



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CARLOS JOSE ALVAREZ CANTERO

**CONDIÇÕES DE CULTIVO, BIOATIVIDADE E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL METABÓLICO DE *Sinningia speciosa* (PLANTA
IN NATURA, PLÂNTULA *IN VITRO* E CALOS) E DO FUNGO
ENDOFÍTICO *Geosmithia* sp. ASSOCIADO À SUAS FOLHAS**

CAMPINAS
2020

CARLOS JOSE ALVAREZ CANTERO

CONDIÇÕES DE CULTIVO, BIOATIVIDADE E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL METABÓLICO DE *Sinningia speciosa* (PLANTA *IN*
NATURA, PLÂNTULA *IN VITRO* E CALOS) E DO FUNGO
ENDOFÍTICO *Geosmithia* sp. ASSOCIADO À SUAS FOLHAS

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestre
em Ciências na área de fármacos,
medicamentos e insumos para a saúde.*

Orientador: Prof. Dr. Marcos Jose Salvador

Este trabalho corresponde à versão final da
dissertação defendida pelo aluno Carlos Jose
Alvarez Cantero, e orientado pelo Prof. Dr.
Marcos Jose Salvador

CAMPINAS
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

AL86c Alvarez-Cantero, Carlos Jose, 1995-
Condições de cultivo, bioatividade e avaliação do potencial metabólico de *Sinningia speciosa* (planta *in natura*, plântula *in vitro* e calos) e do fungo endofítico *Geosmithia* sp. associado à suas folhas / Carlos Jose Alvarez Cantero. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Marcos José Salvador.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Sinningia speciosa*. 2. *Geosmithia*. 3. Plantas - Metabolismo. 4. Plantio (Cultivo de plantas). 5. Atividade antioxidante. I. Salvador, Marcos José, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Cultivation conditions, bioactivity and metabolic potential of *Sinningia speciosa* (*in natura* plant, *in vitro* seedling and callus culture) and of *Geosmithia* sp. endophyte from its leaves

Palavras-chave em inglês:

Sinningia speciosa

Geosmithia

Plants - Metabolism

Planting (Plant culture)

Antioxidant activity

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Marcos José Salvador [Orientador]

Maria Silvana Alves

Elaine Minatel

Data de defesa: 20-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2959-7501>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6683322565257736>

Campinas, 20 de fevereiro de 2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Jose Salvador

Prof.(a). Dra. Maria Silvana Alves

Prof. (a). Dra. Elaine Minatel

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais Roger Alvarez e Luz Neida; as minhas irmãs Tamisamy, Selena e Shirly, por todo amor, carinho e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Especialmente a meu pai que desde criança me transmitiu amor pela ciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus por Sua graça e pelo presente mais valioso – a vida e à minha família por ser meu pilar e acreditar em meus sonhos;

A meu orientador, Prof. Dr. Marcos José Salvador, pela oportunidade, confiança depositada, ensinamentos, e disponibilidade em qualquer situação. Muito grato pelo apoio na concretização deste trabalho;

Aos Professores Dra. Derlene Attili de Angelis, representando a Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (DRM-CPQBA), pela sua gentil disponibilidade e colaboração na identificação do fungo endofítico; e ao Dr. Danilo Ciccone Miguel, pelo acolhimento sem restrições no Laboratório de Estudos de Biologia da Infecção por *Leishmania* (LEBIL);

Aos meus colegas de laboratório, por todos os momentos de aprendizado que direta e indiretamente me ajudaram a concretizar este trabalho e, mais ainda, a materializar esta meta em minha vida;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sob números de processos 427859/2018-2 e 309411/2019-0, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo 15/03726-8 e ao Fundo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Estadual de Campinas (FAPEX-UNICAMP), pelo suporte financeiro;

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) e aos laboratórios do Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM) pelo apoio e por possibilitar a utilização de seus equipamentos;

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia (PPG-BTPB-IB) pela oportunidade oferecida;

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

RESUMO

As plantas e os micro-organismos estão entre os recursos naturais que apresentam considerável importância para a busca de novos metabólitos bioativos. Plantas da família Gesneriaceae são uma interessante fonte de metabólitos secundários com diversidade em termos químicos e relatos de moléculas com atividades antioxidante, anti-inflamatória, analgésica e anticâncer. No entanto, poucas espécies de *Sinningia* foram quimicamente estudadas, não sendo conhecida a diversidade de seus endófitos e o impacto desses micro-organismos na biossíntese de substâncias bioativas. Portanto, é um universo químico e biológico inexplorado que precisa ser estudado, dado o potencial dessas plantas e seus simbiontes como fonte de moléculas com aplicações terapêuticas e tecnológicas. Neste contexto, este estudo objetivou avaliar as condições de cultivo, a bioatividade e o potencial metabólico de *Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern (Gesneriaceae) “grupo Fyfiana” (planta *in natura*, plântula *in vitro* e calos) e de *Geosmithia* sp. SSP7, endófito de suas folhas. Para tanto, procedeu-se o estabelecimento das condições de cultivo do material vegetal; o cultivo, a identificação morfológica e molecular de *Geosmithia* sp. SSP7 e a obtenção de extratos metanólicos da biomassa da planta e das culturas desse fungo, os quais foram submetidos à análises por UHPLC/ESI-MS e à avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-*Leishmania* e do efeito citotóxico. Plântulas *in vitro* foram obtidas tanto de sementes, quanto por via organogênese indireta em MS com 1,0 mg/L BAP x 0,2 mg/L ANA, resultando em uma alta eficiência de regeneração após 4 semanas. Os calos foram obtidos a partir de um balanço de 0,05 mg/L BAP e 2,4-D. Os resultados sugerem que a cepa SSP7 pertence ao gênero *Geosmithia*. Em termos de produção de biomassa, o meio de cultura caldo MID foi o que melhor favoreceu o crescimento fúngico, enquanto a maior quantidade de extrato metanólico foi obtido a partir do meio CZP. Quando comparados os perfis cromatográficos dos extratos metanólicos da planta e *Geosmithia* sp. SSP7, verificou-se a ocorrência de regiões com similaridade de picos cromatográficos e outras em que os picos diferiram bastante entre a amostra da planta e do fungo. Por UHPLC/ESI-MS/MS foram identificados e quantificados um glicosídeo fenólico, Calceolariosídeo B, e uma antraquinona, Pustulina 7-hidroxi-6-metoxi-tectoquinona, ambas substâncias detectadas na maioria dos extratos provenientes da planta e em co-cultura *in vitro* da plântula ou cultura de calos com *Geosmithia* sp. SSP7. Os resultados mostraram que a associação endófito-

planta levou a aumento da concentração destas duas substâncias, sugerindo modulação positiva da associação simbiótica na biossíntese destas moléculas. Ainda, fatores como a luminosidade e balanço de fitorreguladores nas etapas de cultivo, bem como o estímulo biológico por parte de *Geosmithia* sp. SSP7, impactaram no desenvolvimento das culturas da planta *in vitro*, no teor de Calceolariosídeo B e de Pustulina e na capacidade antioxidante dos extratos estudados. Os extratos apresentaram $\geq 800 \mu\text{mol TE/g}$ tendo efeito antioxidante promissor. Por outro lado, não foi detectada atividade antimicrobiana e frente a promastigotas de *Leishmania amazonensis* para os extratos nas condições experimentais utilizadas e, também a maioria não apresentou efeito citotóxico na viabilidade celular 3T3 com $\text{IC}_{50} \geq 250,0 \mu\text{g/mL}$.

Palavras-chaves: *Sinningia speciosa*; *Geosmithia*; Calceolariosídeo B, Pustulina; Bioatividades.

ABSTRACT

Plants and microorganisms are among the natural resources presenting substantial importance in the search for new bioactive metabolites. Plants belonging to Gesneriaceae's family are an interesting source of secondary metabolites which possess a great chemical diversity and scientific reports of some bioactive molecules (antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and anticancer activity). However, few species of *Sinningia* Ness (Gesneriaceae) were chemically studied, and the diversity of endophytes associated with them as well as the impact of these microorganisms on the biosynthesis of bioactive substances are unknown. Therefore, it is an unexplored chemical and biological universe that needs to be studied, given the potential of these plants and their symbionts as a source of molecules with therapeutic and technological applications. In this sense, this study aimed to evaluate the cultivation conditions, bioactivity and metabolic potential of *Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern (Gesneriaceae) "Fyfiana group", (*in natura* plant, *in vitro* seedling and callus culture) and of *Geosmithia* sp. SSP7, endophyte from its leaves. For this, we established the conditions for the cultivation of the plant material mentioned above, and morphological and molecular identification of the endophytic strain SSP7. Methanolic extracts of the plant biomass and the fungal cultures were obtained, which were submitted to UHPLC/ESI-MS analysis and the evaluation of antioxidant, antimicrobial, anti-*Leishmania* and cytotoxic activities. *In vitro* seedlings were obtained from both seeds and indirect organogenesis in MS medium supplemented with 1.0 mg/L BAP x 0.2 mg/L NAA phyto-regulators, resulting in a high regeneration efficiency after 4 weeks. Callus was obtained from a relatively low concentration balance (0.05 mg/L) of BAP and 2,4-D. The results of fungal morphological and molecular characterization suggest that the SSP7 strain belongs to the genus *Geosmithia*. In terms of biomass production, the MID broth culture medium was the one that most favored fungal growth, while the largest amount of mass methanolic extract (mg) was obtained from cultivation in CZP medium. When comparing the chromatographic profiles of the methanolic extract from *in natura*, *in vitro* seedling and callus culture with *Geosmithia* sp. SPP7, regions with similar chromatographic peaks and others in which peaks significantly differed between plant and fungus samples were found. Through UHPLC/ESI-MS/MS, a phenolic glycoside-Calceolarioside B and an anthraquinone-Pustuline (7-hydroxi-6-methoxy-tectoquinone) were identified and quantified. Both substances were detected in most

extracts from plant and co-culture *in vitro* of seedling or callus culture with *Geosmithia* sp. SSP7. The results showed that the endophyte-plant association increased the concentration of these two substances, suggesting a positive modulation of the symbiotic association in the biosynthesis of these molecules. In addition, factors such as luminosity and phyto-regulator balance in the cultivation stages as well as biological stimulation by the *Geosmithia* sp. SSP7 had a positive impact on the development of the *in vitro* plant cultures, on Calceolarioside B and Pustuline contents, and in the antioxidant capacity of the extracts. The extracts showed a promising antioxidant capacity with values $\geq 800 \mu\text{mol TE/g}$. On the other hand, antimicrobial activity and effect against *Leishmania amazonensis* (PH8) promastigotes for the extracts analyzed under the experimental conditions used were not detected, and most of the extracts also did not show a cytotoxic effect on cell viability of the lineage from 3T3 mouse embryo fibroblast with $\text{IC}_{50} \geq 250.0 \mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Sinningia speciosa*; *Geosmithia*; Calceolarioside B; Pustuline; Bioactivities.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição mundial de *Sinningia* sp. A intensidade da cor verde é diretamente proporcional à presença deste gênero no local. Fonte: <https://www.tropicos.org/Name/40000575>.----- 22
- Figura 2.** Distribuição de *Sinningia* sp. no Brasil. Fonte: <http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Sinningia>. ----- 23
- Figura 3.** Fotografia de (A) exemplar de *Sinningia speciosa* “grupo Fyfiana”; (B) fruto maduro com as sementes expostas; e (C) tubérculo. Fonte: elaborado pelo autor (2018). ----- 24
- Figura 4.** Estruturas químicas de metabólitos secundários de plantas também biossintetizados por seus endófitos. Fonte: (Adaptado de Aly, Debbab & Proksch, 2013). ----- 29
- Figura 5.** Estrutura molecular do Calceolariosídeo B. Fonte: (Adaptada de Khong *et al.*, 2017).----- 30
- Figura 6.** Estruturas moleculares das quinonas (A) p-Benzoquinona (B) Naftoquinona (C) Antroquinona. Fonte: (Adaptada de El-Najjar *et al.*, 2011). ----- 31
- Figura 7.** Efeito das combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) x ácido α -naftaleno acético (ANA) sobre a eficiência e taxa de regeneração de explantes de *Sinningia speciosa*. C₀ (controle), C₁ a C₉: tratamentos em combinações de BAP e ANA após 30 dias, (n= 3). Valores que não compartilham as mesmas letras minúsculas e/ou maiúsculas são significativamente diferentes (p<0,001). Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 45
- Figura 8.** Fotografias do desenvolvimento de explantes de *Sinningia speciosa* para a regeneração *in vitro* via organogênese indireta: (A) explantes de *S. speciosa* em meio MS sem fitorreguladores (controle); (B) explantes no meio MS + tratamento C₂, com brotações, após 30 dias; (C) e (D) cultura primária de *S. speciosa* no meio MS + carvão. Tamanho da barra, 1 cm. Fonte: elaborado pelo autor (2019).----- 46
- Figura 9.** Efeito das combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) x ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre a eficiência e taxa de formação de calos a partir de explantes de *Sinningia speciosa*. D₁: controle, D₂ a D₈: tratamentos com diferentes combinações de BAP e 2,4-D após 30 dias (n=3). Valores que não compartilham as mesmas letras minúsculas e/ou maiúsculas são significativamente diferentes (p<0,001). Fonte: elaborado pelo autor (2019).----- 47
- Figura 10.** Fotografias do estado de desenvolvimento de explantes de *Sinningia speciosa* para a obtenção de calos friáveis: (A) explantes de *S. speciosa* em meio MS sem fitorreguladores (controle); (B) explantes no meio MS + tratamento D₄; (C) explantes no meio MS + tratamento D₅, após 30 dias; (D) culturas de calos com 20 dias de cultura. Tamanho da barra, 1 cm. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 47
- Figura 11.** Fotografias das colônias do fungo SSP7 crescidas à 25 °C por 7 dias nos seguintes meios (A) CYA – primeira coluna à esquerda; linhas: superior (verso) e inferior (reverso); CREA – coluna do meio; linhas: superior (verso) e inferior (reverso); e MEA – primeira coluna à direita; linhas: superior (verso) e inferior (reverso); (B) textura da colônia em MEA; (C), (D), (E) conidióforos; e (F) conídios. Barras: (C) a (E): 10 μ m; (F): 5 μ m. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 49
- Figura 12.** Árvore filogenética baseada nos dados da região do espaçador interno transcrito (ITS) para o fungo endofítico SSP7. A estabilidade dos ramos foi avaliada

por análise *bootstrap* com 1000 repetições. A sequência de *Acremonium alternatum* foi incluída como grupo externo. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 50

Figura 13. Árvore filogenética baseada em dados do *locus* β -tubulina para a cepa *Geosmithia* sp. SSP7. A estabilidade dos ramos foi avaliada por análise *bootstrap* com 1000 repetições. A sequência de *Acremonium alternatum* foi incluída como grupo externo. Fonte: elaborado pelo autor (2019).----- 51

Figura 14. Árvore filogenética baseada em dados do EF-1 α para a cepa *Geosmithia* sp. SSP7. A estabilidade dos ramos foi avaliada por análise *bootstrap* com 1000 repetições. A sequência de *Acremonium alternatum* foi incluída como grupo externo. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 51

Figura 15. Imagem gráfica da relação do tempo de cultivo em dias (observação por 15 dias) com a biomassa seca (mg) de *Geosmithia* sp. SSP7 no volume de 50 mL dos meios líquidos Czapek, MID e MS (n=3). No Gráfico, letras minúsculas iguais não apresentam diferenças estatísticas para (p<0,05). Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 52

Figura 16. Seguimento das plântulas *in vitro* obtidas por sementes (A) e calos (B) de *Sinningia speciosa* co-cultivados com *Geosmithia* sp. SSP7 crescido no meio MS após 15 dias de cultura. Fonte: elaborado pelo autor (2019).----- 53

Figura 17. Cromatogramas do extrato metanólico de *Sinningia speciosa* planta *in natura* para as substâncias Calceolariosídeo B (seta azul) e Pustulina (seta laranja) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 55

Figura 18. Cromatogramas do extrato metanólico de *Sinningia speciosa* plântula *in vitro* obtida por semente e da substância-padrão, Calceolariosídeo B (m/z = 478) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 55

Figura 19. Cromatogramas do extrato metanólico de *Sinningia speciosa* plântula *in vitro* obtida por semente e da substância-padrão, Pustulina (m/z = 268) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 56

Figura 20. Cromatogramas do extrato metanólico de *Sinningia speciosa* plântula *in vitro* obtida por organogênese e da substância-padrão, Calceolariosídeo B (m/z = 478) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 56

Figura 21. Cromatogramas do extrato metanólico dos calos de *Sinningia speciosa* e da substância-padrão, Calceolariosídeo B (m/z = 478) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 56

Figura 22. Cromatogramas do extrato metanólico de *Sinningia speciosa* planta *in vitro* obtida por semente em co-cultura com *Geosmithia* sp. SSP7 e da substância-padrão Calceolariosídeo B (m/z = 478) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 57

Figura 23. Cromatograma do extrato metanólico de *Sinningia speciosa* planta *in vitro* obtida por semente em co-cultura com *Geosmithia* sp. SSP7 e da substância-padrão Pustulina (m/z = 268) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019).----- 57

Figura 24. Cromatogramas e espectros (UHPLC/ESI-MS), modo íon positivo, do extrato metanólico planta *in natura*: (A) ampliação região m/z = 478 correspondente ao

Calceolariosídeo B e (B) Ampliação região $m/z= 268$ correspondente à Pustulina. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 59

Figura 25. Cromatogramas e espectros (UHPLC/ESI-MS), modo íon positivo, do extrato metanólico plântula *in vitro* obtida por semente: (A) ampliação região $m/z= 478$ correspondente ao Calceolariosídeo B; e (B) ampliação região $m/z= 268$ correspondente à Pustulina. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 60

Figura 26. Cromatogramas e espectros (UHPLC/ESI-MS), modo íon positivo, do extrato metanólico planta *in vitro* obtida por organogênese: (A) ampliação região $m/z= 478$ correspondente ao Calceolariosídeo B; e (B) ampliação região $m/z= 268$ correspondente à Pustulina. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 61

Figura 27. Cromatogramas e espectros (UHPLC/ESI-MS), modo íon positivo, do extrato metanólico de calos de *Sinningia speciosa*: (A) ampliação região $m/z= 478$ correspondente ao Calceolariosídeo B; e (B) ampliação região $m/z= 268$ correspondente à Pustulina. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 62

Figura 28. Cromatogramas e espectros (UHPLC/ESI-MS), modo íon positivo, do extrato metanólico da co-cultura plântula *in vitro* obtida por semente com *Geosmithia* sp. SSP7: (A) ampliação região $m/z= 478$ correspondente ao Calceolariosídeo B; e (B) ampliação região $m/z= 268$ correspondente à Pustulina. Fonte: elaborado pelo autor (2019). ----- 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados das substâncias isoladas e identificadas de <i>Sinningia speciosa</i> --	25
Tabela 2. Porcentagem de rendimento em massa dos extratos metanólicos obtidos de <i>Sinningia speciosa</i> (planta <i>in natura</i> , plântulas <i>in vitro</i> , calos), de <i>Geosmithia</i> sp. SPP7 (meios Czapek, MID e MS) e de sistemas de co-cultura. -----	54
Tabela 3. Quantificação do Calceolariosídeo B e Pustulina nos extratos metanólicos de <i>Sinningia speciosa</i> (planta <i>in natura</i> , plântula <i>in vitro</i> obtida por semente e por organogênese e cultura de calos) e da co-cultura <i>S. speciosa</i> - <i>Geosmithia</i> sp. SSP7 por UHPLC/ESI-MS/MS. -----	65
Tabela 4. Resultados da avaliação da atividade ORAC-FL dos extratos metanólicos de <i>Sinningia speciosa</i> e de <i>Geosmithia</i> sp. SSP7. -----	66
Tabela 5. Resultados da triagem de citotoxicidade sobre a viabilidade celular na linhagem celular proveniente de fibroblasto de embrião de camundongo 3T3 dos extratos metanólicos de <i>S. speciosa</i> e de <i>Geosmithia</i> sp. SSP7 -----	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AAPH	<i>2,2'-Azobis (2-amidiopropane) dihydrochloride</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA	Ácido indol acético
ANA	Ácido 1-naftalenacético
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVG	Aminoetoxivinilglicina
BAP	6-benzilaminopurina
B.O.D	Estufa incubadora - <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
β -tubulina	Subunidade beta da proteína tubulina eucariota
C-18	Fase estacionária de sílica tipo octadesil silano para cromatografia
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CREA	Ágar creatina sacarose
CTT	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
CYA	Ágar de extrato de levedura Czapek
CV	Coeficiente de variação
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium – <i>Meio de cultura celular mínimo sintético</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DP	Desvio padrão
EAU	Extração assistida por ultrassom

