, Suíça), especialista da família Gesneriaceae. Esta espécie está sendo mantida e cultivada em casa de vegetação no Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como nas figuras abaixo, pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marcos José Salvador, sob regime de cocultura com outras espécies do mesmo gênero. Tanto a irrigação quanto a remoção de plantas indesejadas ocorrem periodicamente.



Figura 1 - *Sinningia warmingii* in natura



Figura 2 - *S. warmingii* in natura com flores

2. Estabelecimento e manutenção de culturas *in vitro* das plantas

O estabelecimento e manutenção da cultura *in vitro* das plantas foi baseado em protocolos já desenvolvidos no Laboratório de Metabolismo Vegetal, Bioensaios e Tecnologia Fitofarmacêutica-LMBTF do Departamento de Biologia Vegetal/IB-UNICAMP pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marcos José Salvador e com base em dados da literatura (SERAIN et al., 2021; ROCHA, 2002), e todos os procedimentos foram realizados dentro de fluxo laminar com a finalidade de evitar contaminações.

Na germinação *in vitro* as condições de luz, temperatura e umidade se mantiveram sempre controladas. Houve produção periódica do meio de cultura semi-sólido MS, acrescido de 0,5 g/L de carvão vegetal, sem adição de reguladores de crescimento. A formação das cápsulas contendo as sementes foi induzida segundo o método protocolado, tal como a assepsia das mesmas. As cápsulas foram então lavadas em água destilada e autoclavada e cortadas para liberação das sementes, que foram semeadas em frascos de vidro contendo meio de cultura MS esterilizado, com uma média de 96 sementes em cada frasco.



Figura 3 - Sementes de *S. warmingii*



Figura 4 - Plântula de *S. warmingii* em germinação



Figura 5 - Cultivo *in vitro* após um mês e uma semana



Figura 6 - Plântulas após repicagem

Os frascos foram colocados em B.O.D. com fotoperíodo 14/10h, em temperatura de 25°C. Tendo em vista a alta taxa de contaminação (mais de 50%), não foi possível estimar estatisticamente com precisão taxa de germinação, no entanto, para as sementes de sucesso (não contaminadas), houve dois frascos em que ocorreu germinação. As figuras abaixo mostram, respectivamente, um frasco contendo sementes e um frasco em que houve germinação de uma delas.

Foram realizadas repicagens respeitando o desenvolvimento da planta frente às condições *in vitro*, transferindo cuidadosamente as novas plantas para novos frascos com meio fresco e esterilizado. Ao se obter quantidade suficiente de material para os tratamentos, a massa das células fresca foi seca, o material em seguida pesado a fim de ser submetido à extração.

3. Obtenção de extratos brutos

O material vegetal (planta total) das plantas *in natura* e planta *in vitro*, foi lavado em água corrente, estabilizado (exposto à temperatura de 50°C por 5 min) e seco em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C (de três a seis dias). Após pulverização em moinho de facas, o pó vegetal foi submetido ao processo de maceração com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (diclorometano – DCM e Etanol - EtOH) a uma proporção pó/solvente de 1:10 (massa/volume), com subsequente eliminação dos solventes, sob pressão reduzida em rotoevaporador, para obtenção dos extratos brutos em DCM e EtOH.

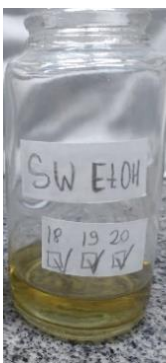


Figura 8 - Extrato de *S. warmingii* em EtOH antes de ser exposto para evaporação

