

Estabelecimento de culturas in vitro de *Amaranthus tricolor* L. (Amaranthaceae) para a prospecção de bioativos com aplicação potencial contra danos celulares causados pelo etanol

Palavras-Chave: *AMARANTHUS*, CULTIVO *IN-VITRO*, BIOATIVOS

Autores/as:

DÉBORA VICTÓRIA ALVES SOARES, IB, UNICAMP

RAFAELA BOSCOLO DE ALMEIDA (BMM-IB-UNICAMP)

Prof.^(a) Dr.^(a) MARCOS JOSÉ SALVADOR (Professor Titular, MS-6-DBV-IB-UNICAMP)



Figura 1 - *Amaranthus tricolor* in vitro após ser removida do meio MS

Resumo:

Este estudo teve por objetivo geral realizar o estabelecimento de cultura de células *in vitro* de *Amaranthus tricolor* (Figura 1) e a prospecção de moléculas bioativas contra danos celulares causados pelo etanol, incluindo análise comparativa quanto ao perfil antioxidante e avaliação da citotoxicidade.

O gênero *Amaranthus* pertence à família *Amaranthaceae*, contendo cerca de 12 espécies no Brasil, incluindo plantas que são empregadas como pseudocereal sem glúten¹ e são conhecidas como plantas comestíveis não convencionais (PANC). Essas plantas são utilizadas como alimento fonte de proteína, possuindo um teor maior do que de alguns cereais verdadeiros provindos de monoculturas² e tem potencial de substituir a farinha com glúten. As folhas de algumas espécies de *Amaranthus*, são consumidas na forma de salada e refogados. Estudo com a espécie *Amaranthus hypochondriacus* demonstrou que a farinha integral de *Amaranthus hypochondriacus* incorporada à ração dos animais apresentou efeito protetor

sobre alguns danos hepáticos causados pelo consumo de etanol³. Assim acredita-se que *Amaranthus tricolor* L. pode apresentar esta mesma propriedade pois os constituintes majoritários incluem substâncias fenólicas e fitoesteróis, além de alto teor de proteínas assim como *Amaranthus hypochondriacus* que apresenta elevada capacidade antioxidante, efeitos sobre a inibição da glicação, ação hipocolesterolêmica e atividades relacionadas a saúde cardiovascular.

O primeiro passo para a realização da pesquisa foi uma busca bibliográfica para construir uma base sólida de conhecimento, visando aplicar a melhor metodologia de coleta de dados relativos a eficiência da *Amaranthus tricolor* L. e seu efeito antioxidante.

Sabe-se que o cultivo de plantas em ambientes não controlados está sujeito a diversas adversidades como mudanças climáticas, pragas agrícolas, estresse hídrico, dentre outros fatores durante o desenvolvimento. Segundo Laura Silva (2022)⁵ diferentes condições ambientais são capazes de impactar a fisiologia do *Amaranthus*, alterando trocas gasosas e seu metabolismo secundário. Desta forma, a cultura *in vitro* permite o cultivo em condições controladas, permitindo a realização de estudos que visem maximizar a produção de moléculas bioativas desta planta.

Os experimentos realizados neste estudo seguiram os protocolos já padronizados no Laboratório de Metabolismo Vegetal, Bioensaios e Tecnologia Fitofarmacêutica do Departamento de Biologia Vegetal/IB-UNICAMP coordenado Prof. Dr. Marcos José Salvador. O cultivo de *Amaranthus tricolor* L. foi realizado em meio de cultura em condição asséptica, partindo da germinação de suas sementes. Todos os procedimentos de manutenção das culturas foram realizados dentro de fluxo laminar para evitar possíveis contaminações. As plantas foram cultivadas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962)⁴, suplementado com 30 g/L de sacarose, 0,5 g/L de carvão ativado que atua como fator

estabilizante e antioxidante e pH em $6\pm 0,2$, os quais foram autoclavados antes da germinação e a micropropagação serem realizadas. Em ambas as etapas, as condições de luz, temperatura e umidade foram controladas em estufa para cultivo.