EC ₅₀	Metade da concentração efetiva máxima
EF-1 α	Elongation factor 1-alpha – <i>Fator de alongamento 1 alfa</i>
ESI-MS	Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry - <i>Espectometria de massas com ionização por electrospray</i>
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
ITS	Internal transcribed spacer – <i>Espaçador transcrito interno</i>
MEA	Ágar de Extrato de Malte
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHB	Müller Hinton Broth - <i>Caldo Müller Hinton</i>
MID	Meio líquido suplementado com soytone
MS	Meio Murashige e Skoog
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide - <i>Brometo de tetrazólio</i>
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
ORAC-FL	Oxygen radical absorbance capacity - <i>Capacidade de Absorção Radical de Oxigênio</i>
OTU's	Operational Taxonomic Units - <i>Unidades taxonômicas operacionais</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction - <i>Reação em cadeia da polimerase</i>
PDA	Potato Dextrose Agar- ágar Batata Dextrose
PE	Peso extrato seco
PI	Peso inicial de biomassa
PNs	Produtos Naturais
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA - <i>ADN polimórfico aleatoriamente amplificado</i>
rpm	Revoluções por minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SFB	Soro fetal bovino
SPE	Solid-phase extraction – <i>Extração em fase sólida</i>
SSP7	Cepa endofítica isolada de <i>Sinningia speciosa</i>
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography (<i>Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência</i>)
TE/g	Trolox equivalentes por grama de extrato
Trolox	<i>Ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico</i>
tR	Tempo de Retenção
TR	Trolox Relativo
VI	Volume inicial de líquido
v/v	Percentual volume/volume
[M +Na ⁺] ⁺	Aduto de sódio
[M +Li ⁺] ⁺	Aduto de lítio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Família Gesneriaceae	21
1.2. Gênero <i>Sinningia</i> e a espécie em estudo	22
1.3. Biotecnologia Vegetal (Cultura de células e tecidos)	25
1.4. Micro-organismos endofíticos e co-culturas	26
1.4.1. Fungos endofíticos	27
1.5. Glicosídeos Fenólicos e Quinonas: Constituintes Químicos Detectados em <i>Sinningia speciosa</i>	30
1.5.1. Glicosídeos Fenólicos e Calceolariosídeo B.....	30
1.5.2. Quinonas	31
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1. Seleção da espécie vegetal	34
3.2. Coleta e classificação do material vegetal	34
3.3. Obtenção de plântulas <i>in vitro</i>	34
3.3.1. Propagação por sementes.....	34
3.3.2. Propagação por organogênese indireta.....	35
3.4. Cultura de calos assépticos	35
3.5. Obtenção da cepa fúngica endofítica	36
3.5.1. Preservação.....	36
3.5.2. Caracterização microbiológica.....	37
3.5.3. Caracterização molecular	37
3.5.4. Análise da biomassa fúngica	38
3.6. Sistema de co-culturas sintéticas entre <i>S. speciosa</i> (plântulas <i>in vitro</i> propagadas por sementes e calos) e o fungo endofítico SSP7	39
3.7. Obtenção dos extratos e perfil cromatográfico por UHPLC/ESI-MS.....	39
3.7.1. Obtenção dos extratos planta <i>in natura</i> , plântulas <i>in vitro</i> , calos e co-culturas.....	39
3.7.2. Obtenção dos extratos do fungo SSP7.....	40
3.7.3. Perfil cromatográfico por UHPLC/ESI-MS de baixa resolução e alta resolução	40
3.7.4. Análise quantitativa de substâncias por UHPLC/ESI-MS/MS.....	41

3.8. Ensaio para avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-<i>Leishmania</i> e de citotoxicidade	41
3.8.1. Atividade antioxidante - Ensaio Oxygen Radical Absorbance Capacity Fluorescein (ORAC-FL)	41
3.8.2. Atividade antimicrobiana – Método de Microdiluição	42
3.8.3. Avaliação do efeito sobre a viabilidade de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	43
3.8.4. Triagem de citotoxicidade através do ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT	44
3.9. Análise estatística	44
4. RESULTADOS	45
4.1. Obtenção de plântulas <i>in vitro</i>	45
4.2. Obtenção de cultura de calos	46
4.3. Obtenção do fungo endofítico SSP7, caracterização fenotípica e molecular e análise da biomassa	48
4.4. Sistema de co-culturas sintéticas	52
4.5. Rendimento dos extratos metanólicos	53
4.6. Análises cromatográficas por UHPLC/ESI-MS	55
4.6.1. Análise qualitativa por UHPLC/ESI-MS/MS	55
4.6.2. Análise quantitativa por UHPLC/ESI-MS/MS	64
4.7. Atividades antioxidante, antimicrobiana e leishmanicida e triagem de citotoxicidade	65
4.7.1. Avaliação da capacidade antioxidante	65
4.7.2. Atividade antimicrobiana e ensaio frente promastigotas de <i>(L.) L. amazonensis</i>	66
4.7.3. Triagem de citotoxicidade	67
5. DISCUSSÃO	68
5.1. Culturas <i>in vitro</i> de <i>S. speciosa</i> (plântulas <i>in vitro</i> propagadas por sementes e por organogênese indireta e calos assépticos)	68
5.2. Caracterização morfológica, molecular e condições de crescimento de <i>Geosmithia</i> sp. SSP7	69
5.3. Perfil cromatográfico e análise qualitativa por UHPLC-ESI-MS	71
5.4. Análise quantitativa por UHPLC/ESI-MS/MS de Calceolariosídeo B e Pustulina	72
5.5. Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana, leishmanicida e da citotoxicidade	73
6. CONCLUSÕES	76
7. PERSPECTIVAS	78

REFERÊNCIAS..... 79

APÊNDICES 88

ANEXOS 98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Gesneriaceae

Plantas da família Gesneriaceae Rich. & Juss. ex DC. apresentam diversidade em termos de constituintes químicos, com potencial para a obtenção de substâncias bioativas (Verdan & Stefanello, 2012). Esta família engloba cerca de 3.525 espécies distribuídas em aproximadamente 151 gêneros com relatos de ocorrências em áreas tropicais e subtropicais (Weber, Clark & Möller, 2013; Mabberley, 2017). Estudos de sistemática filogenética (Weber, Clark & Möller, 2013; Mabberley, 2017), suportados por aspectos morfológicos/estruturais e moleculares, reconhecem três subfamílias: Sanangoideae, com *Sanango racemosum* como único gênero (Weber, Clark & Möller, 2013; Mora & Clark, 2016), Gesnerioideae e Didymocarpoideae (Weber, Clark & Möller, 2013; Mabberley, 2017).

A descrição de novas espécies e gêneros para Gesneriaceae utiliza critérios de sistemática molecular, sendo que no período de 2010 à 2018 foram reportados *Achimenes* (Ramírez-Roa & Cerros-Tlatilpa, 2018), *Anethantus* (Skog & Clark, 2015), *Billolivia* (Middleton *et al.*, 2014), *Conodoboea* (Lim, Kiew & Haron, 2013), *Cyrtandra* (Bone & Atkins, 2013; Wagner, Wagner & Lorence, 2013), *Drymonia* (Clark and Clavijo, 2017), *Hemiboea* (Li *et al.*, 2018), *Paradrymonia* (Mora & Clark, 2016), *Primulina* (Hong *et al.*, 2018), *Raphiocarpus* (Phuong *et al.*, 2012) e *Sinningia* (Chautems *et al.*, 2010; Buzatto & Singer, 2012; Ferreira, Waechter & Chautems, 2013, 2014; Araujo & Chautems, 2015; Chautems, Peixoto & Rossini, 2015; Ferreira, Chautems & Waechter, 2015).

Algumas espécies da família Gesneriaceae têm sido utilizadas na medicina popular como recurso terapêutico para o tratamento de feridas, dor, doenças infecciosas e inflamatórias (Verdan & Stefanello, 2012). Todavia, há poucos estudos em termos metabólicos das espécies desta família de plantas, sendo já reportados cerca de 316 compostos de diferentes classes químicas, incluindo flavonoides, terpenos, esteroides, glicosídeos fenólicos, quinonas, lignanas e xantonas, dentre outras (Verdan & Stefanello, 2012). Substâncias fenólicas e derivados de benzeno, além de uma ampla variedade de terpenos, têm sido considerados como potenciais marcadores químicos da família (Jensen, 1996; Verdan & Stefanello, 2012; Wang *et al.*, 2014; Winiewski *et al.*, 2017). Aliás, estudos reportaram diversos tipos de

bioatividade para extratos e substâncias isoladas de Gesneriaceae como antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (Verdan & Stefanello, 2012; Verdan *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2017; Lomba *et al.*, 2017). Estas últimas pesquisas, além de descrever os metabólitos secundários bioativos, buscam correlacionar os constituintes químicos e suas possíveis bioatividades.

1.2. Gênero *Sinningia* e a espécie em estudo

Conforme mostra a Figura 1, *Sinningia* Nees. é um gênero neotropical representado por espécies reportadas desde o México até Argentina (Tropicos®, 2019).



Figura 1. Distribuição mundial de *Sinningia* sp. A intensidade da cor verde é diretamente proporcional à presença deste gênero no local. Fonte: <https://www.tropicos.org/Name/40000575>.

Segundo Mabberley (2017), são reconhecidas 60 espécies no gênero, mas investigações recentes aportam um número crescente de 72 aproximadamente, com amplo domínio fitogeográfico. No Brasil, observa-se o maior número de registros taxonômicos dentro da família Gesneriaceae (Zaitlin & Pierce, 2010; Araujo & Chautems, 2015; Ferreira, Chautems & Waechter, 2015; Lomba *et al.*, 2017; Verdan *et al.*, 2017), sendo encontrada em todos os estados do país e com domínios fitogeográficos em cinco biomas nacionais (Flora do Brasil 2020 em construção, 2019) (Figura 2).



Figura 2. Distribuição de *Sinningia* sp. no Brasil. Fonte: <http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Sinningia>.

Espécies de *Sinningia* são ervas tuberosas, encontradas em associação com musgos e líquenes sobre rochas (saxicófilas), árvores (epifíticas), como também em dunas costeiras e pântanos (Chautems *et al.*, 2010; Ferreira, Chautems & Waechter, 2015).

Estudos químicos e biológicos com plantas deste gênero têm sido reportados nos últimos anos, onde são destacadas dez (10) espécies estudadas: *Sinningia aggregata* (Ker-Gawl.) Wiehler (Stefanello, Cervi & Wisniewski, 2005; Verdan *et al.*, 2010, 2015; Riva *et al.*, 2012; Verdan & Stefanello, 2012; Souza *et al.*, 2015), *Sinningia allagophylla* (Mart.) Wiehler (Riva *et al.*, 2012; Verdan & Stefanello, 2012; Barbosa *et al.*, 2013; Scharf *et al.*, 2016), *Sinningia canescens* (Mart.) Wiehler (Verdan *et al.*, 2014, 2017a; Lomba *et al.*, 2017), *Sinningia cardinalis* (Lehm.) H. E. Moore, (Winefield *et al.*, 2005; Verdan & Stefanello, 2012), *Sinningia hatschbachii* Chautems (Amorim *et al.*, 2017), *Sinningia leucotricha* (Hoehne) H. E. Moore (Verdan *et al.*, 2013, 2017; Verdan, Koolen, *et al.*, 2015), *Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern (Verdan *et al.*, 2009; Verdan & Stefanello, 2012), *Sinningia reitzii* (Hoehne) L. E. Skog (Soares *et al.*, 2017), *Sinningia tubiflora* (Hook.) Fritsch. (Perret *et al.*, 2003) e *Sinningia warmingii* (Hiern.) Chautems (Verdan *et al.*, 2014; Winiewski *et al.*, 2017). Estes estudos mostram grande diversidade em termos de estruturas químicas, justificada pela ocorrência e

isolamento de compostos, tais como flavonoides, esteroides, fenilpropanoides, glicosídeos fenólicos, quinonas, cromenos, etilciclohexanos e compostos alifáticos de cadeia longa e sesquiterpenos oxigenados (Verdan & Stefanello, 2012).

S. speciosa (Lodd.) Hiern é uma planta herbácea, perene, com tubérculo, nativa do sudeste do Brasil, sendo observada nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo e com domínio fitogeográfico na mata atlântica (Flora do Brasil 2020 em construção, 2019). O “grupo Fyfiana” ou “gloxínia” é a variedade ornamental desta espécie vegetal (Figura 3) com grande importância econômica e comercial por seu padrão floral, sendo considerada um modelo de domesticação vegetal (Verdan *et al.*, 2009; Zaitlin, 2012; Hasing *et al.*, 2019). Alguns estudos quanto a sua composição química estão descritos na literatura (Verdan *et al.*, 2009; Verdan & Stefanello, 2012), com relatos da ocorrência de quinonas, etilciclohexanos e esteroides (Tabela 1).

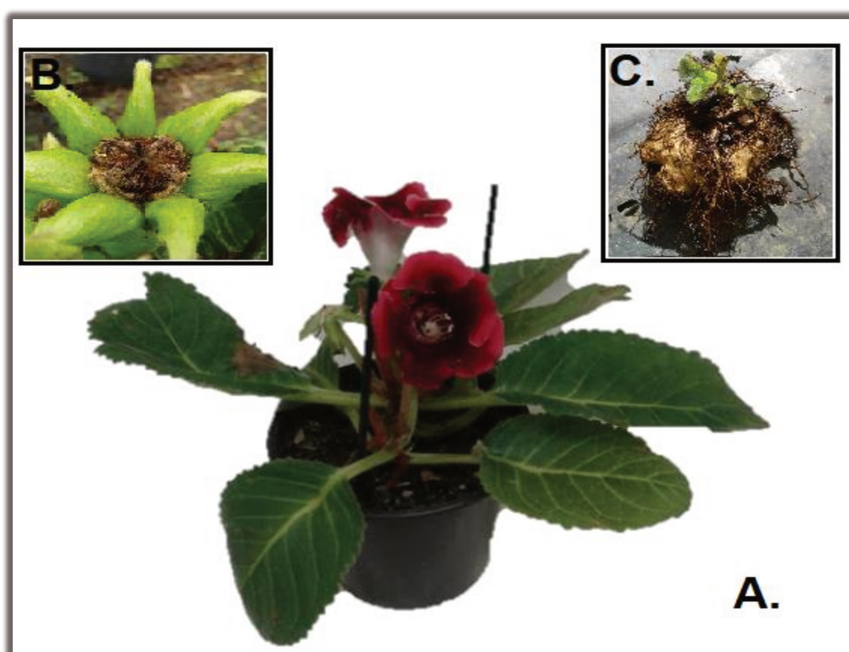


Figura 3. Fotografia de (A) exemplar de *Sinningia speciosa* “grupo Fyfiana”; (B) fruto maduro com as sementes expostas; e (C) tubérculo. Fonte: elaborado pelo autor (2018).

Tabela 1. Dados das substâncias isoladas e identificadas de *Sinningia speciosa*

Composto	Massa Molar	Origem	Referência
1-hidroxi-7-metoxi-2-metil antraquinona (Rubiawallin-B)	268,27	Tubérculo	Verdan <i>et al.</i> , 2009; Verdan & Stefanello, 2012
2-metil-7-metoxi antraquinona	252,27		
Cleroindicina B	158,19	Partes aéreas	
Isorengiol	160,21		
Sitosterol	414,71		
Estigmasterol	412,69		

Fonte: elaborado pelo autor (2019)

1.3. Biotecnologia Vegetal (Cultura de células e tecidos)

O número de pesquisas envolvendo produtos naturais (PNs) de plantas vêm aumentando no mundo todo com o intuito de descobrir novas substâncias com potencial terapêutico (Yi *et al.*, 2017). Dessa forma, PNs têm sido usados em ensaios clínicos com a expectativa de se transformarem, por exemplo, em possíveis novos agentes antimicrobianos e antineoplásicos (Harvey, Edrada-Ebel & Quinn, 2015). Porém, muitos PNs de plantas apresentam limitações nos mecanismos de síntese e semissíntese em escala industrial em virtude da produção em pequenas quantidades (baixo rendimento), não sendo, portanto, rentáveis e sustentáveis (Efferth, 2019). Além disso, para favorecer a crescente demanda por PNs, ecossistemas são destruídos, levando à extinção de espécies vegetais importantes, fazendo com que a produção em massa seja uma estratégia biotecnologicamente oportuna por permitir a superação dessas limitações (Nielsen, Temporiti & Cella, 2019). Assim sendo, uma opção sustentável e economicamente viável ao extrativismo seria a produção dos metabólitos secundários mediante sistemas biotecnológicos *in vitro*, como por exemplo, cultura de células e/ou propagação vegetativa, suspensões celulares e órgão (Niazian, 2019). Por meio destas técnicas, parâmetros físico-químicos e moleculares podem ser modulados para promover o crescimento vegetal, obtendo-se reprodutibilidade e aumento no rendimento dos metabólitos de interesse, muito superior à planta *in natura* (Efferth, 2019).

As culturas *in vitro* admitem o uso de precursores exógenos e estimuladores biológicos e não biológicos para a biossíntese de metabólitos secundários, tanto na cultura de células quanto na propagação vegetativa *in vitro*. A cultura de tecidos vegetais consiste em manter, sob condições apropriadas de laboratório, partes do material vegetal de um organismo de interesse visando à obtenção de um genótipo

idêntico à planta original pela propagação assexuada de células totipotentes (Torres *et al.*, 2000). Este recurso tecnológico possibilita, por exemplo, a realização de estudos fisiológicos e metabolômicos em plantas suscetíveis a estresse abiótico, com baixo rendimento ou de difícil acesso na natureza (Niazian, 2019). Assim, obtém-se um fragmento do vegetal (explante) que responda às condições de indução/regeneração e, conseqüentemente, à obtenção de plantas completas por várias vias de resposta vegetativa (Mantell, Matthews & McKee, 1994). Vale ressaltar que a propagação vegetativa *in vitro* é variável de acordo com as partes do organismo a serem utilizadas (folhas, raiz, caule, meristema, etc.), o genótipo do ancestral e as condições de cultura (Caldas *et al.*, 1998). A cultura de células tem se mostrado uma técnica economicamente viável para a obtenção de uma grande variedade de metabólitos secundários. Sabe-se que substâncias como glicosídeos, alcaloides, antraquinonas e terpenos têm sido obtidos a partir da cultura de células vegetais, e em alguns casos, em quantidade superior à observada na planta *in natura*, com bons resultados em termos biotecnológicos (Reyes-Martínez *et al.*, 2019).

São encontrados na literatura alguns trabalhos que apresentam o desenvolvimento de plantas voltadas para a propagação vegetativa *in vitro* como ferramenta para o melhoramento genético de mudas (Chae, Kim & Park, 2012; Park, *et al.* 2012). No entanto, até o momento, não foram encontrados estudos documentando a identificação e caracterização de metabólitos a partir de cultura *in vitro* de células e tecidos ou que tenham avaliado as atividades biológicas de *S. speciosa*.

1.4. Micro-organismos endofíticos e co-culturas

A busca por micro-organismos para a produção de moléculas bioativas se intensificou nas últimas décadas (Gunatilaka, 2006; Pham *et al.*, 2019). A maioria dos estudos tem sido focada na exploração de metabólitos secundários com estruturas químicas altamente diversas e com múltiplas aplicações biológicas. Metabólitos de origem microbiana são reconhecidos como substâncias de enorme potencial na utilização farmacológica e biotecnológica (Gonçalves, Bastos & Hanna, 2017; Yan *et al.*, 2018). Entre os organismos menos explorados estão os micro-organismos endofíticos, encontrados no interior dos tecidos de vegetais como simbiotes, e

considerados uma nova e promissora fonte de substâncias bioativas (Freire, Vasconcelos & Coutinho, 2014).