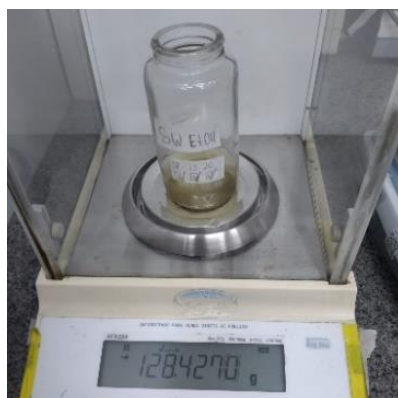


Figura 7 - Extrato de *S. warmingii* em EtOH após evaporação

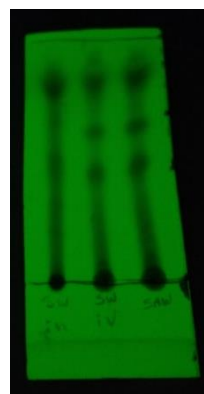


Figura 9 - Placa de CCD de três extratos em diclorometano

O material foi deixado em capela de exaustão para a evaporação do solvente, resultando em 74,5 mg de SW *in vitro* EtOH e 53,8 mg de SW *in vitro* DCM. Algumas etapas do processo de obtenção desses extratos foram registradas nas figuras acima.

Os extratos em diclorometano foram submetidos à uma análise da sua composição química, primeiramente por meio de cromatografia de camada delgada, utilizando como fase móvel Clorofórmio e Metanol, à uma proporção 95:5. Confrontou-se os resultados da SW *in vitro* e SW *in natura* com o extrato de uma planta híbrida de SW com *Sinningia aggregata* (SAW), o qual foi produzido em condições *in vitro* semelhantes ao de SW, tendo sido utilizada, para isso, a mesma fase móvel.

Além disso, tanto os extratos em diclorometano quanto os em etanol também foram analisados por meio de técnicas de espectrometria acoplada à cromatografia.

4. Ensaios ORAC

Uma vez preparados os extratos, foi possível proceder com as análises relativas às suas atividades bioativas. Tendo em vista toda uma série de eventos que contribuiu para o agravamento da psoríase, a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no local das lesões é a mais expoente, portanto é desejável que o tratamento envolva uma ação antioxidante satisfatória. Buscou-se checar a existência dessa atividade por meio dos ensaios ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*).

Os experimentos para avaliação da atividade antioxidante foram realizados assim que se obteve quantidade suficiente de extratos brutos da planta *in vitro*. Foi feita uma análise para concentrações entre 2,5 e 250 µg/mL, sendo possível concluir que todas as amostras da planta *in vitro* apresentam atividade mais baixa que o padrão, que é 800 µmolTE/g. Tal resultado levanta suspeita acerca de uma pobreza em glicosídeos fenólicos na composição química de *S. warmingii*, a qual será verificada uma vez traçado o perfil químico dos extratos.