Para o estudo de germinação das sementes foram coletadas sementes *Amaranthus tricolor* (AT) planta *in natura* e armazenadas em tubos de eppendorfs. Realizou-se a assepsia das sementes com hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos e a lavagem em água deionizada autoclavada⁶. Após este processo as sementes foram semeadas *in vitro* em meio de cultura MS (Murashige & Scoog, 1962). Durante a germinação foi obtida uma taxa de germinação de 88% sobre 610 sementes germinadas (Tabela 1).

Taxa de germinação de <i>Amaranthus tricolor</i> <i>in vitro</i>		
Quantidade de sementes utilizadas	Sementes que germinaram	Taxa de germinação
610	534	88%

Tabela 1 - Taxa de germinação de *Amaranthus tricolor* *in vitro*

As plantas *in vitro* resultantes da germinação das sementes foram cultivadas no meio MS com adição de carvão ativo e mantidas em fotoperíodo 16/8 horas, luminosidade de 360 lux, com temperatura de 25 ± 2 °C (Figura 2).

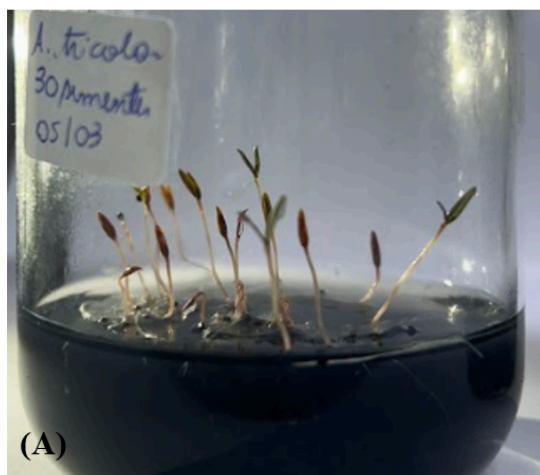


Figura 2 - Fotografia das plantas *in vitro* registrada após 37 dias da germinação das sementes de *Amaranthus tricolor*.

No preparo da biomassa vegetal para o preparo dos extratos a serem utilizados nos bioensaios, o material das plantas *in vitro*, foi seco em uma estufa aclimatada a 45°C. Já a planta *in natura* foi lavada em água corrente e seca sob o sol em local ventilado. O material vegetal seco foi pulverizado em moinho de faca, obtendo-se um pó com gramatura padronizada visando a próxima etapa de obtenção dos extratos.

Após acumular biomassa suficiente foi possível realizar a primeira extração de *Amaranthus tricolor*. Para tanto empregou-se o método de maceração, seguido de exposição a banho de ultrassom por 30 min, na proporção de 1:20 m/v pó do material vegetal:líquido extrator. Foram utilizados como líquidos extratores em ordem crescente de polaridade: hexano, álcool, álcool 70% e água respectivamente. Na figura 3 são apresentados os resultados do rendimento dos extratos obtidos para a planta *in natura* (N) e planta *in*

vitro

(V).

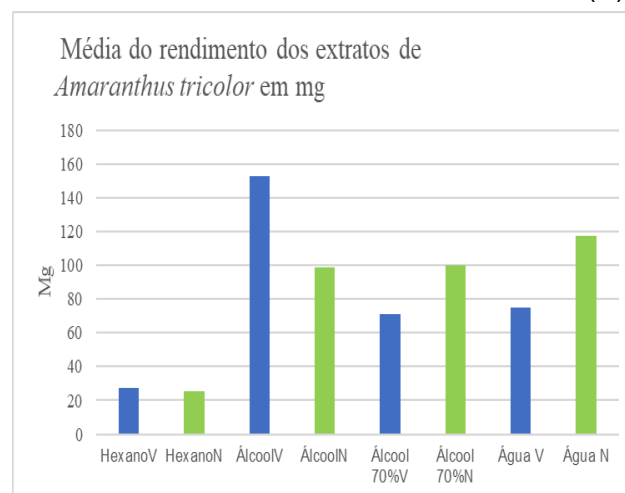


Figura 3 - Média do rendimento dos extratos de *Amaranthus tricolor* em mg. sendo "V" relativo a planta *in vitro* e "N" a planta *in natura*.

Os extratos da planta *in natura* demonstraram uma constância no seu rendimento de massa, exceto para o extrato hexânico. Já o extrato da planta *in vitro* possui uma variação maior, o de álcool rendeu muito mais que os outros e o hexânico que teve o menor rendimento. Nos testes seguintes optou-se por não prosseguir com a análise do extrato hexânico dado seu baixo rendimento.