O termo “endófito” originalmente descrito por De Bary em 1866, refere-se a qualquer micro-organismo, tais como bactérias, fungos ou actinomicetos, que vivem nos tecidos de plantas, distinguindo-se dos epifíticos observados na área externa (Yan *et al.*, 2018). São encontradas diferentes definições de endófito na literatura, mas segundo Bacon e Write, os endófitos são micro-organismos que colonizam os tecidos internos das plantas (hospedeiras) sem causar-lhes prejuízos imediatos, definição que é amplamente aceita e utilizada (Chapla, Biasetto & Araujo, 2013). Assim, endófitos vegetais são estudados desde meados do século XX e sabe-se que realizam diferentes interações na natureza, mostrando associação com quase 300.000 espécies vegetais existentes na terra (Sharma, Kansal & Dinesh, 2018). Aliás, como resultado destas interações entre plantas e endófitos são produzidos compostos de grande valor para o crescimento das plantas, proteção frente a fatores ambientais e a sustentabilidade do anfitrião-micro-organismo (Sharma, Kansal & Dinesh, 2018). Embora os micro-organismos endofíticos sejam fontes de compostos naturais com aplicação potencial na agricultura, medicina e indústria, esse tema é relativamente pouco estudado (Chapla, Biasetto & Araujo, 2013).

Acredita-se que, após a descoberta da penicilina e do taxol, considerados compostos com grande poder terapêutico na história da humanidade (Ferrara, 2006; Yan *et al.*, 2018), novas pesquisas biotecnológicas baseadas em fungos endofíticos são uma interessante escolha para a obtenção de substâncias bioativas.

1.4.1. Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos caracterizam-se por sua presença assintomática nos tecidos das plantas e correspondem a um grupo diversificado de ascomicetos ubíquos que colonizam plantas vasculares, algas marinhas, musgos, entre outros organismos vegetais dos biomas terrestres (Kusari, Singh & Jayabaskaran, 2014). Em geral, reconhecem-se dois grandes grupos de fungos endofíticos, divididos com base na relação evolutiva, taxonômica e funções ecológicas da planta hospedeira (Sharma, Kansal & Dinesh, 2018).

Classe 1. Endófitos clavicipitáceos (Endófitos-C)

Os endófitos-C são mutualistas com alto potencial na resposta defensiva das gramíneas, tendo sido observados pela primeira vez no final do século XIX por pesquisadores europeus em sementes de *Lolium temulentum*, *Lolium arvense*, *Lolium linicolum* e *Lolium remotum* (Sharma, Kansal & Dinesh, 2018). Alguns exemplos dos gêneros mais estudados são *Balansia*, *Epichloë* e *Neotyphodium*, considerados obrigatórios (incapazes de proliferar fora da planta e geralmente transmitidos verticalmente via semente) e cuja transmissão acontece via assexual ou através de esporos sexuais (Chagas *et al.*, 2018).

Classe 2. Endófitos não clavicipitáceos (Endófitos-NC)

Sabe-se que os endófitos-NC foram isolados primeiramente de tecidos assintomáticos de várias plantas com amplo domínio fitogeográfico (Sharma, Kansal & Dinesh, 2018). Embora os endófitos-C tenham recebido maior atenção por serem importantes na agricultura, nos últimos anos o interesse pelos endófitos-NC tem aumentado, devido a sua diversidade e potencial para várias aplicações biotecnológicas (Yan *et al.*, 2018).

Com base no exposto, compostos bioativos produzidos por fungos endófitos têm uma importância econômica para os seres humanos, podendo ser utilizados na indústria, agricultura e medicina (Sharma, Kansal & Dinesh, 2018). Alguns destes compostos, por se tratarem de metabólitos secundários, são também produzidos pela planta hospedeira (Figura 4). Portanto, acredita-se que os fungos endofíticos poderiam se tornar a fonte principal para esses compostos (Freire, Vasconcelos & Coutinho, 2014). Apesar disso, essa expectativa tem, em parte, esmorecido. Um dos motivos é que, após alguns repiques, os fungos endofíticos diminuem ou perdem a capacidade de produzir os metabólitos secundários desejáveis (Freire, Vasconcelos & Coutinho, 2014). Uma ferramenta que pode ser útil para minimizar este fato são os sistemas de culturas em conjunto, co-culturas *in vitro* (quando o meio for sólido) ou fermentação mista (quando desenvolve-se no meio líquido), já que representa um enfoque importante para a indução do metabolismo secundário tanto do endófito quanto do organismo hospedeiro através da regulação gênica, resultando na produção de novos compostos ou remediando a perda da biossíntese de metabólitos

secundários conhecidos a partir de isolados endofíticos com potencial biotecnológico (Vinale *et al.*, 2017; Chagas *et al.*, 2018).

Alguns estudos são encontrados na literatura fazendo uso de co-culturas entre endófito-endófito (Abdalla, Sulieman & McGaw, 2017; Vinale *et al.*, 2017; Jiao *et al.*, 2018), mas investigações abordando co-culturas entre planta-endófito são relativamente escassas, podendo ser uma abordagem para a produção e acúmulo de substâncias bioativas de espécies vegetais, especialmente plantas medicinais e as de interesse comercial/econômico (Salehi, Naghavi & Bahmankar, 2019).

Até o momento, não foram encontrados estudos com foco na biodiversidade de micro-organismos endofíticos associados a *S. speciosa*, sendo esse um universo químico e biológico promissor a ser explorado. Estudos preliminares de nosso grupo de pesquisa mostraram a ocorrência de micro-organismos endofíticos simbiotes com potencial para a busca de moléculas bioativas associados às espécies de Gesneriaceae.

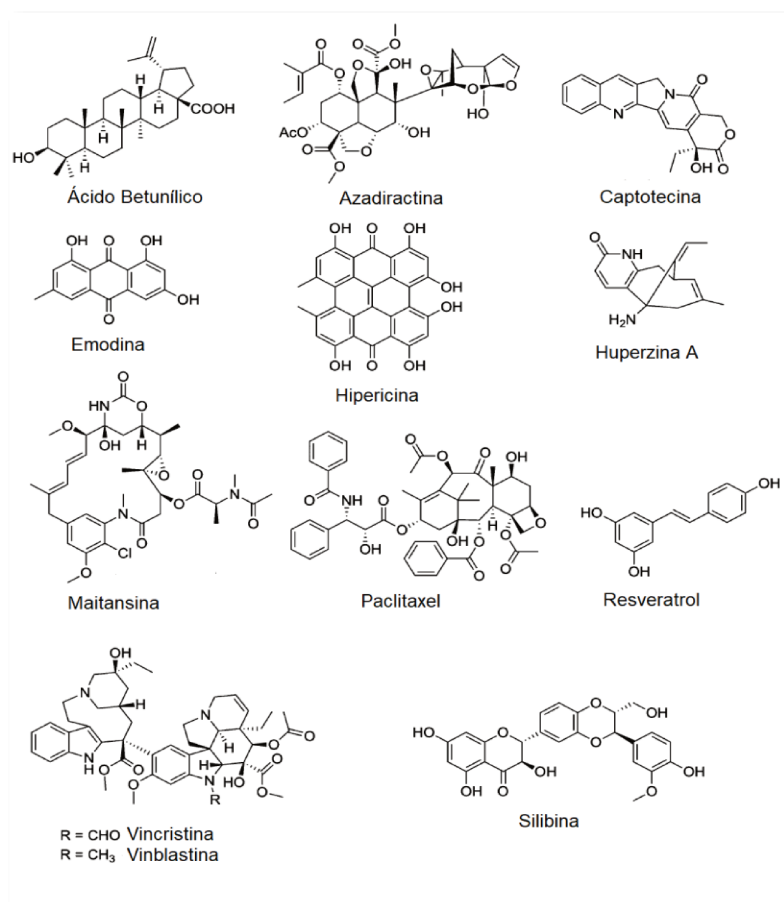


Figura 4. Estruturas químicas de metabólitos secundários de plantas também biossintetizados por seus endófitos. Fonte: (Adaptado de Aly, Debbab & Proksch, 2013).

1.5. Glicosídeos Fenólicos e Quinonas: Constituintes Químicos Detectados em *Sinningia speciosa*

1.5.1. Glicosídeos Fenólicos e Calceolariosídeo B

Os glicosídeos fenólicos constituem um grupo de substâncias muito comuns no reino vegetal (Lindroth & Pajutee, 1987). Nos campos farmacêutico e nutracêutico apresentam atividades biológicas, tais como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiproliferativa, entre outras (Fu, Pang & Wong, 2008). Caracterizam-se por serem altamente solúveis em água e constituem-se por um resíduo de ácido hidroxicinâmico e uma parte remanescente de hidroxifeniletíl ligados por uma β -glucopirranose (Dembitsky, 2005).

Os glicosídeos fenólicos estão entre o grupos de substâncias isoladas de 24 gêneros da família Gesneriaceae (Verdan & Stefanello, 2012), sendo Verbascosídeo a mais encontrada e considerada seu marcador quimiotaxonômico, seguida de outros como Calceolariosídeo, Conandrosídeo e Isoverbascosídeo. Entre estas substâncias, o Calceolariosídeo B (Figura 5), ainda que tratando-se de uma molécula estruturalmente simples, apresenta atividades biológicas potenciais, como antiproliferativa frente à linhagens celulares de câncer de próstata, adenocarcinoma gástrico, carcinoma de útero e bexiga (Khong & Judeh, 2017), e como inibidor de proteína quinase C (Zhou *et al.*, 1998).

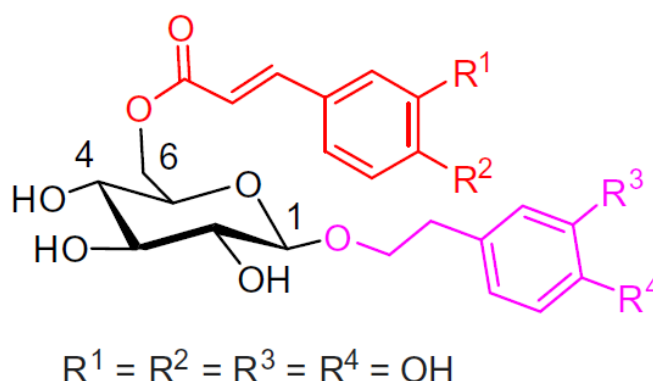


Figura 5. Estrutura molecular do Calceolariosídeo B. Fonte: (Adaptada de Khong *et al.*, 2017).

1.5.2. Quinonas

Quinonas são substâncias que ocorrem em espécies de *Sinningia*, e que incluem moléculas amplamente distribuídas na natureza (El-Najjar *et al.*, 2011). Sua classificação química atende ao núcleo aromático presente na estrutura (Figura 6): benzoquinonas – constituídas por um único anel, naftoquinonas – dois anéis, e antraquinonas – três anéis ou antraceno (El-Najjar *et al.*, 2011). As quinonas ocorrem em uma grande variedade de plantas, micro-organismos e algas como produto do metabolismo secundário, sendo que as vias de biossíntese são diferentes quando se compara o metabolismo de plantas e fungos. Por exemplo, enquanto em plantas estas moléculas provém das vias de chiquimato e acetato-malonato, em fungos estes policetídeos aromáticos são sintetizados predominantemente pela rota acetato-malonato (Gessler, Egorova & Belozerskaya, 2013).

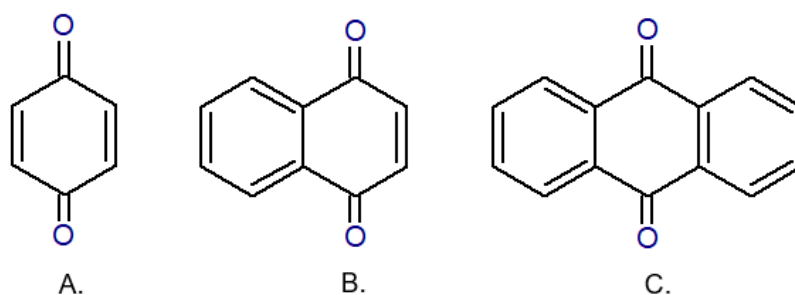


Figura 6. Estruturas moleculares das quinonas (A) *p*-Benzoquinona, (B) Naftoquinona e (C) Antraquinona. Fonte: (Adaptada de El-Najjar *et al.*, 2011).

Para o gênero *Sinningia*, há relatos na literatura quanto ao isolamento e avaliação das propriedades biológicas das quinonas com efeito anti-inflamatório, antinociceptivo e antipirético a partir dos extratos brutos de *S. canescens* e suas frações quinônicas (Lomba *et al.*, 2017); naftoquinonas isoladas dos tubérculos de *S. reitzii* com atividades anti-inflamatória e antinociceptiva (Soares *et al.*, 2017), assim como, hidronaftoquinonas e antraquinonas isoladas dos tubérculos de *S. aggregata* e *S. speciosa* como foi mencionado na Tabela 1 em trabalhos realizados por Verdan *et al.*, 2009; Verdan & Stefanello, 2012; Verdan, Souza de Mera, *et al.*, 2015.

Por outro lado, há trabalhos reportando o isolamento e avaliação de substâncias quinônicas de micro-organismos endofíticos, tais como o ácido torreianico (Lee *et al.*, 1996; Strobel, 2018), hidronaftalenonas com atividade antimicobacteriana (Sommart

et al., 2008), naftoquinonas com atividade anti-inflamatória e antidiabética (Mishra *et al.*, 2013), antraquinonas, ciclopentanonas e naftoquinonas isoladas de *Fusarium* sp. com atividade antibacteriana e antimalárica (Trisuwan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2017) e antraquinonas isoladas de *Geosmithia lavendula* (Malak *et al.*, 2013, 2014).

Ainda têm sido documentado na literatura estudos mostrando quinonas com resultados positivos na prevenção e tratamento de doenças osteodegenerativas e coronarianas por serem transportadoras de elétrons e precursores biossintéticos da vitamina K (El-Najjar *et al.*, 2011). Algumas quinonas, por apresentarem capacidade antioxidante, atuam melhorando o estresse oxidativo e o funcionamento do organismo. Medicamentos clinicamente aprovados ou em ensaios clínicos contra o câncer contém como ativos quinonas (El-Najjar *et al.*, 2011). Quinonas também são agentes ativos importantes em medicamentos fitoterápicos empregados como laxantes (Verdan & Stefanello, 2012).

Desta forma, observa-se o potencial de plantas da família Gesneriaceae e de micro-organismos endofíticos a elas associados como fonte de agentes biologicamente ativos, o que encoraja a realização de estudos multidisciplinares para a bioprospecção de moléculas bioativas nestas matrizes biológicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo geral avaliar as condições de cultivo, o potencial metabólico e a bioatividade de *S. speciosa* “grupo Fyfiana” (planta *in natura*, plântulas *in vitro* e cultura de calos) e *Geosmithia* sp. SSP7, para a busca de substâncias bioativas.

2.2. Objetivos Específicos

- I. Proceder o cultivo de plântulas *in vitro* e cultura de calos assépticos a partir de explantes foliares de *S. speciosa*;
- II. Realizar a caracterização morfológica e molecular do isolado endofítico SSP7 obtido das folhas de *S. speciosa*;
- III. Cultivar o fungo endofítico SSP7 em pequena escala em meios líquidos, estimulando a produção de biomassa e preparar os extratos metanólicos;
- IV. Estabelecer um sistema de co-cultura das plântulas *in vitro*, calos e entre o fungo endofítico SSP7, detectando a influência desse sistema no rendimento de metabólitos secundários bioativos;
- V. Obter o perfil químico dos extratos metanólicos da planta *in natura* e obtidas *in vitro*, do fungo endofítico SSP7 e dos sistemas em co-cultura sintéticas planta *in vitro* – endófito e realizar uma análise quantitativa de substâncias detectadas e que possam ser empregadas como marcadores químicos;
- VI. Avaliar *in vitro* as atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-*Leishmania* e a citotoxicidade dos extratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção da espécie vegetal

O conhecimento prévio da química e bioatividade de plantas da família Gesneriaceae e do gênero *Sinningia* em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, assim como a denominação no modelo de domesticação vegetal, nos conduziram a escolha de *S. speciosa* com vista à avaliação do seu potencial metabólico para a busca de moléculas bioativas e da interação planta – endófito em termos metabólicos e de bioatividade.

3.2. Coleta e classificação do material vegetal

Um total de sete (7) exemplares de *S. speciosa* “grupo Fyfiana” foram adquiridas no comércio de plantas ornamentais da cidade de Holambra, São Paulo, Brasil, em julho de 2018, nas coordenadas 22° 37' 44" S; 47° 04' 14,1" W. Esta espécie vegetal está sendo mantida em estufa agrícola no Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (DBV-IB-UNICAMP) pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marcos José Salvador (Anexo 1, p. 98 – 99) A identificação botânica foi confirmada pelo especialista da família Gesneriaceae Prof. Dr. Alain Chautems (Conservatoire et Jardin Botaniques de la Ville de Genève, Chemin de l'Impératrice 1, CH-1292, Chambésy, Genebra, Suíça).

3.3. Obtenção de plântulas *in vitro*

3.3.1. Propagação por sementes

Os exemplares de *S. speciosa* “grupo Fyfiana” foram polinizados manualmente e submetidos à estimulação da produção dos frutos, que foram coletados quando atingiram maturação fisiológica determinada pela coloração escura. Posteriormente, estes frutos foram limpos e desinfetados superficialmente para a obtenção das sementes. As sementes foram cultivadas em meio de cultura apropriado, que consistiu na dissolução dos sais básicos MS (Murashige & Scoog, 1962) em água destilada e deionizada (Apêndice 1, p. 88 – 89). O pH foi ajustado a $6,0 \pm 0,2$ com solução de hidróxido de sódio 1M, e adição de Phytigel a 0,3 % para obter o meio de cultura semissólido. As culturas foram mantidas à 25 ± 2 °C.

3.3.2. Propagação por organogênese indireta

Os explantes para propagação de plântulas por organogênese indireta foram obtidos a partir do limbo de folhas de *S. speciosa in natura*. Após a coleta, as folhas desta espécie vegetal foram lavadas com água corrente e desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio 1,5% v/v por 20 minutos. Em seguida, foram submersas em etanol 70% v/v por 1 minuto, seguido de três lavagens em água destilada estéril. Explantes foliares com tamanho aproximado de 0,5 cm² foram excisados, descartando-se a nervura central e margens da folha e inoculados em placas de Petri com meio MS com 3% de sacarose, suplementado com concentrações dos fitorreguladores em combinações contendo 6-benzilaminopurina (BAP), (1,0 a 3,0 mg/L), uma citocinina, e ácido α -naftaleno acético (ANA), (0,1 a 0,3 mg/L), uma auxina, sendo obtido um total 10 tratamentos C₀ (controle) e C₁ a C₉ (nove combinações). A incubação foi realizada no primeiro momento em condições de ausência de luz, a uma temperatura de 25 $\pm$ 2 °C. Após 30 dias foram avaliadas a *Taxa de Regeneração*: $\frac{\text{Número total de brotos obtidos}}{\text{Número total de explantes}}$; e a *Eficiência de Regeneração*: $\frac{\text{Número de explantes que respondem}}{\text{Número total de explantes}}$, expressadas como valor entre 0 e 100 (valores percentuais). No experimento de multiplicação, as brotações/plântulas resultantes foram cultivadas no meio MS com adição de carvão ativo e mantidas em fotoperíodo 12:12 com temperatura de 25 $\pm$ 2 °C e subcultivadas a cada 40 dias.

3.4. Cultura de calos assépticos

Explantes foliares com tamanho aproximado de 0,5 cm² foram obtidos de plântulas pré-estabelecidas *in vitro* (propagação por sementes). Os explantes foram inoculados seguindo alguns critérios descritos por (Paiva & Paiva, 2001) em placas de Petri com meio MS adicionado de 3% de sacarose e suplementado com concentrações de fitorreguladores em combinações contendo BAP (0,005 a 1,5 mg/L) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) (0,005 a 1,5 mg/L), obtendo um total de 8 tratamentos: D₁ (controle) e D₂ a D₈ (sete combinações). O meio foi solidificado com 0,3% de Phytigel e o pH ajustado em 6,0 $\pm$ 2,0 (Apêndice 1, p. 88 – 89). A inoculação dos explantes foi efetuada colocando em contato a superfície adaxial da lâmina foliar com o meio nutritivo. A incubação foi realizada na ausência de luz e temperatura de

25 ± 2 °C. A avaliação dos calos foi efetuada com base no cálculo após 30 dias da
Taxa de Formação: $\frac{\text{Número total de calos obtidos}}{\text{Número total de explantes}}$; e da
Eficiência de formação: $\frac{\text{Número de explantes que respondem}}{\text{Número total de explantes}}$, ambas com valores expressos entre 0 e 100 (valores percentuais). Calos resultantes do melhor tratamento foram transferidos para um novo recipiente com meio de cultura nas mesmas condições de crescimento e subcultivados a cada 20 dias.