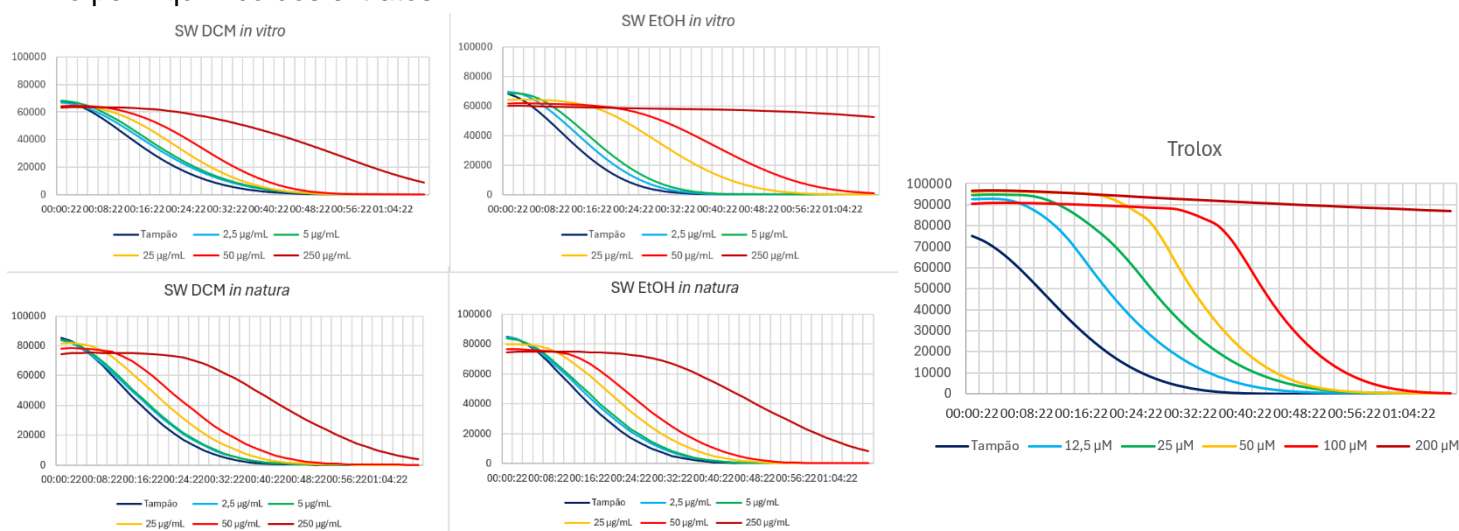


Figura 10 - Decaimento da fluorescência da fluoresceína ao ser exposta ao Trolox e aos extratos *in vitro* e *in natura*, em cada uma das concentrações estudadas.

Os gráficos acima apresentam a comparação da atividade antioxidante no ensaio ORAC com o decaimento da curva de fluorescência da fluoresceína para os extratos em DCM e EtOH das plantas *in vitro* e *in natura* em cada uma das diferentes concentrações estudadas, em comparação com a curva de decaimento do controle com comprovada ação antioxidante, o Trolox, também, em cada uma de suas concentrações. O gráfico abaixo destaca uma linha para cada extrato a uma concentração de 50 µg/mL, em comparação ao Trolox a 100 µM.

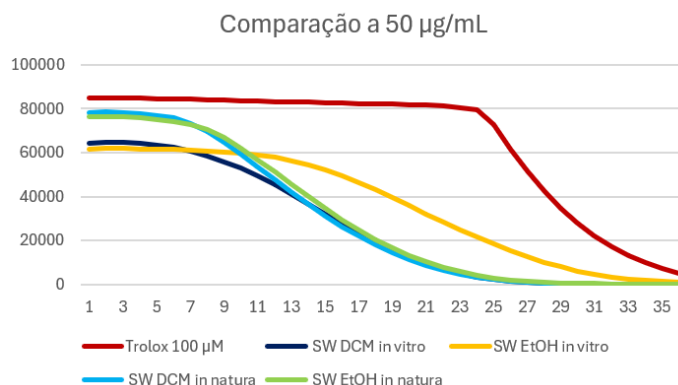


Figura 10 - Decaimento da fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo, destacando-se as a atividade a 50 µg/mL.

BIBLIOGRAFIA

- DAVIDSON, A; DIAMOND, B. **Autoimmune diseases**. N Engl J Med. n. 345, p. 340-350, 2001
- KUSHWAHA, A. **A review on alternative treatment of Psoriasis**. Journal of Pharmacy Research. v. 11, p. 846-877. 2017.
- MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. Physiologia plantarum, v. 15, n. 3, 1962.
- PERRET, M., et al. (2003). **Systematics and evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): Evidence from phylogenetic analyses of six plastid DNA regions and nuclear ncpGS**. American Journal of Botany, 90(3), 445–460
- SALVADOR, M. J.; FERREIRA, E. O.; MERTENS-TALCOTT, S. U.; DE CASTRO, W. V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D. A. (2006). **Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from Alternanthera tenella Colla**. Zeitschrift für Naturforschung C, v. 61, n. 1-2, p. 19-25, 2006.
- SMETANSKA, I. **Production of secondary metabolites using plant cell cultures**. Food biotechnology, p. 187-228, 2008.
- VERDAN, Maria Helena et al. **Chemical Constituents from Sinningia canescens and S. warmingii**. Natural Product Communications, v. 9, n. 10, p. 1934578X1400901033, 2014.
- WINIEWSKI, Vanessa et al. **Warmingiins A and B, two new dimeric naphthoquinone derivatives from Sinningia warmingii (Gesneriaceae)**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 28, p. 598-602, 2017.