Após a obtenção dos extratos sua atividade antioxidante foi avaliada empregando o ensaio *Oxygen Radical Absorbance Capacity Fluorescein* (ORAC), utilizando-se o AAPH (2,2'-Azobis (2-amidopropane) dihydrochloride) como fonte de radical livre e a fluoresceína como sonda. O trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), substância análoga à vitamina E, foi utilizado como substância padrão de referência. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados mostraram que o extrato aquoso da planta *in natura* mostrou promissora atividade antioxidante (Figura 4).

Atividade antioxidante dos extratos de *Amaranthus tricolor* in natura 125 ug/mL ao longo de 70 minutos Trolox 12,5 ug/ml

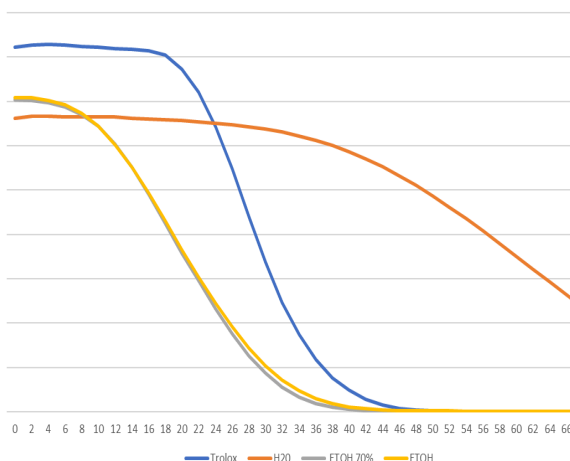


Figura 4 - Resultado da atividade antioxidante dos extratos de *Amaranthus tricolor* no ensaio ORAC-FL

Na avaliação da citotoxicidade foi utilizado o ensaio MTT (Methylthiazolyltetrazolium)⁷ e as linhagens celulares NIH 3T3 (fibroblastos) e AML-12 (hepatócitos). A citotoxicidade dos extratos de *Amaranthus tricolor* planta *in natura* e planta *in vitro* foi quantificada a partir dos valores da Concentração Inibitória Média (IC₅₀) de cada extrato, ou seja, a inibição de 50% da viabilidade celular.

A Tabela 2 resume os valores de IC₅₀ encontrados para cada tipo de extrato nas três diferentes linhagens celulares.

Valores de IC ₅₀ (µg/mL)		
Extratos	AML12	3T3
TNE	>1000	501.2 ± 0,03
TN7	572 ± 0,078	520.4 ± 0,03
TNA	>1000	>1000

Legenda: Os códigos referem-se aos extratos de *A. tricolor*: **TNE** (extrato etanólico), **TN7** (extrato etanólico 70%) e **TNA** (extrato aquoso). Os valores de IC₅₀ estão apresentados pela média das triplicatas ± desvio padrão.

Tabela 2: Resultados do efeito dos extratos de *Amaranthus tricolor* na viabilidade celular.

Os resultados da citotoxicidade apontam que a maioria dos extratos testados não

apresentou atividade citotóxica nas concentrações avaliadas, tendo os valores de IC₅₀ superiores a 500µg/mL.

Dados preliminares de análise por HPLC-UV/DAD-ESI/MS para caracterização química dos extratos bioativos mostram perfil cromatográfico com alguns picos similares presentes tanto no extrato da planta *in natura*, como no da planta *in vitro*. Como exemplo, apresenta-se na Figura 5 o perfil por HPLC-ESI-MS do extrato aquoso de *Amaranthus tricolor* planta *in natura* e *in vitro*.