3.5. Obtenção da cepa fúngica endofítica

A cepa fúngica SSP7 foi obtida de um banco de micro-organismos (entre bactérias e fungos) isolados das folhas de *S. speciosa* “grupo Fyiana” no ano de 2016 pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marcos José Salvador, em trabalhos desenvolvidos empregando o uso de micro-organismos endofíticos com potencial biotecnológico associados à várias espécies de *Sinningia*.

3.5.1. Preservação

Ao longo do tempo, a cepa foi preservada utilizando três métodos, dois deles amplamente utilizados no laboratório por serem de baixo custo e por proporcionarem estabilidade genética e morfológica às culturas: *Castellani* (Castellani, 1939), criopreservação a -80 °C (Humber, 1997), e também o método das sementes de cevada autoclavadas sugerido por (Strobel, 2018) para endófitos.

3.5.1.1. Método de Castellani

A partir de um cultivo monospórico em Ágar Batata Dextrose (do inglês Potato Dextrose Agar - PDA) após 5 dias de incubação, foram cortados blocos de ágar de aproximadamente 4 a 6 mm³ com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril. Em seguida, foram transferidos, assepticamente, 4 a 5 cubos para tubos criogênicos contendo 1,0 mL de água destilada esterilizada, e por último, foram armazenados sob refrigeração à 5 ± 2 °C.

3.5.1.2. Método de criopreservação a -80 °C

Este método foi realizado seguindo o procedimento inicial descrito para o método de *Castellani*, com a seguinte modificação: os tubos criogênicos foram

acrescidos de 1,0 mL de glicerol 20% estéril, e consequentemente, prévio ao armazenamento a -80 °C, uma etapa de pré- resfriamento a -20 °C foi realizada.

3.5.1.3. *Método de sementes de cevada autoclavadas*

De um cultivo monospórico, conídios foram transferidos por semeadura com agulha para microtubos contendo sementes de cevada autoclavadas. Estes foram pré-incubados à 25 °C/7 dias. Após esse tempo, foram armazenados a -20 °C.

3.5.2. *Caracterização microbiológica*

A análise morfológica da cepa endofítica SSP7 consistiu de uma descrição macroscópica das colônias crescidas em Ágar Creatina Açúcar (CREA) (Frisvad, 1981; Visagie *et al.*, 2014), Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA) (Pitt, 1981; Visagie *et al.*, 2014) e Ágar Extrato de Malte (MEA) (Samson *et al.*, 2010; Visagie *et al.*, 2014) (Apêndice 1, p. 88 – 89), sendo analisadas as características e diâmetros das colônias em cada meio de cultura. As inoculações nos meios de cultura foram feitas a partir de uma suspensão de esporos em solução de ágar semissólido contendo 0,2% de ágar e Tween 80 a 0,05% (Pitt, 1981). Todas as placas foram incubadas às temperaturas de 5 , 25 e 37 °C durante 7 dias. Após, os diâmetros das colônias foram medidos em sua parte mais comprida. Além disso, características importantes como textura da colônia, grau de esporulação, cor dos micélios, cores no verso e reverso das colônias, presença ou não de pigmentos e exsudatos solúveis e/ou produção de ácido foram observados. Para avaliação das características micromorfológicas foram realizadas preparações a partir do meio MEA, sendo observadas, ao microscópio óptico, características como o número de ramificações entre as estipes e fiálides; dimensão, forma e textura das estipes, fiálides, conídios (Visagie *et al.*, 2014).

3.5.3. *Caracterização molecular*

A partir de um cultivo monospórico do fungo endofítico SSP7 crescido em PDA (Apêndice 1, p. 88 – 89) à 25 °C por 5 dias, realizou-se a extração do ADN genômico mediante a técnica fenol-clorofórmio (Pepori *et al.*, 2015). Os iniciadores de amplificação foram a região do espaçador interno transcrito (ITS) de ~620 pb amplificada usando os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Um fragmento de ~495 pb do gene que codifica a β -tubulina foi amplificado utilizando iniciadores universais Bt2a

(5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (Glass & Donaldson, 1995; O'Donnel & Cigelnik, 1997). O fragmento de ~350 pb do fator de alongamento 1- α (EF1- α) foi amplificado usando os *primers* EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG-3') e EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCTTACC-3') (Carbone and Kohn, 1999). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram compostas por misturas de reação (20 μ L) contendo 20 ng de ADN genômico, 0,4 μ M de cada *primer*, 200 μ M de dNTPs, 1 X tampão de PCR, 1,5 μ M de MgCl₂ e 1 unidade de Taq polimerase. O protocolo de amplificação dos *primers* ITS, β -tubulina e EF-1 α foi realizado em um termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), sendo um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos a 95 °C durante 5 min, 55 °C por 90 s, 72 °C por 2 min e um ciclo a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram purificados utilizando minicolunas (*GFX PCR DNA & gel band purification kit*, GE Health Care) e submetidos ao sequenciamento em um sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems* (GE Health Care). As sequências obtidas foram processadas no programa *Bioedit*, versão 7.0.5.3 Windows (Hall, 1999) para a montagem dos *contigs*. As sequências foram submetidas à comparação nos bancos de dados *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e CBS-KNAW (<http://www.westerdijknstitute.nl>). As sequências similares recuperadas dos bancos de dados foram alinhadas no programa CLUSTAL W (Thompson, Higgins & Gibson, 1994), editadas no BIOEDIT (Hall, 1999) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 7.0.26 (Kumar, Stecher & Tamura, 2016). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo indicado pela análise (Tamura, Nei & Kumar, 2004) e a construção das árvores filogenéticas a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens (Felsenstein, 1985).

3.5.4. Análise da biomassa fúngica

A produção de biomassa do fungo endofítico foi avaliada empregando a técnica gravimétrica do peso seco (Larralde, 1996), usando três meios de cultura líquidos

(caldos Czapek, MS e MID). Nas fases experimentais, foram utilizados frascos de *erlenmeyer* de 125 mL, com 50 mL de meio de cultura. Os frascos contendo os respectivos meios de cultura foram inoculados com 0,5 mL de suspensão de conídios em uma concentração de $1,0 \times 10^5$ conídios/mL e, em seguida, foram incubados à 25 ± 2 °C, 150 rpm por 15 dias. A biomassa foi coletada diariamente dos respectivos tratamentos, utilizando papel de filtro de poro grosso Whatman™ número 40 para separá-la do meio de cultura e quantificada por peso seco depois de uma secagem à 40 °C por 48 horas. Estas análises foram feitas em triplicata para realização das análises estatísticas e os valores expressos em $\text{mg}_{\text{peso seco}}/\text{mL}_{\text{medio}}$.

3.6. Sistema de co-culturas sintéticas entre *S. speciosa* (plântulas *in vitro* propagadas por sementes e calos) e o fungo endofítico SSP7

Para o conjunto de co-culturas sintéticas foi utilizada a metodologia adaptada de (Ding *et al.*, 2018). Plântulas *in vitro* de *S. speciosa* propagadas por sementes e calos ($n = 5$) foram inoculadas com 250 µL de uma suspensão do fungo SSP7 a uma concentração final de $3,0 \times 10^3$ conídios/mL. As plântulas e calos foram mantidas em condições de crescimento apropriadas em uma câmara incubadora (B.O.D) por 15 dias, como foi descrito nos itens 3.3.1 e 3.4, respectivamente.

3.7. Obtenção dos extratos e perfil cromatográfico por UHPLC/ESI-MS

3.7.1. Obtenção dos extratos planta *in natura*, plântulas *in vitro*, calos e co-culturas

A biomassa da planta *in natura*, plântulas *in vitro*, calos e co-culturas (plântulas e calos) foi coletada. Para as amostras da planta *in natura*, calos e calos em co-cultura o material foi seco previamente em uma estufa à 40 °C. Os extratos brutos foram obtidos mediante a técnica de maceração-extração assistida com ultrassom (EAU) por um período de 30 minutos, utilizando como líquido extrator o metanol, na relação massa do material e volume do líquido extrator de 1:20, m/v. Após esta etapa, o líquido foi filtrado e os extratos metanólicos obtidos foram evaporados até a secagem total do metanol e, finalmente, transferidos para frascos pesados, para calcular a porcentagem de rendimento dada pela fórmula $\%p/p = \frac{PE}{PI} \times 100$, onde *PE* representa o peso do extrato seco e *PI*, o peso da biomassa inicial.

3.7.2. Obtenção dos extratos do fungo SSP7

A partir de um cultivo monospórico do fungo endofítico SSP7 crescido em PDA, incubado à 25 ± 2 °C por 5 a 7 dias, foi preparada uma suspensão de conídios a uma concentração inicial de $1,0 \times 10^5$ conídios/mL em solução salina (0,9%) + Tween 80 (0,1%) (solução NT). Em seguida, essa suspensão foi inoculada em 300 mL dos meios Czapek, MID e MS e incubados sob agitação à 25 ± 2 °C por 150 rpm durante o tempo estipulado para a estimativa da biomassa fúngica. Após esse tempo, a biomassa foi pesada e seca para determinar o rendimento e o meio líquido foi submetido à extração para obter os extratos brutos, seguindo o método descrito por (Pimenta *et al.*, 2010). Para a extração, os meios líquidos foram adsorvidos em um cartucho de coluna C18 (2 g), com uma relação de meio líquido adsorvido na coluna e de volume do líquido extrator de 30:10, v/v. O cartucho foi eluído com 100% de metanol. Os extratos metanólicos obtidos a partir da extração em fase sólida (SPE) de cada meio líquido foram evaporados até a secagem total do metanol e, finalmente, transferidos para frascos pesados para calcular a porcentagem de rendimento dada pela fórmula $\%p/v = \frac{PE}{VI} \times 100$, onde *PE* representa o peso do extrato seco e *VI* o volume de líquido inicial.

3.7.3. Perfil cromatográfico por UHPLC/ESI-MS de baixa resolução e alta resolução

O perfil químico dos extratos foi obtido inicialmente por UHPLC/ESI-MS de baixa resolução em um estudo de desreplicação para todas as amostras. Foram analisadas alíquotas de 1 mg de cada extrato/1 mL de metanol. As condições cromatográficas, incluindo os solventes, sistema de eluição gradiente, volume de injeção, temperatura da coluna e os parâmetros do espectrômetro de massas utilizados foram realizados segundo método padronizado pelo grupo de pesquisa. Assim, alíquotas de 10 µL de cada amostra foram injetados em um cromatógrafo UHPLC® (Acquity da Waters) provido de uma coluna C18 Kinetex (1,7 µm x 2,1 mm x 50 mm) acondicionada em forno à 30 °C. A eluição foi feita por gradiente, com vazão de 200 µL/min, utilizando como água purificada (Milli-Q) com 0,1 % de ácido fórmico como fase móvel A e acetonitrila (grau cromatográfico) como fase móvel B, sendo o tempo de corrida de 12 minutos. Para o sistema de detecção foi utilizado um espectrômetro de massas triplo-quadrupolar (TQD-Acquity da Waters), com ionização por *eletrospray* (ESI) realizando varredura em modos positivo e negativo nas seguintes condições: capilar de ± 3000

V, cone de ± 30 V, extrator de 1,0 V, temperatura da fonte de 130 °C e temperatura de dessolvatação de 250 °C.

3.7.4. *Análise quantitativa de substâncias por UHPLC/ESI-MS/MS*

As análises quantitativas foram realizadas em cromatógrafo Acquity HClass da Waters acoplado a um espectrômetro de massas UHR-ESI-QqTOF Impact II™ da Bruker usando uma coluna C18 BEH Waters Acquity (2,1 mm x 50 mm x 1,7 μ m tamanho de partícula). O método utilizado foi: solvente A (água Milli Q + ácido fórmico 0,1%) e solvente B (metanol padrão UHPLC), a vazão foi de 0,2 mL/min, com um tempo final de corrida de 12 minutos começando o gradiente de eleição com 5% de metanol até 100% no minuto 9,0 mantendo a concentração do solvente até o minuto 10,0 e finalmente a partir de 10,1 minuto voltando a situação inicial e permanecendo até o minuto 12,0. A vazão foi de 0,2 mL/min. Foram utilizadas como amostras-padrão de referência oito substâncias isoladas previamente de espécies de *Sinningia* cedidas pela Profa. Dra. Maria Élide Alves Stefanello do Departamento de Química da Universidade Federal de Paraná – UFPR (Apêndice 2, p. 90): Halleridona, 1-hidroxi-tectoquinona, Dunniol, 8-hidroxi-dunniona, Pustulina (7-hidroxi-6-metoxi-tectoquinona), 7-hidroxi-6-metoxi- α -dunniona, Ácido betulínico e Calceolariosídeo B. Estas substâncias foram analisadas empregando amostras multielementares contendo cada uma das amostras-padrão em seis diferentes concentrações 125,0 μ g/mL, 62,50 μ g/mL, 31,25 μ g/mL, 15,62 μ g/mL, 7,81 μ g/mL e 3,90 μ g/mL. Assim, foram obtidas curvas analíticas para cada uma das substâncias analisadas. Estas análises foram realizadas em duplicata.

3.8. **Ensaio para avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-*Leishmania* e de citotoxicidade**

3.8.1. *Atividade antioxidante - Ensaio Oxygen Radical Absorbance Capacity Fluorescein (ORAC-FL)*

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada através do ensaio de ORAC-FL com fluoresceína como sonda fluorescente e AAPH (2,2'-azobis (2-amidiopropano) dicloridrato) como fonte de radicais livres (Prior *et al.*, 2003). Os testes foram realizados seguindo o método descrito por (Salvador *et al.*, 2006). Para tanto, soluções de reserva dos extratos metanólicos (1 mg/mL) em tampão fosfato/

dimetilsulfóxido (DMSO) (99:1, v/v) foram preparadas e diluídas 100, 500, 1000, 5000 e 10000 vezes com tampão fosfato. O trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), substância análoga da vitamina E, foi utilizado como padrão e trabalhado em concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 μ M. Igualmente, substâncias com expressivo poder antioxidante descrito (Quercetina, Isoquercitrina, Catequina e Epicatequina) e as substâncias padrão (Calceolariosídeo B e Pustulina), foram utilizadas como controles positivos. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas com filtro de fluorescência (excitação λ = 485 nm e emissão λ = 528 nm). A cinética da reação foi monitorada a cada 2 minutos durante um período de 60 minutos (temperatura de 37 °C). Os resultados dos extratos foram expressos em micromol trolox equivalente (TE) por grama de extrato (μ mol TE/g) e os controles positivos foram expressos em trolox relativo (TR). Estas análises foram realizadas em triplicata e conduzidas para as análises estatísticas.

3.8.2. Atividade antimicrobiana – Método de Microdiluição

A atividade antimicrobiana *in vitro* foi investigada por meio de um *screening* inicial dos extratos empregando o método de microdiluição em caldo seguindo as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), documentos M07-A9 e M27-A2, para bactérias que crescem aerobicamente e fungos, respectivamente (NCCLS, 2002; CLSI, 2012, 2014).

Para determinação da atividade antibacteriana, foram utilizadas as seguintes cepas: a) Gram-negativa fermentadora: *Escherichia coli* (ATCC® 35218™); b) Gram-negativa não fermentadora: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™); c) Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 14458™) e *Enterococcus faecalis* (ATCC® 51299™). Todas essas cepas foram ativadas em Ágar Müeller Hinton (Difco) a 37 °C, em aerobiose, por 24 horas, e avaliadas da seguinte maneira: em cada poço da microplaca foram dispensados 100 μ L de caldo Müeller Hinton (MHB), 10 μ L da suspensão bacteriana padronizada a ser testada ($5,0 \times 10^5$ /mL) e 100 μ L de cada extrato metanólico a uma concentração final de 1 mg/mL.

Para determinação da atividade antifúngica foi utilizada a cepa da levedura *Candida albicans* (ATCC® 10231™) ativada em Ágar Sabouraud-Dextrose à 37 ± 2 °C por 48 horas. Em cada poço da microplaca foram adicionados 100 μ L de meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 sem vermelho de fenol, 100 μ L da suspensão da

levedura padronizada a ser testada ($0,5 - 2,5 \times 10^3/\text{mL}$) e $100 \mu\text{L}$ de cada extrato metanólico a uma concentração de 1 mg/mL . Foram utilizados controles de esterilidade dos meios de cultura, diluente dos extratos metanólicos (DMSO), crescimento da cepa e controles positivos de inibição fazendo uso dos antimicrobianos (para bactérias - cloranfenicol $100 \mu\text{g/mL}$ e para fungos - voriconazol $0,1 \mu\text{g/mL}$). Para revelação das placas foram adicionados $10 \mu\text{L}$ de uma solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) 5% e procedeu-se à nova incubação por 2 horas à 37°C . Após, foi realizada leitura a 570 nm em um leitor de placas. Estas análises foram realizadas em triplicata.

3.8.3. Avaliação do efeito sobre a viabilidade de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

A viabilidade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (PH8) *in vitro* foi avaliada empregando-se o método colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Mosmann, 1983). Para tanto, promastigotas de culturas axênicas mantidas por repiques seriados à 25°C em meio M199, pH 7,40 foram colhidas em fase logarítmica de crescimento (4º dia de cultivo), lavadas por centrifugação e ressuspensas no meio a uma concentração final de 10^6 parasitos/mL. As suspensões de parasitos assim preparadas foram incubadas em microplacas de 96 poços de fundo chato à 25°C por 18 horas, na presença dos extratos metanólicos às concentrações de (100; 50; $25 \mu\text{g/mL}$), todos previamente dissolvidos em DMSO (concentração final de 10 mg/mL). Suspensões controles dos parasitos foram incubadas apenas em M199. Decorrido o período de incubação, um volume de $30 \mu\text{L}$ de MTT foi adicionado e as placas foram incubadas por 3 horas à 25°C . Em seguida, foram adicionados $30 \mu\text{L}$ de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em cada poço para a solubilização dos cristais de formazan. As absorbâncias foram, então, registradas em uma leitora de microplacas para as absorbâncias de 595 nm e referência de 655 nm , sendo os valores de densidade óptica correspondentes à redução enzimática do MTT em relação ao controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a concentração de extrato que induz metade do efeito máximo (EC_{50}).

3.8.4. Triagem de citotoxicidade através do ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT

A triagem de citotoxicidade foi realizada por meio do ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT (Mosmann, 1983), utilizando linhagem proveniente de fibroblasto de embrião de camundongo 3T3. As células (10^5 células/mL) foram plaqueadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) adicionado de 5% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas por 24 horas à 37 °C/5% CO₂. Em seguida, as células foram, então, tratadas com diferentes concentrações dos extratos metanólicos diluídas em meio de cultura (1000 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL e 0,1 µg/mL) e incubadas por 48 horas à 37 °C/5% CO₂. Posteriormente, 100 µL de solução de trabalho MTT (0,5 mg/mL em solução tampão fosfato e meio) foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por 4 horas à 37 °C/5% CO₂. Logo após, o meio foi, então, aspirado e os cristais de formazan formados foram solubilizados pela adição de 100 µL de DMSO por poço durante 15 min usando as mesmas condições descritas anteriormente (3.8.3). Finalmente, a intensidade dos cristais formazan dissolvidos (cor púrpura) foi quantificada usando o leitor de microplacas a 570 nm (Bahuguna *et al.*, 2017). Uma curva foi obtida a partir das concentrações de cada extrato, quando comparado com às células não-tratadas (controle) foram consideradas as concentrações em função da viabilidade celular. Estas análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como a metade da concentração inibitória máxima da viabilidade celular (IC₅₀).

3.9. Análise estatística

Para cada ensaio foi utilizado o teste estatístico mais adequado (ANOVA, teste de Turkey ou t de Student). Os resultados foram apresentados como média, desvio padrão DP e coeficiente de variação (% CV).

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de plântulas *in vitro*

Foram obtidas plântulas *in vitro* de *S. speciosa* tanto a partir de sementes quanto via organogênese indireta, empregando-se diferentes combinações de fitorreguladores. A Figura 7 mostra os efeitos de nove diferentes combinações de BAP e ANA para a obtenção de brotos depois da quarta semana de cultivo, e plântulas *in vitro*, via organogênese indireta, após 2 meses de cultivo, com taxa e eficiência de regeneração variando de 0 a 70% e 10 a 100%, respectivamente. Os melhores resultados foram observados com o tratamento C₂ (BAP 1,0 mg/L e ANA 0,2 mg/L) quando comparados com os demais tratamentos avaliados e o controle C₀ (Figuras 7 e 8D).

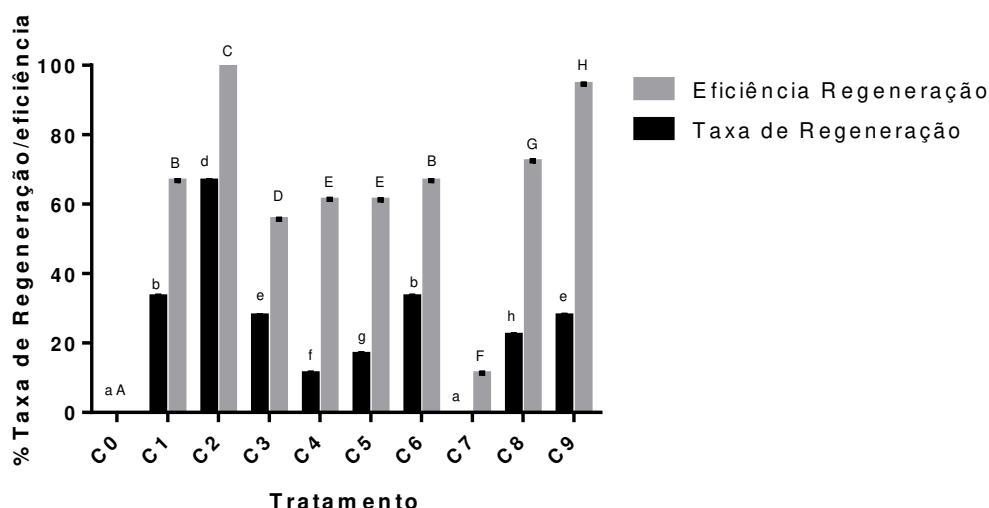


Figura 7. Efeito das combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) x ácido α -naftaleno acético (ANA) sobre a eficiência e taxa de regeneração de explantes de *Sinningia speciosa*. C₀ (controle), C₁ a C₉: tratamentos em combinações de BAP e ANA após 30 dias (n= 3). Valores que não compartilham as mesmas letras minúsculas e/ou maiúsculas são significativamente diferentes (p<0,001). Fonte: elaborado pelo autor (2019).

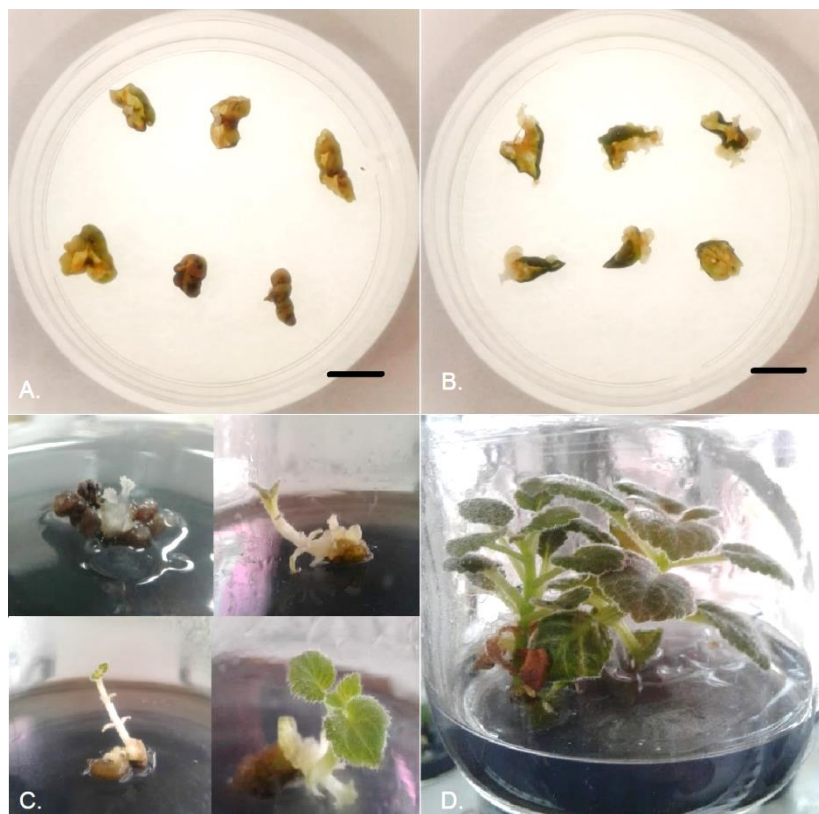


Figura 8. Fotografias do desenvolvimento de explantes de *Sinningia speciosa* para a regeneração *in vitro* via organogênese indireta: (A) explantes de *S. speciosa* em meio MS sem fitorreguladores (controle); (B) explantes no meio MS + tratamento C₂, com brotamentos, após 30 dias; (C) e (D) cultura primária de *S. speciosa* no meio MS + carvão. Tamanho da barra, 1 cm. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

4.2. Obtenção de cultura de calos

Conforme apresenta a Figura 9, para a indução de calos friáveis os explantes de *S. speciosa* tiveram uma eficiência de formação de cerca de 100% após 30 dias de cultura, sendo que os resultados obtidos com os tratamentos D₄ e D₅ foram muito similares. De modo geral, altas concentrações no balanço citocinina x auxina (BAP x 2,4-D) conduziram à obtenção de calos oxidados. No entanto, uma taxa de formação próxima de 45% foi alcançada nos tratamentos D₄ e D₅ quando comparados com o controle D₁ e demais tratamentos. Desse modo, foi estabelecido o tratamento D₄ (BAP 0,05 mg/L e 2,4-D 0,05 mg/L) como a melhor condição para a indução de calos de *S. speciosa* dada as condições de cultura e friabilidade observadas (Figura 10B e 10D) e visto que a análise estatística revelou que a taxa de formação de D₄ foi significativamente diferente de D₅ ($b \neq c$).

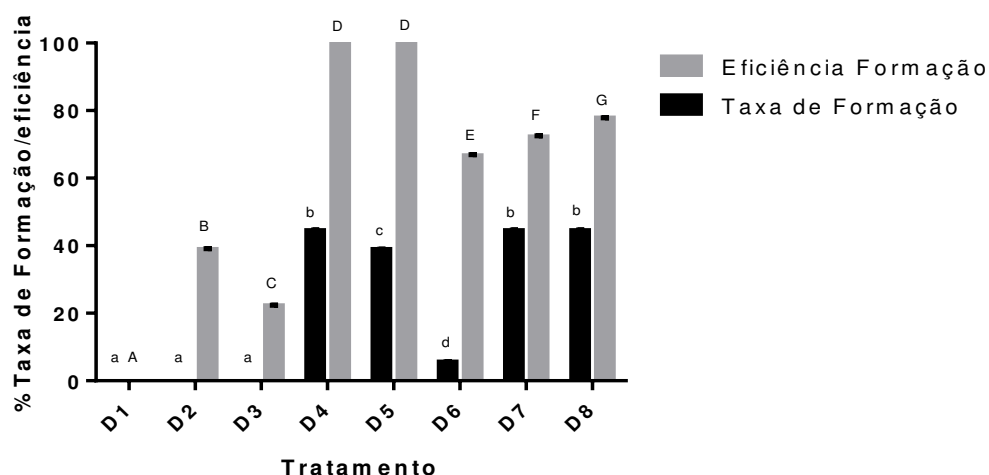


Figura 9. Efeito das combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) x ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre a eficiência e taxa de formação de calos a partir de explantes de *Sinningia speciosa*. D₁: controle, D₂ a D₈: tratamentos com diferentes combinações de BAP e 2,4-D após 30 dias (n=3). Valores que não compartilham as mesmas letras minúsculas e/ou maiúsculas são significativamente diferentes (p<0,001). Fonte: elaborado pelo autor (2019).

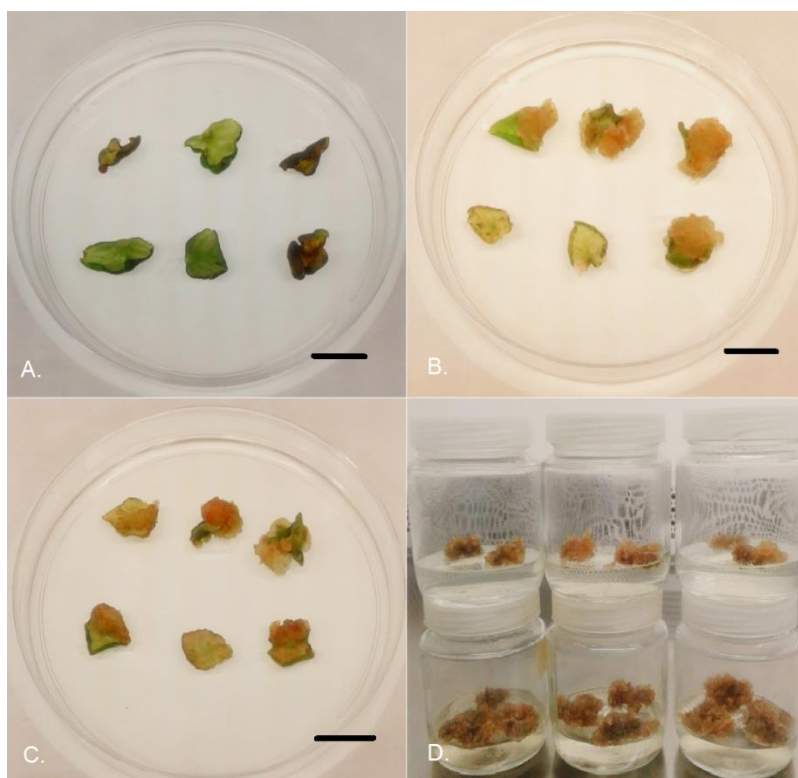


Figura 10. Fotografias do estado de desenvolvimento de explantes de *Sinningia speciosa* para a obtenção de calos friáveis: (A) explantes de *S. speciosa* em meio MS sem fitorreguladores (controle); (B) explantes no meio MS + tratamento D₄; (C) explantes no meio MS + tratamento D₅ após 30 dias; (D) culturas de calos com 20 dias de cultura. Tamanho da barra, 1 cm. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

4.3. Obtenção do fungo endofítico SSP7, caracterização fenotípica e molecular e análise da biomassa

O procedimento de inoculação do fungo endofítico SSP7, obtido das folhas de *S. speciosa*, foi efetuado em diferentes meios de cultura, para a sua caracterização macro e micromorfológicas. Em MEA, o fungo endofítico apresentou conidióforos penicilados ou ramificados irregularmente, hifas septadas com aspecto engrossado, estipe indeterminada ligeiramente encurvada, fiálides triverticiladas com tamanho de ~10 µm, métulas de ~9 µm e conídios alongados com tamanhos entre 3,5 a 3,6 µm (Figura 11C a F). Esses achados mostraram a similaridade do isolado SSP7 com espécies do gênero *Penicillium*. Uma análise mais detalhada quanto ao aspecto macroscópico das colônias deste isolado nos meios de cultura revelou que esse fungo cresceu em CYA, CREA e MEA quando incubado à 25 °C por 7 dias, não sendo observado crescimento nesses mesmos meios de cultura quando empregadas as temperaturas de 5 °C e 37 °C. As colônias apresentaram as seguintes características quando cultivadas em CYA, CREA e MEA e incubadas à 25 °C por 7 dias (Figura 11A):

- Características das colônias em CYA (Figura 11A; primeira coluna à esquerda): colônias com 30 mm de diâmetro em média, planas, elevadas e enrugadas centralmente; superfície com textura aveludada ou granular, micélio branco ou marrom-amarelado, exsudado ausente, pigmento solúvel amarelo âmbar à castanho claro; reverso enferrujado à castanho escuro;
- Características das colônias em CREA (Figura 11A; coluna do meio): colônias com 16 mm de diâmetro em média, planas, baixas, textura superficial aveludada, micélio rosa à branco, a produção de ácido foi observada pela viragem de cor de púrpura para amarelo e reverso amarelo;
- Características das colônias em MEA (Figura 11A; primeira coluna à direita): colônias com 18 mm de diâmetro em média, planas, baixas, textura superficial aveludada, micélio rosa na área central com borda rosa pálido, pigmento solúvel amarelado, reverso amarelo à avermelhado.

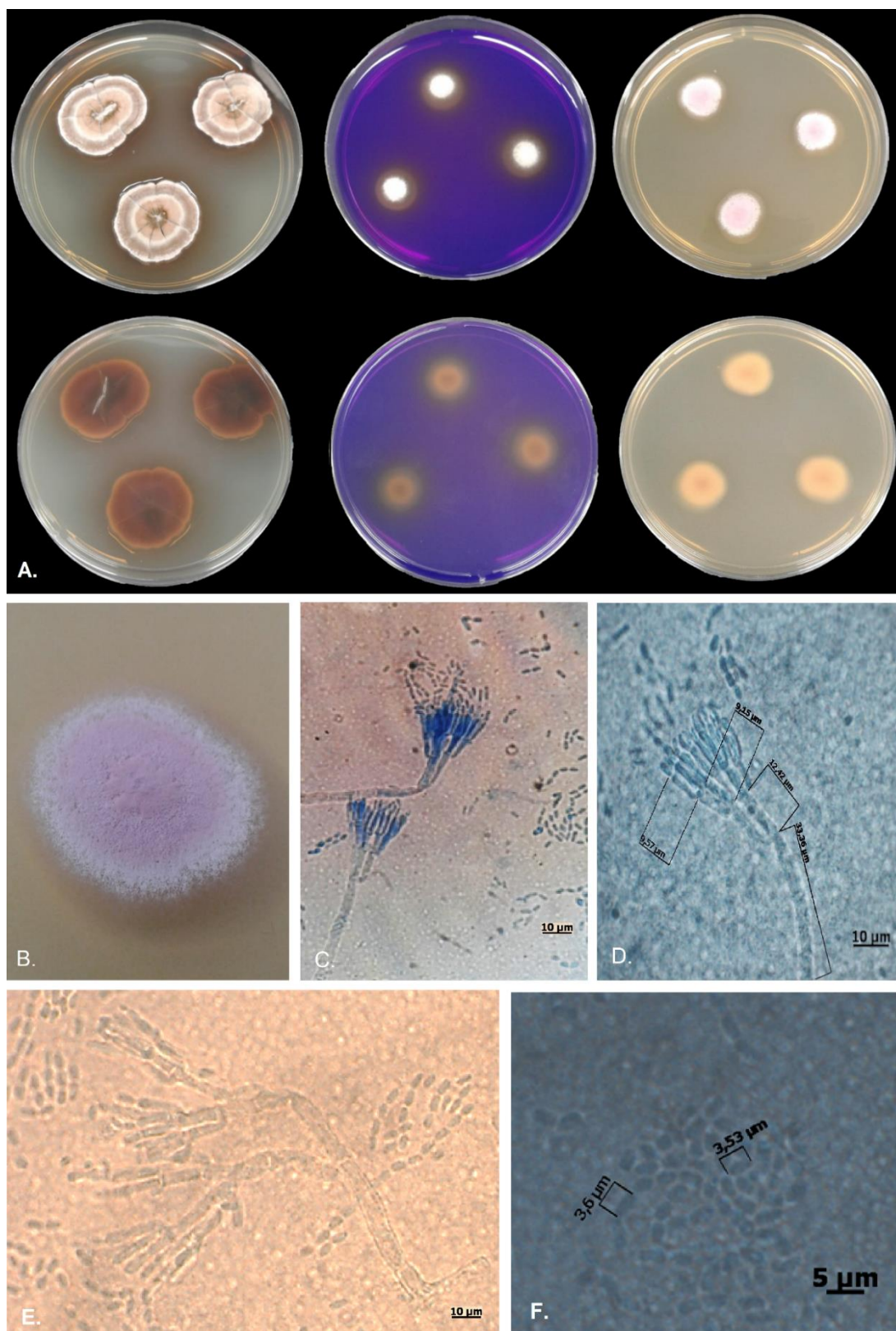


Figura 11. Fotografias das colônias do fungo SSP7 crescidas à 25 °C por 7 dias nos seguintes meios (A) CYA – primeira coluna à esquerda; linhas: superior (verso) e inferior (reverso); CREA – coluna do meio; linhas: superior (verso) e inferior (reverso); e MEA – primeira coluna à direita; linhas: superior (verso) e inferior (reverso); (B) textura da colônia em MEA; (C), (D), (E) conidióforos; e (F) conídios. Barras: (C) a (E): 10 µm; (F): 5 µm. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

As características morfológicas avaliadas em CYA, CREA e MEA, após 7 dias de incubação à 25 °C, sugeriram que SSP7 pertencia ao gênero *Geosmithia*, o qual foi confirmado mediante análises moleculares, como será apresentado a seguir.

A Figura 12 apresenta a árvore filogenética baseada em dados da região ITS para o fungo endofítico SSP7.

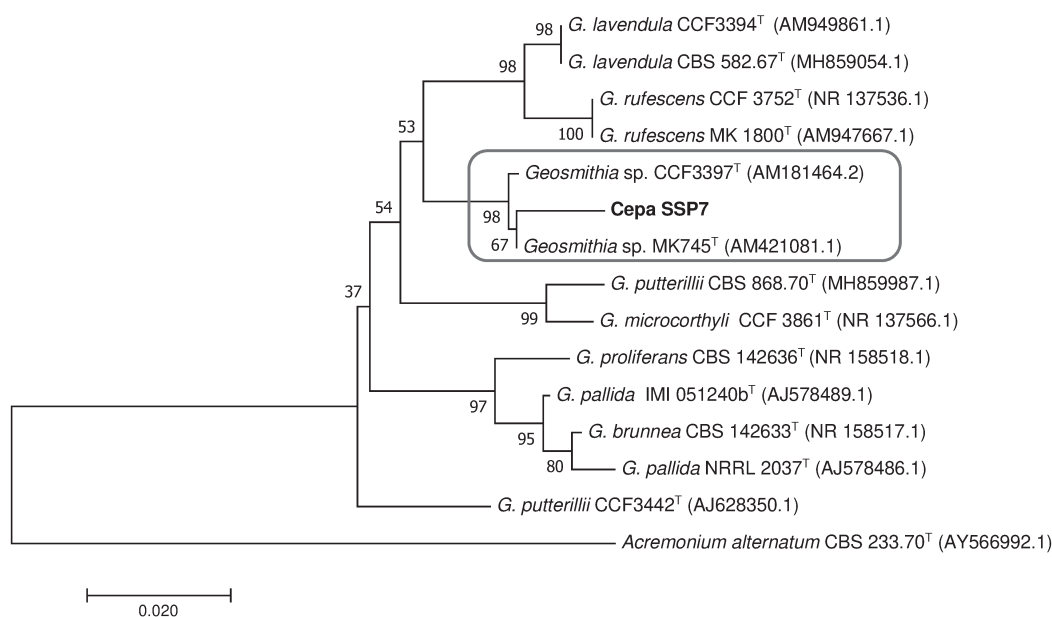


Figura 12. Árvore filogenética baseada nos dados da região do espaçador interno transcrito (ITS) para o fungo endofítico SSP7. A estabilidade dos ramos foi avaliada por análise *bootstrap* com 1000 repetições. A sequência de *Acremonium alternatum* foi incluída como grupo externo. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Pela análise desta Figura, observa-se que o fungo endofítico SSP7 está posicionada no mesmo ramo que *Geosmithia* sp. MK745, com 67% de similaridade; porém, ambas as cepas estão organizadas no mesmo ramo que *Geosmithia* sp. CCF3397, com 98% de similaridade, o que permite dizer que o isolado SSP7 pertence ao gênero *Geosmithia* sp.