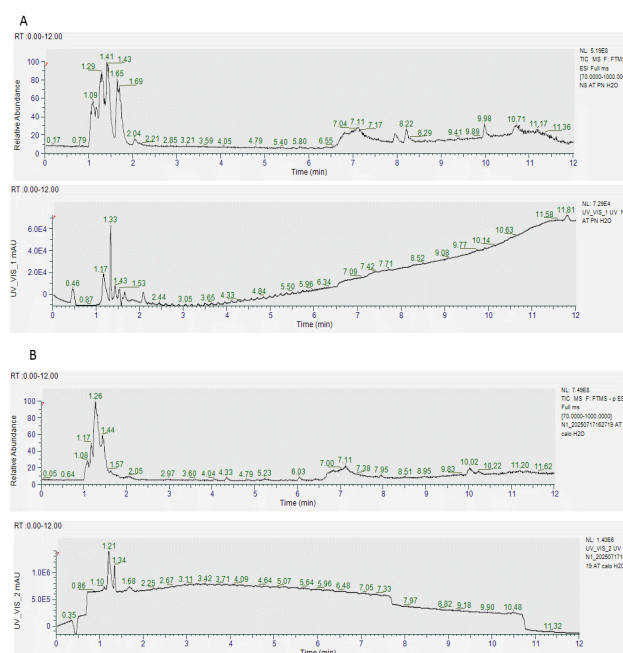


Figura 5 - Comparação dos perfis cromatográficos (UHPLC-UV/DAD-ESI/MS) dos extratos aquosos de *Amaranthus tricolor* plantas *in natura* (A) e *in vitro*, calo (B). No agrupamento A e B são apresentados os cromatogramas empregando detector de espectrometria de massas de alta resolução (MS) e os cromatogramas obtidos com de detecção UV (254 nm).

Os resultados obtidos até o momento mostram que foi possível estabelecer, a partir de sementes, o cultivo vegetal e a multiplicação *in vitro* de *Amaranthus tricolor*. Estudos comparativos dos extratos de *Amaranthus tricolor* demonstram forte capacidade antioxidante no ensaio ORAC-FL para o extrato aquoso da planta *in natura*. Já para o ensaio de citotoxicidade os extratos avaliados apresentaram baixa toxicidade em cultura de células para as linhagens não tumorais 3T3 (fibroblasto) e AML12 (hepatócitos). A análise química demonstrou alguns picos com tempo

de retenção similar no perfil químico tanto das plantas *in natura* quanto obtidas *in vitro*.

Os experimentos continuam sendo realizados no sentido de se melhor caracterizar a identidade dos constituintes químicos presentes nos extratos bioativos e também para a avaliação do seu efeito citoprotetor frente aos danos celulares causados pela exposição ao etanol.

Bibliografia consultada

1. **Amaranthaceae in Flora e Funga do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB42>>.

Acesso em: 27 fev. 2025

2. MAURYA, N. K.; ARYA, P. **Benefícios nutricionais do grão de amaranto: uma revisão.** Revista de Farmacognosia e Fitoquímica, v. 2, pág. 2258-2262, 2018. Acesso em: 28 fev. 2025

3. López, V.R.L.; Razzeto, G.S.; Escudero, N.L.; Gimenez, M.S. **Biochemical and Molecular Study of the Influence of Amaranthus hypochondriacus Flour on Serum and Liver Lipids in Rats Treated with Ethanol Plant Foods Hum Nutr** (2013) 68:396–402 DOI 10.1007/s11130-013-0388-3. Acesso em: 27 fev. 2025

4. Murashige, T. e Skoog, F. (1962) Um meio revisado para crescimento rápido e ensaios biológicos com culturas de tecido de tabaco. **Plant Physiology**, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>. Acesso em: 16 fev. 2025

5. SILVA, E. C. **Interação entre o déficit hídrico e a disponibilidade de nitrogênio nas trocas gasosas e no metabolismo secundário de Amaranthus cruentus L.** Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2022. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/41722b65-1f6a-40c5-8b7b-28d2910130f6/content>. Acesso em: 28 maio 2025.

6. PARRA DE ALMEIDA, Júlio César; VAZ DIAS, Fernanda; DOS SANTOS CAETANO, Plínio Alexandre. A técnica de micropropagação in vitro como estratégia de

inovação tecnológica na produção de mudas. **Revista Gestão & Sustentabilidade**, Brasil, v. 7, n. 1, p. e15043, 2025. DOI: 10.36661/2596-142X.2025v7n1.15043.

Disponível em: https://periodicos.uffs.edu.br/index.php/RGE_S/article/view/15043. Acesso em: 27 jul. 2025.

7. Mosmann T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID: 6606682.