Como foi observado nas árvores filogenéticas obtidas dos produtos da amplificação dos *primers* β -tubulina (Figura 13) e EF-1 α (Figura 14) da cepa em estudo, verificaram-se agrupamentos próximos às cepas de *Geosmithia* sp. AP-2015, que mostraram grande distância evolutiva entre os nucleotídeos das sequências analisadas e da cepa SSP7 ($\cong 0.5$), como também pontos de corte de similaridade baixos entre essa cepa e as demais analisadas quando comparado ao referencial

teórico de similaridade, a saber: ≥ 97 a 100% para atribuir uma espécie e ≥ 95 % para atribuir um gênero (Raja *et al.*, 2017), não permitindo a definição em nível de espécie, podendo tratar-se inclusive de uma nova. Portanto, não foi possível definir a cepa SSP7 em nível de espécie.

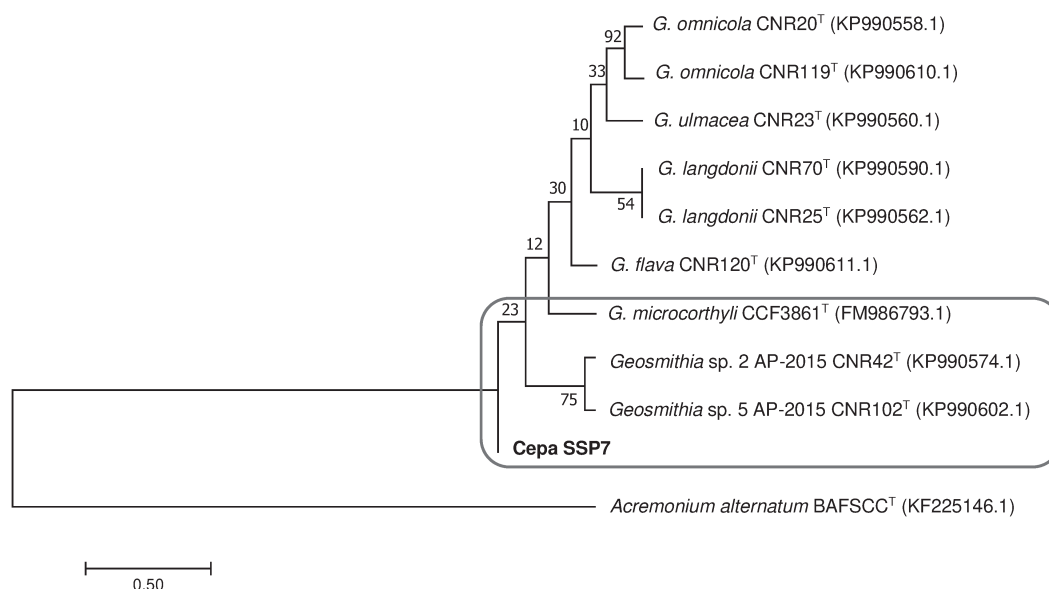


Figura 13. Árvore filogenética baseada em dados do *locus* β -tubulina para a cepa *Geosmithia* sp. SSP7. A estabilidade dos ramos foi avaliada por análise *bootstrap* com 1000 repetições. A sequência de *Acremonium alternatum* foi incluída como grupo externo. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

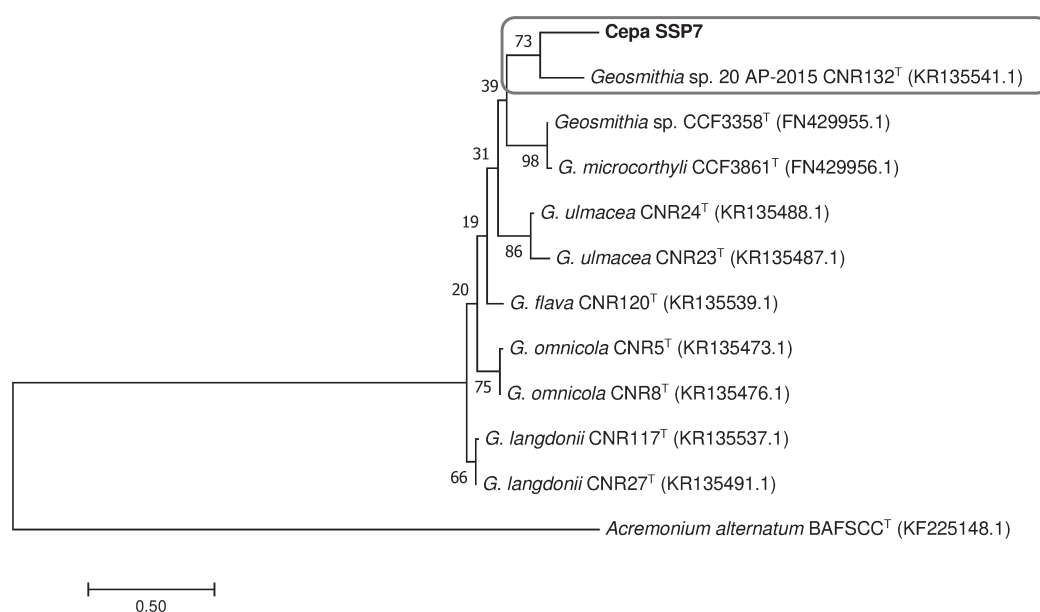


Figura 14. Árvore filogenética baseada em dados do EF-1 α para a cepa *Geosmithia* sp. SSP7. A estabilidade dos ramos foi avaliada por análise *bootstrap* com 1000 repetições. A sequência de *Acremonium alternatum* foi incluída como grupo externo. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Para a estimativa da biomassa em base seca avaliou-se o comportamento da cepa *Geosmithia* sp. SSP7 em meios de cultura líquidos quimicamente definidos e observou-se o melhor crescimento; após 15 dias de sub-cultivo, no meio MID quando comparado àquele observado em Czapek e MS (Figura 15).

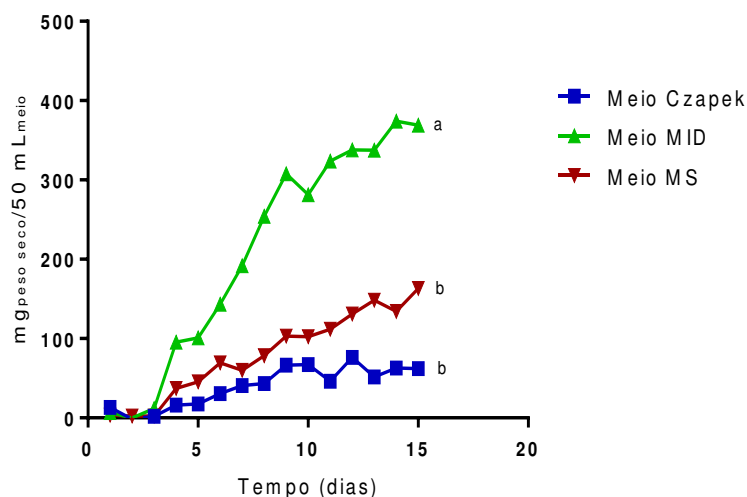


Figura 15. Imagem gráfica da relação do tempo de cultivo em dias (observação por 15 dias) com a biomassa seca (mg) de *Geosmithia* sp. SSP7 no volume de 50 mL dos meios líquidos Czapek, MID e MS (n=3). No Gráfico, letras minúsculas iguais não apresentam diferenças estatísticas para ($p < 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor (2019).

4.4. Sistema de co-culturas sintéticas

Foram obtidas co-culturas sintéticas de plântulas *in vitro* obtidas por sementes e da cultura de calos de *S. speciosa*, em conjunto com a cepa *Geosmithia* sp. SSP7. As plântulas das co-culturas planta-endófito mostraram-se vigorosas, com aumento na rizosfera (Figura 16A), sendo que, no caso dos calos, observou-se um leve escurecimento da massa celular (Figura 16B).

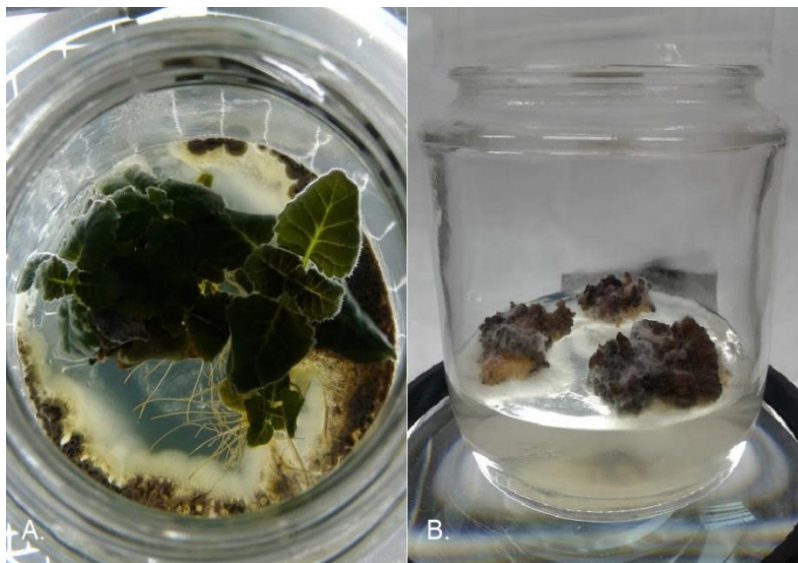


Figura 16. Seguimento das plântulas *in vitro* obtidas por sementes (A) e calos (B) de *Sinningia speciosa* co-cultivados com *Geosmithia* sp. SSP7 crescido no meio MS após 15 dias de cultura. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

4.5. Rendimento dos extratos metanólicos

Foram obtidos extratos metanólicos de *S. speciosa* (planta *in natura*, plântula *in vitro* obtida por semente e por organogênese e cultura de calos), de *Geosmithia* sp. SSP7 e das co-culturas *in vitro* *S. speciosa*/*Geosmithia* sp. SSP7. Quanto às porcentagens de rendimento em massa destes extratos, verificou-se que o extrato dos calos apresentou 10 vezes a quantidade do rendimento em massa daqueles provenientes de plântulas *in vitro* obtidas por semente e por organogênese e pelo menos 5 vezes a quantidade de rendimento em massa dos extratos da planta *in natura* (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de rendimento em massa dos extratos metanólicos obtidos de *Sinningia speciosa* (planta *in natura*, plântulas *in vitro*, calos), de *Geosmithia* sp. SSP7 (meios Czapek, MID e MS) e de sistemas de co-cultura.

Extrato	Amostra	^{PI} Biomassa (g) ^A ou volume de filtrado (mL) ^B	^{PE} Peso (mg)	% Rendimento (PE/PI)*100
Vegetal 1:20	Planta <i>in natura</i>	1,0 ^A	89,36 (0,56)	8,9 ^a
	Plântulas <i>in vitro</i> sementes	1,0 ^A	33,37 (1,03)	3,3^b
	Plântulas <i>in vitro</i> organogênese	1,0 ^A	34,33 (1,21)	3,4 ^b
	Calos	1,0 ^A	389,72 (2,60)	38,9 ^c
Fúngico 30:10	CZP	30,0 ^B	12,03 (1,12)	40,1 ^e
	MID	30,0 ^B	5,16 (0,64)	17,2 ^f
	MS	30,0 ^B	4,76 (2,00)	15,8 ^f
Co-cultura 1:20	Plântula <i>in vitro</i> + SSP7	1,0 ^A	33,81 (0,98)	3,3^b
	Calo + SSP7	1,0 ^A	219,94 (4,53)	22,0 ^d

Dados expressos como medida do ensaio em triplicata, (DP): desvio padrão. Os valores de porcentagem são resultado de ensaios em triplicata. Letras minúsculas ($a \neq b \neq c \neq d$), ($e \neq f$) indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras-testes, respectivamente, dos extratos; letras maiúscula fazem referência à quantidade inicial das amostras para a obtenção dos extratos, (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Para os extratos metanólicos de *Geosmithia* sp. SSP7 cultivado nos meios CZP, MID e MS; a maior porcentagem de rendimento em massa foi observada no meio CZP, havendo diferenças significativas de (~2,4 vezes) quando comparados com os demais meios de cultura estudados. Por outro lado, nos sistemas de co-cultura, o rendimento das plântulas co-cultivadas com o endófito foi muito similar às porcentagens de rendimento em massa determinadas para as amostras de extratos metanólicos das plântulas *in vitro*. O que não ocorreu com os calos, visto que foi encontrada variação em massa para os calos co-cultivados quando comparados àqueles primeiramente avaliados em condições assépticas, inclusive com diminuição desse parâmetro.

4.6. Análises cromatográficas por UHPLC/ESI-MS

4.6.1. Análise qualitativa por UHPLC/ESI-MS/MS

Obtidos os extratos metanólicos de *S. speciosa* (planta *in natura*, plântulas *in vitro* e calos), de *Geosmithia* sp. SSP7 (meios Czapek, MID e MS) e de sistemas de co-cultura, procedeu-se à análise dos respectivos perfis cromatográficos por UHPLC/ESI-MS, em modo íon negativo e modo íon positivo, e à avaliação de uma possível detecção de algumas substâncias-padrão isoladas e identificadas por nosso grupo de pesquisa de espécies de *Sinningia* e que foram empregadas neste estudo como marcadores químicos do gênero (Figuras 17 a 23; e Apêndice 3 p. 90 – 94).

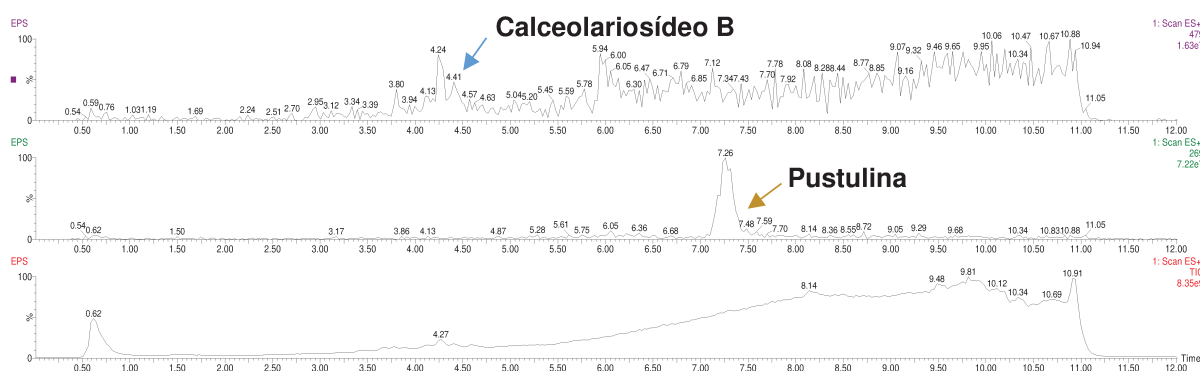


Figura 17. Cromatogramas do extrato metanólico de *Sinningia speciosa* planta *in natura* para as substâncias Calceolariosídeo B (seta azul) e Pustulina (seta laranja) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

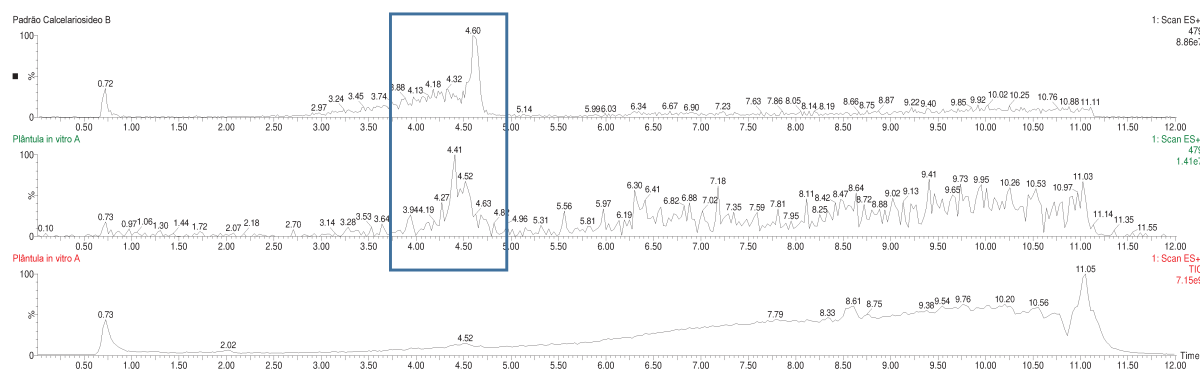


Figura 18. Cromatogramas do extrato metanólico de *Sinningia speciosa* plântula *in vitro* obtida por semente e da substância-padrão Calceolariosídeo B ($m/z=478$) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

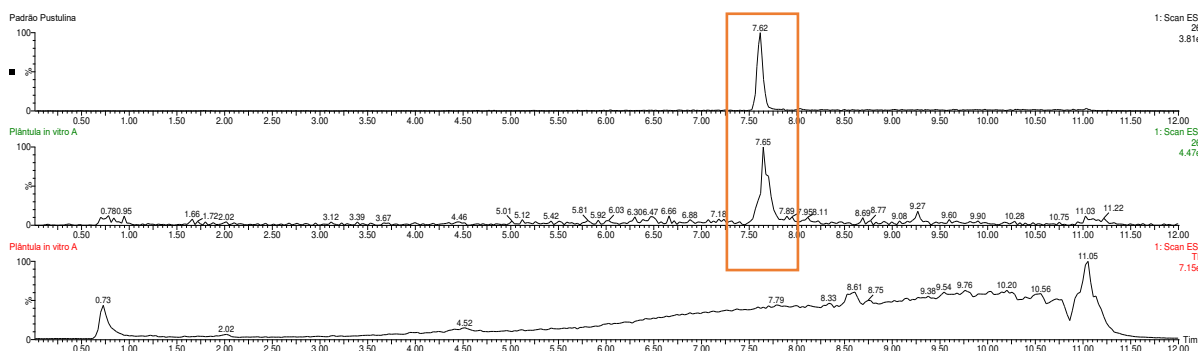


Figura 19. Cromatogramas do extrato metanólico de *Sinningia speciosa* plântula *in vitro* obtida por semente e da substância-padrão Pustulina ($m/z = 268$) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

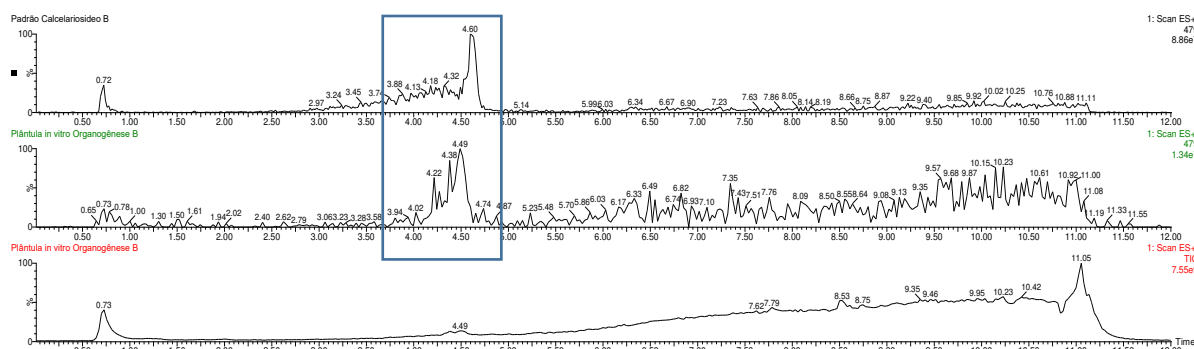


Figura 20. Cromatogramas do extrato metanólico de *Sinningia speciosa* plântula *in vitro* obtida por organogênese e da substância-padrão Calceolariosídeo B ($m/z = 478$) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

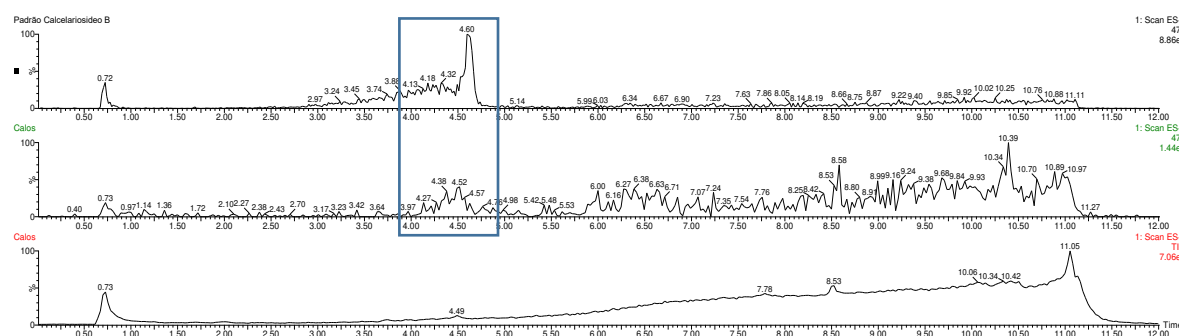


Figura 21. Cromatogramas do extrato metanólico dos calos de *Sinningia speciosa* e da substância-padrão Calceolariosídeo B ($m/z = 478$) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

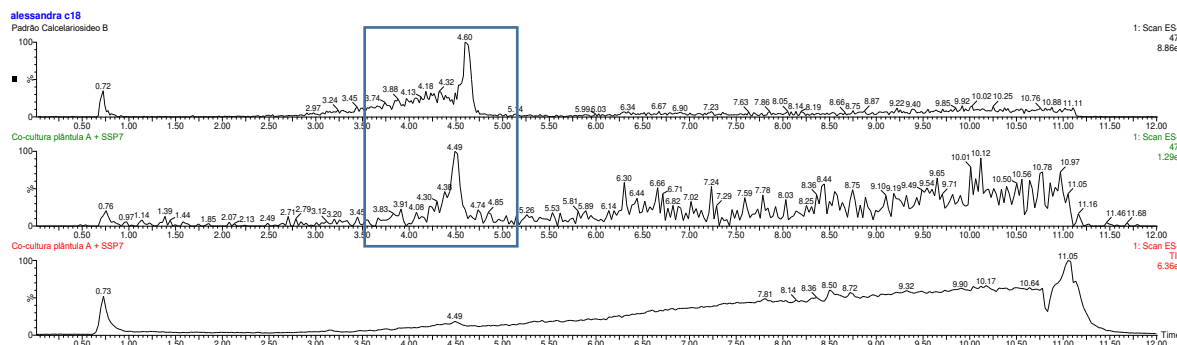


Figura 22. Cromatogramas do extrato metanólico de *Sinningia speciosa* plântula *in vitro* obtida por semente em co-cultura com *Geosmithia* sp. SSP7 e da substância-padrão Calceolariosídeo B ($m/z = 478$) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

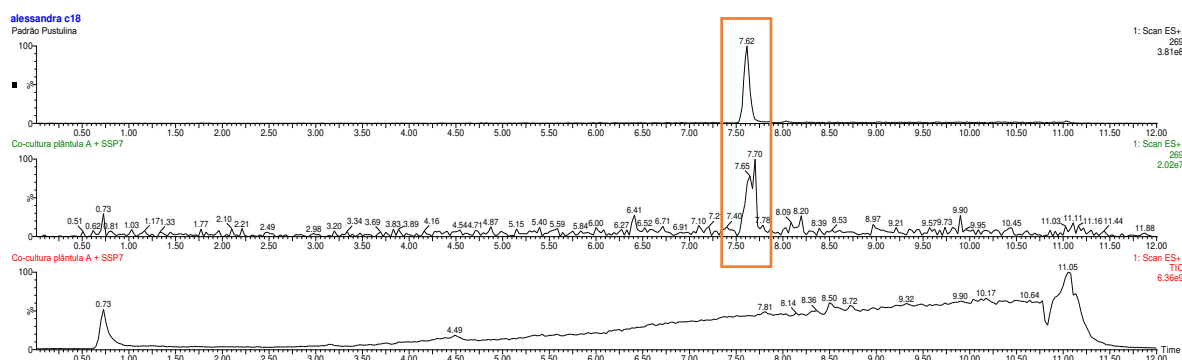


Figura 23. Cromatograma do extrato metanólico de *Sinningia speciosa* plântula *in vitro* obtida por semente em co-cultura com *Geosmithia* sp. SSP7 e da substância-padrão Pustulina ($m/z = 268$) obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Os cromatogramas dos extratos metanólicos de *S. speciosa* obtidos por UHPLC/ESI-MS em modo íon positivo permitiram observar similaridade qualitativa no perfil químico das folhas e das partes subterrâneas da planta *in natura*. Quando comparado o perfil cromatográfico do extrato metanólico da planta e de *Geosmithia* sp. SSP7, verificou-se a ocorrência de regiões com similaridade de picos e outras que diferiram substancialmente.

O resultado do estudo de desreplcação por UHPLC/ESI-MS de baixa resolução permitiu a identificação preliminar de duas substâncias que constam no banco de substâncias-padrão (Apêndice 2 p. 90) do nosso grupo de pesquisa e que foram previamente isoladas dos tubérculos de *S. speciosa* (Verdan *et al.*, 2009; Verdan & Stefanello, 2012). Assim, foram identificados: 1) o glicosídeo fenólico Calceolariosídeo B, com $m/z = 478$, detectado nos extratos metanólicos da planta *in natura* (Figura 17), da plântula *in vitro* obtida por semente (Figura 18) e da plântula obtida por

organogênese (Figura 19), sendo também detectado nos extratos de cultura *in vitro* de calos (Figura 20) e no da co-cultura planta-endófito (Figura 21). Esta substância somente não foi detectada no extrato dos calos em co-cultura com *Geosmithia* sp. SSP7; e 2) a quinona Pustulina (7-hidroxi-6-metoxi-tectoquinona), substância com $m/z = 268$, foi detectada nos extratos metanólicos da planta *in natura* (Figura 17), plântulas *in vitro* obtidas por semente (Figura 19) e nas plântulas *in vitro* obtidas por semente em co-cultura (Figura 23) e (Apêndice 3 p. 91 – 95). Não foram identificadas substâncias com m/z similares às de nosso banco de amostras nos extratos de *Geosmithia* sp. SSP7. Os perfis cromatográficos destes extratos se encontram no Apêndice 3.7 e 3.8, p. 94 - 95.

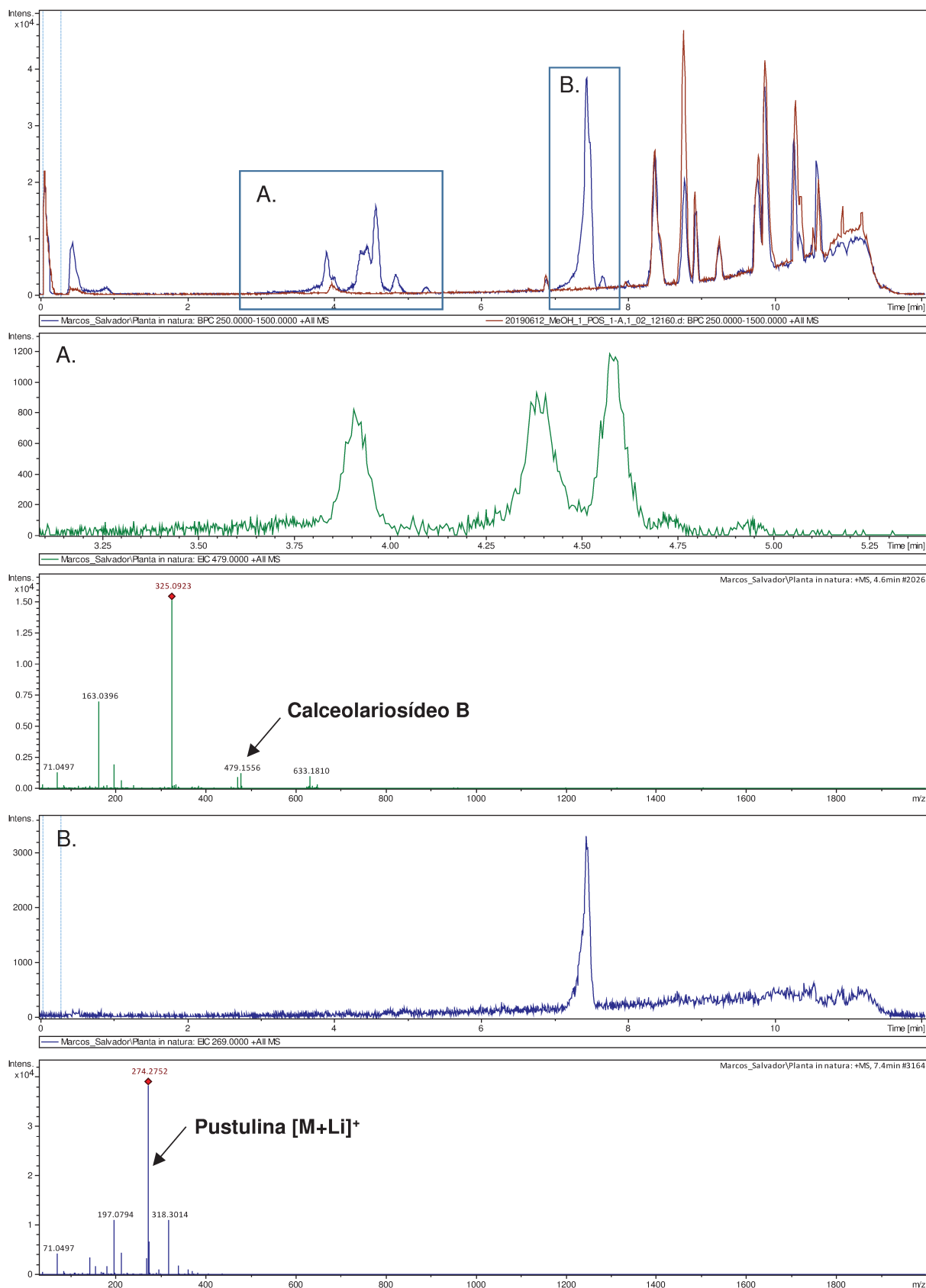


Figura 24. Cromatogramas e espectros (UHPLC-ESI-MS), modo íon positivo, do extrato metanólico planta *in natura*: (A) ampliação região $m/z = 478$ correspondente ao Calceolariosídeo B; e (B) Ampliação região $m/z = 268$ correspondente à Pustulina. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

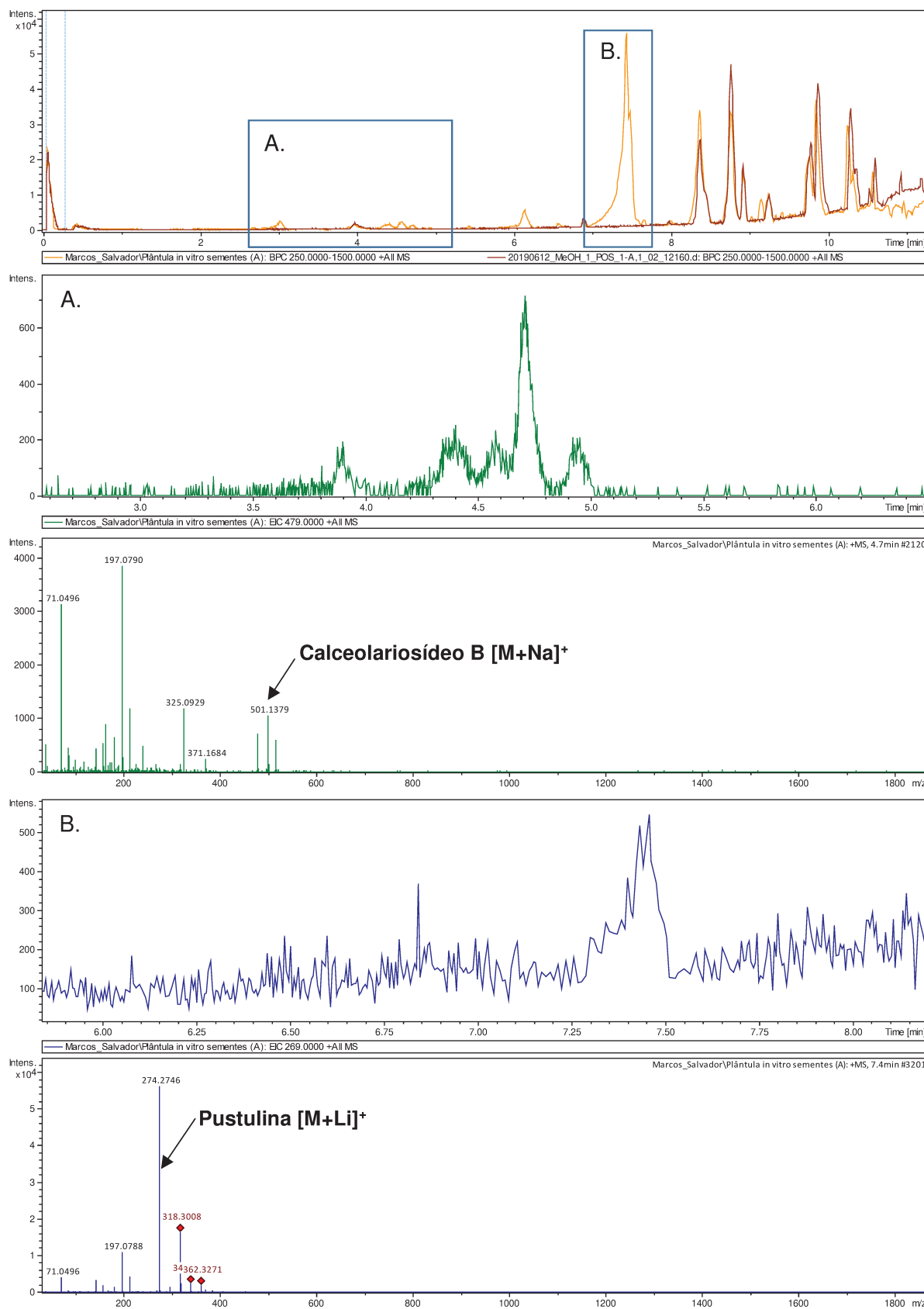


Figura 25. Cromatogramas e espectros (UHPLC/ESI-MS), modo íon positivo, do extrato metanólico plântula *in vitro* obtida por semente: (A) ampliação região $m/z = 478$ correspondente ao Calceolariosídeo B; e (B) ampliação região $m/z = 268$ correspondente à Pustulina. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

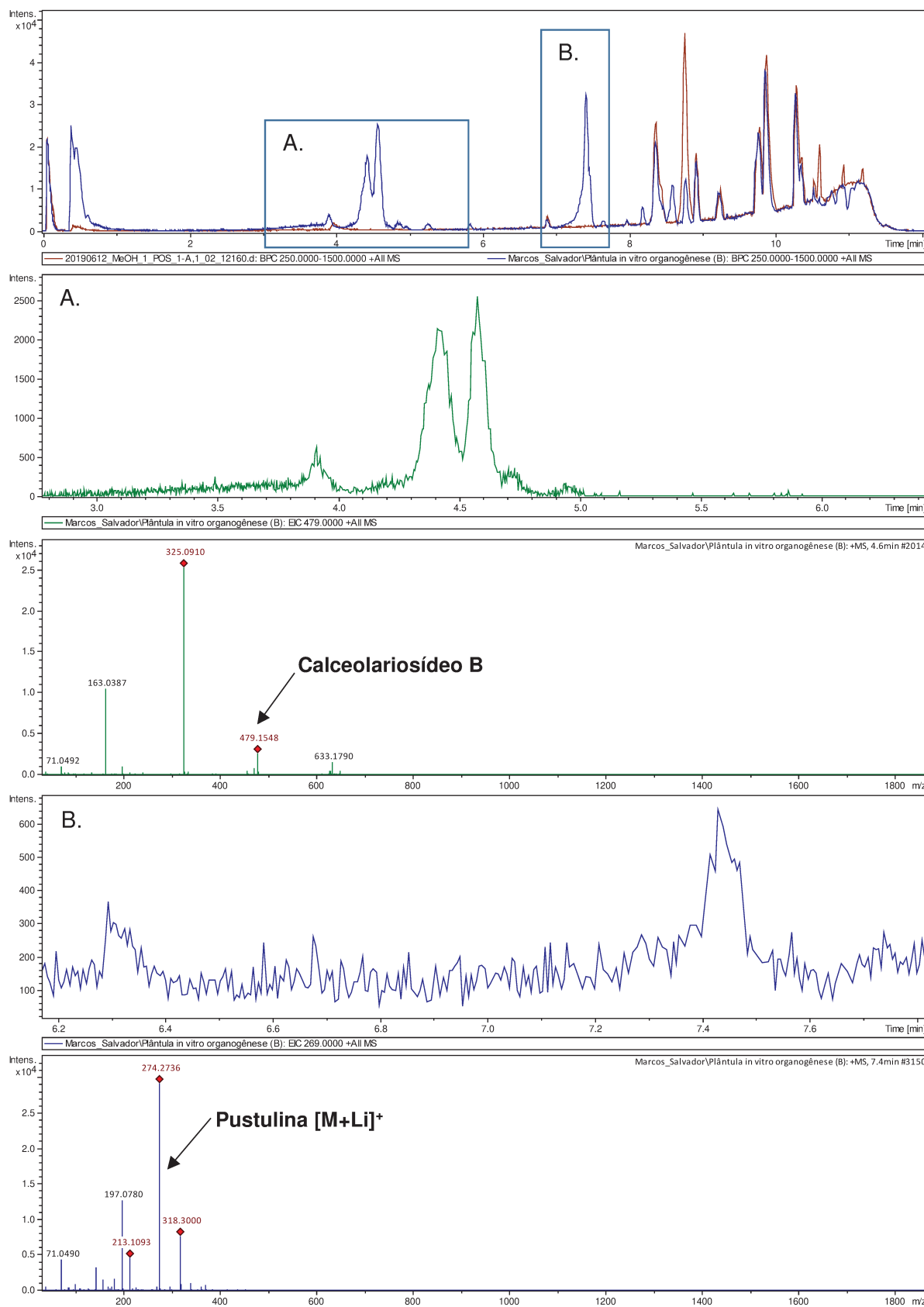


Figura 26. Cromatogramas e espectros (UHPLC/ESI-MS), modo íon positivo, do extrato metanólico plântula *in vitro* obtida por organogênese: (A) ampliação região $m/z = 478$ correspondente ao Calceolariosídeo B; e (B) ampliação região $m/z = 268$ correspondente à Pustulina. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

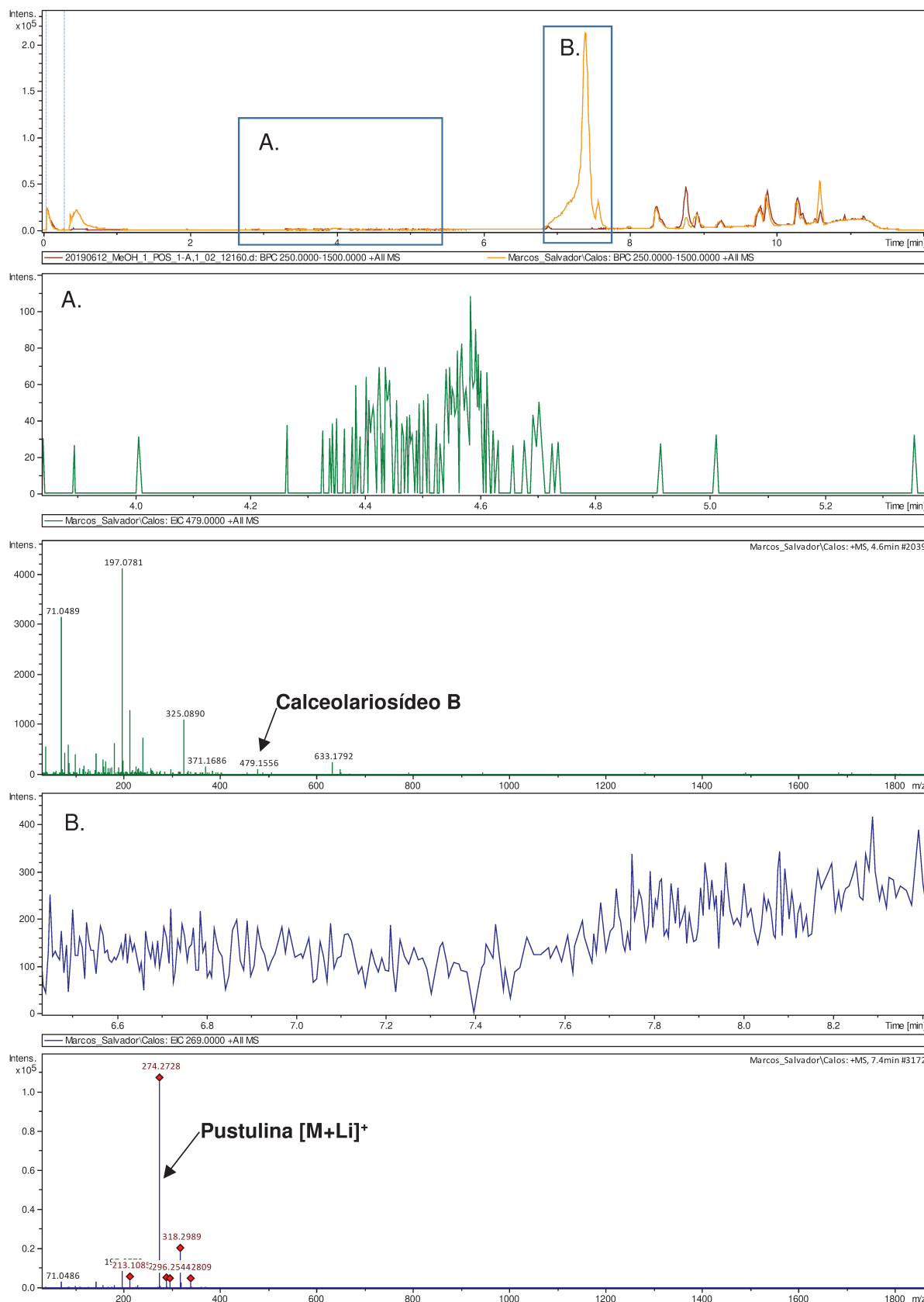


Figura 27. Cromatogramas e espectros (UHPLC/ESI-MS), modo íon positivo, do extrato metanólico de calos de *Sinningia speciosa*: (A) ampliação região m/z = 478 correspondente ao Calceolariosídeo B; e (B) ampliação região m/z = 268 correspondente à Pustulina. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

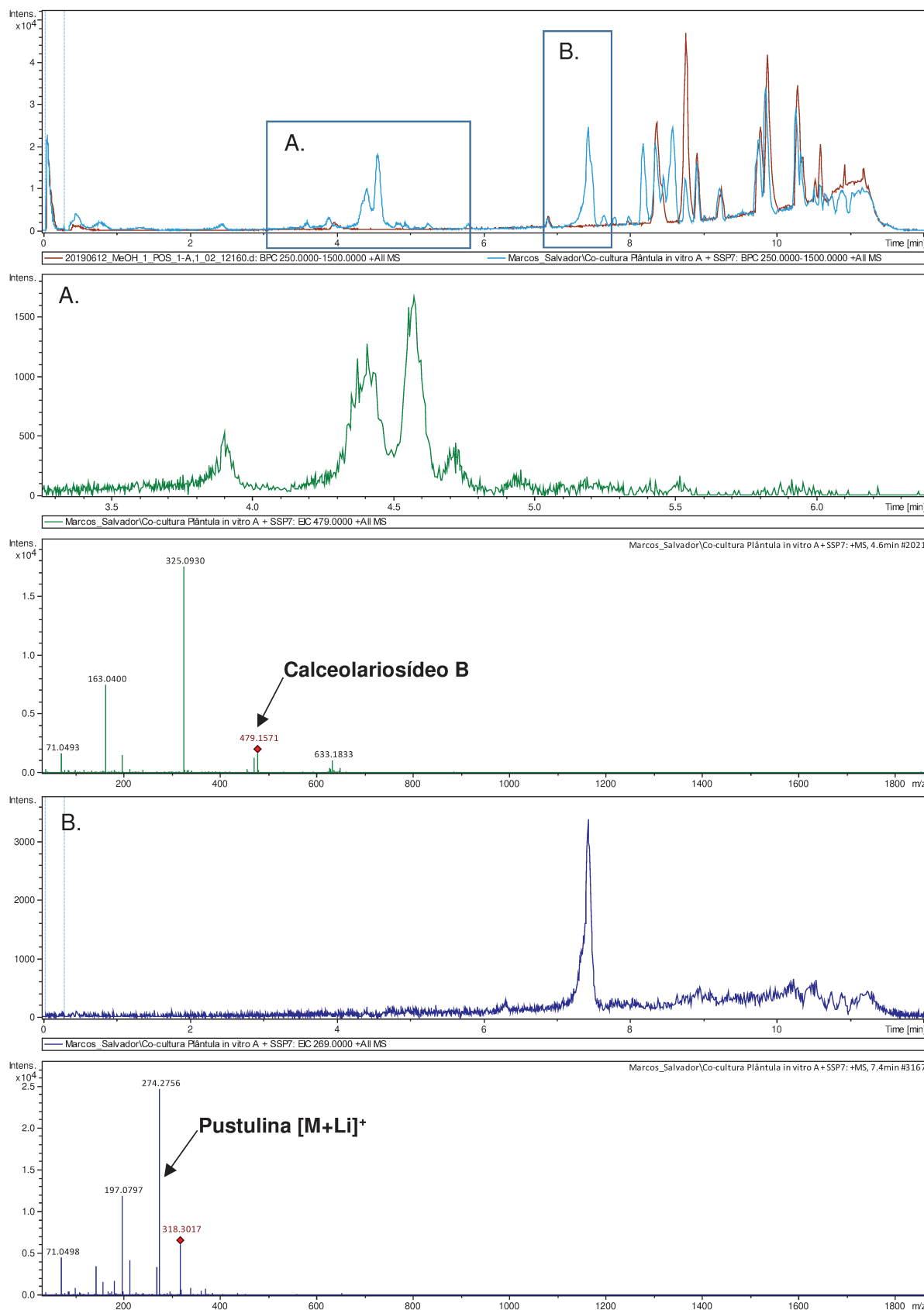


Figura 28. Cromatogramas e espectros (UHPLC/ESI-MS), modo íon positivo, do extrato metanólico da co-cultura plântula *in vitro* obtida por semente com *Geosmithia* sp. SSP7: (A) ampliação região m/z = 478 correspondente ao Calceolariosídeo B; e (B) ampliação região m/z = 268 correspondente à Pustulina. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

Para o estudo comparativo por desreplicação das diferentes amostras dos extratos de *S. speciosa in natura*, *in vitro*, calos e em co-cultura com *Geosmithia* sp. SSP7, observaram-se diferenças quanto à presença das substâncias identificadas. Para as amostras da plântula *in vitro* obtida por semente e em co-cultura, estas substâncias ionizaram bem nos dois modos positivo/negativo, quando comparadas aos extratos da plântula *in vitro* obtida por organogênese e dos calos. Além disso, o poder de resolução das análises através dos estudos cromatográficos de baixa e alta resolução, permitiram evidenciar que ambas substâncias são produzidas nas diferentes amostras avaliadas, variando em quantidade, como será descrito a seguir. No caso da comparação dos perfis cromatográficos dos extratos por alta resolução, observou-se que alguns íons foram detectados na forma de adutos, tais como aduto com sódio $[M+Na]^+$ de massa 23 g/mol (Figura 25-A) e aduto com lítio $[M+Li]^+$ 6 g/mol (Figura 24-B, 25-B, 26-B, 27-B e 28-B). Observou-se que na região do pico do Calceolariosídeo B detectada na maioria das amostras aparecem picos similares ou análogos que variam em m/z e no perfil de fragmentação (Figura 24-A, 26-A e 28-A), podendo corresponder a outros glicosídeos fenólicos que não puderam ser identificados.

4.6.2. Análise quantitativa por UHPLC/ESI-MS/MS

Após realizar a identificação do Calceolariosídeo B e da Pustulina (7-hidroxi-6-metoxi-tectoquinona) conforme descrito anteriormente, procedeu-se à análise quantitativa por UHPLC/ESI-MS/MS de alta resolução dessas substâncias nos extratos onde foram detectadas. A quantificação foi baseada em curvas analíticas para estas duas substâncias (seis concentrações entre 125,0 µg/mL e 3,90 µg/mL). A partir das curvas analíticas obtidas para cada uma destas substâncias (Apêndice 4 p. 96 – 97) foram estimadas as concentrações nos extratos testados (Tabela 3).

Tabela 3. Quantificação do Calceolariosídeo B e Pustulina nos extratos metanólicos de *Sinningia speciosa* (planta *in natura*, plântula *in vitro* obtida por semente e por organogênese e cultura de calos) e da co-cultura *S. speciosa*-*Geosmithia* sp. SSP7 por UHPLC/ESI-MS/MS.

Extratos metanólicos	Substância detectada e quantificada					
	Pustulina			Calceolariosídeo B		
	tR (min)	Íon (m/z) ESI-MS		tR (min)	Íon (m/z) ESI-MS	
		[M+H] ⁺ m/z	MS/MS m/z		[M+H] ⁺ m/z	MS/MS m/z
	7.4	269	30 eV: 269→141	4.7	479	30 eV: 479→325,197,71
Concentração (µg/mL)			Concentração (µg/mL)			
Planta <i>in natura</i>		42,7 ^a			64,2 ^a	
Plântula <i>in vitro</i> sementes		<7,81 ^b			30,4 ^b	
Plântula <i>in vitro</i> organogênese		<7,81 ^b			137,4 ^c	
Calos		<7,81 ^b			≤7,81 ^d	
Co-cultura sintética						
Plântula <i>in vitro</i> sementes +SSP7		41,3 ^a			66,8 ^e	

Dados expressos como medida do ensaio em duplicata. Os valores de concentração (µg/mL) são resultado da determinação da área sob a curva dos picos cromatográficos para cada amostra e produto da regressão lineal das amostras-padrão através de um modelo matemático com concentrações conhecidas. Letras minúsculas (a ≠ b ≠ c ≠ d ≠ e) indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras-testes, respectivamente, (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, p<0,05). Limite de Quantificação= 7,81 µg/mL, Limite de Detecção= 3,90 µg/mL. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

4.7. Atividades antioxidante, antimicrobiana e leishmanicida e triagem de citotoxicidade

4.7.1. Avaliação da capacidade antioxidante

Na Tabela 4, são apresentados os resultados da avaliação da capacidade antioxidante dos extratos metanólicos da *S. speciosa* e de *Geosmithia* sp. SSP7, assim como dos controles. Conforme mostra esta Tabela, estes dados variaram de 322 (co-cultura calo + SSP7) à 2638 (co-cultura plântula *in vitro* sementes + SSP7) µmol TE/g, sendo que o valor observado com plântula *in vitro* obtida por organogênese

foi estatisticamente igual à co-cultura *in vitro* sementes + SSP7 (2606,7 $\mu\text{mol TE/g}$). Segundo a literatura, no ensaio ORAC-FL, amostras com valor de capacidade antioxidante $\leq 800 \mu\text{mol TE/g}$ são consideradas inativas (Prior *et al.*, 2003; Salvador *et al.*, 2006).

Tabela 4. Resultados da avaliação da atividade ORAC-FL dos extratos metanólicos de *Sinningia speciosa* e de *Geosmithia* sp. SSP7.

Extrato e Controle		$\mu\text{mol TE/g}$ ou Trolox relativo TR	CV (%)
<i>S. speciosa</i>	Planta <i>in natura</i>	2288,6^a	7,27
	Plântula <i>in vitro</i> sementes	1640,0 ^b	3,50
	Plântula <i>in vitro</i> organogênese	2606,7^c	2,40
	Calos	784,1 ^d	11,3
<i>Geosmithia</i> sp. SSP7	CZP	1015,6 ^e	3,31
	MID	1697,6 ^b	0,93
	MS	643,0 ^d	6,15
Co-culturas sintéticas		Plântula <i>in vitro</i> sementes + SSP7	2638,0^c
		Calos + SSP7	322,0 ^f
Controles	Meios	Controle CZP	(-)
		Controle MID	54,33
		Controle MS	(-)
	Diluyente	DMSO	(-)
		Quercetina**	6,25 ^A
	Amostra de Referência	Catequina**	6,25 ^A
		Epicatequina**	6,25 ^A
		Isoquercitrina**	5,10 ^A
	Substância isoladas de <i>S. speciosa</i> (amostra-padrão)	Calceolariosídeo B**	2,90 ^B
		Pustulina**	(-)

Dados apresentados são valores médios de ensaios em triplicata, seguido do coeficiente de variação (CV) em %. Os resultados do ensaio ORAC-FL estão expressos em micromol de Trolox equivalente por grama de extrato em base seca, sendo considerado não ativo, valor $\leq 800 \mu\text{mol TE/g}$. **Controle positivo, com os resultados expressos em Trolox equivalente relativo (TR). Letras minúsculas (a≠b≠c≠d≠e≠f) e maiúsculas (A≠B) diferentes entre si indicam diferenças estatísticas entre as diferentes amostras-teste, respectivamente, dos extratos e dos controles positivos (*one way* ANOVA, seguida do teste de Tukey, $p < 0,05$). (-): sem atividade. Fonte: elaborado pelo autor (2019).

4.7.2. Atividade antimicrobiana e ensaio frente promastigotas de (*L.*) *L. amazonensis*

Todos os extratos metanólicos foram avaliados para a atividade antimicrobiana *in vitro* frente às cepas ATCC® de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *C.*

albicans previamente descritas e se mostraram inativas no *screening* inicial dentro do gradiente de concentração estabelecido (CIM >1,0 mg/mL).

Estes extratos também foram analisados no ensaio frente as promastigotas de (*L.*) *L. amazonensis* (PH8) e todas se mostraram inativas dentro do gradiente de concentração estabelecido (EC₅₀ >100 µg/mL).

4.7.3. Triagem de citotoxicidade

As médias das IC₅₀ dos extratos metanólicos de *S. speciosa* e de *Geosmithia* sp. SSP7 foram obtidas a partir da triagem de citotoxicidade *in vitro* sobre a viabilidade celular pelo método MTT e os resultados estão apresentados na Tabela 5. Os valores IC₅₀ obtidos variaram entre 37,7 µg/mL e >1000 µg/mL, sendo que a maioria dos extratos apresentou baixa citotoxicidade para a linhagem celular proveniente de fibroblasto de embrião de camundongo 3T3, com valores IC₅₀ >250 µg/mL. Adicionalmente, os resultados sugerem, para os extratos de *S.speciosa in natura* e plântula *in vitro* obtidas por sementes, um efeito de proliferação celular com estímulo do crescimento celular quando comparado com o controle da linhagem celular proveniente de fibroblasto de embrião de camundongo 3T3 sem tratamento .

Tabela 5. Resultados da triagem de citotoxicidade sobre a viabilidade celular na linhagem celular proveniente de fibroblasto de embrião de camundongo 3T3 dos extratos metanólicos de *S. speciosa* e de *Geosmithia* sp. SSP7

	Extrato	*IC₅₀ (µg/mL)	DP
<i>S. speciosa</i>	Planta <i>in natura</i>	850,4	0,701
	Plântula <i>in vitro</i> obtida por sementes	859,8	0,804
	Plântula <i>in vitro</i> obtida por organogênese	37,7	0,178
	Calos	567,8	0,096
<i>Geosmithia</i> sp. SSP7	CZP	337,2	0,208
	MID	>1000	2,900
	MS	>1000	0,509
Co-culturas sintéticas	Plântula <i>in vitro</i> sementes + SSP7	145,0	0,147
	Calos + SSP7	694,7	0,247

*Resultados da triagem estão expressos como média (n=3) em termos da concentração que inibe 50% da viabilidade celular (IC₅₀), seguido do desvio padrão (DP).

5. DISCUSSÃO

5.1. Culturas *in vitro* de *S. speciosa* (plântulas *in vitro* propagadas por sementes e por organogênese indireta e calos assépticos)

O processo de obtenção de plântulas *in vitro* a partir de sementes tem sido documentado em poucas espécies do gênero *Sinningia*, mas com resultados satisfatórios para algumas plantas estudadas (Scaramuzzi & Emerico, 1999). Em estudos realizados por Gomes & Shepherd (2000) com *S. allagophylla*, plântulas *in vitro* responderam favoravelmente às condições de cultivo.

O processo de regeneração *in vitro* de *S. speciosa* ou organogênese foi estudado por Chae, Kim & Park (2012) e Park *et al.* (2012), visando seu melhoramento genético. Nestes trabalhos foram utilizados fitorreguladores como o BAP em combinação com várias auxinas, como o ácido indolacético (AIA) e NAA, em altas concentrações, além do uso de outras substâncias como elicitores ou inibidores, como por exemplo aminoetoxivinilglicina (AVG), cloreto de cobalto, nitrato de prata, tiosulfato de prata e putrescina.

No presente estudo, os resultados das plântulas *in vitro* propagadas por organogênese indireta permitiram obter o cultivo *in vitro* de *S. speciosa* “grupo Fyfiana” empregando baixa concentração dos fitorreguladores BAP e ANA (1,0 mg/L de BAP e 0,2 mg/L de ANA). Estes resultados foram similares aos reportados por (Chae, Kim and Park, 2012; Park *et al.*, 2012), que obtiveram brotos após 6 semanas usando o meio MS em combinações de 2 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de ANA, e por (Silva *et al.*, 2003), que utilizaram somente 1 mg/L de BAP em plântulas *in vitro* em processo de aclimatização. Entretanto, estes dados diferiram de (Scaramuzzi, Apollonio & D’Emerico, 1999), que avaliaram combinações de BAP x AIA para explantes de *S. speciosa*, obtendo brotos carentes de raiz em quase 50% dos explantes avaliados.

Os achados supramencionados sugerem que o balanço dos fitorreguladores utilizados em nosso estudo incide sobre a cultura primária e a relação estabelecida de 5,0 BAP/ANA (citoquinina/auxina) favorece a indução de brotos de *S. speciosa*. Conforme (Flick, 1983), baixas concentrações de auxina (ANA) e uma alta concentração de citocinina (BAP) no meio de cultura resulta na indução da morfogênese de partes aéreas, produto da diferenciação do câmbio vascular por parte do BAP (Zhang *et al.*, 2016). Os resultados aqui encontrados também podem ser

influenciados por outros fatores, tais como o tipo de explante utilizado, a predisposição genética da planta e as condições de luminosidade, nutrientes no meio, entre outros (Efferth, 2019).

Técnicas de cultura de tecidos vegetais são aplicadas a espécies vegetais que produzem substâncias que podem ser exploradas na farmacologia. A manutenção de células desdiferenciadas pode trazer benefícios para a produção de metabólitos em grande escala, ainda que esse campo esteja sendo muito explorado (Efferth, 2019).

Até o momento não se descreveu nenhum procedimento no gênero *Sinningia* a partir do qual se obtivessem culturas celulares assépticas, embora na literatura a maioria dos estudos tenha como objetivo a cultura de tecidos vegetais como modelo de domesticação e genéticos em *S. speciosa* (Hasing *et al.*, 2019). Neste estudo, observou-se que uma baixa proporção entre BAP e 2,4-D (0,05 mg/L x 0,05 mg/L) permitiu manter, sob condições de cultura, calos assépticos de *S. speciosa*. Estes resultados contrastam com o efeito do 2,4-D na formação de calos descrito por (Nielsen, Poulsen & Larsen, 1991; Griga *et al.*, 2001), que apoiam o fato dessa auxina no meio ser metabolizável para produzir a formação de brotos. Todavia, estes resultados podem ser influenciados por diferenças no tipo de material vegetal ou outras condições de cultura. Assim, considera-se este o primeiro estudo com vistas à obtenção de moléculas bioativas a partir de culturas *in vitro* dessa planta.

Em relação às oxidações observadas nas co-culturas sintéticas entre os calos de *S. speciosa* e *Geosmithia* sp. SSP7, uma das principais causas deve-se ao acúmulo de compostos fenólicos derivados do processo de degradação das células em função da pouca absorção de nutrientes e modificação no meio de cultura (Fick, 2007).

5.2. Caracterização morfológica, molecular e condições de crescimento de *Geosmithia* sp. SSP7

Na caracterização fenotípica do fungo endofítico SSP7, tanto as características macro quanto micromorfológicas estavam de acordo com as informações descritas na literatura específica para esse propósito. Este isolado foi inoculado em meios de cultura específicos para a descrição de caracteres morfológicos de suas colônias (CREA, CYA e MEA) e, de acordo com o aspecto daquelas crescidas em CYA e MEA, foi possível sugerir o gênero *Geosmithia* (Kolařík *et al.*, 2004; Kolarik, Kostovcik &

Pazoutova, 2007). Adicionalmente, foram realizados ensaios de crescimento à 5, 25 e 37 °C, sendo observado crescimento à 25°C e ausência à 5 e 37 °C, o que corroborou a suspeição do gênero (Kolařík & Kirkendall, 2010; Moubasher & Soliman, 2011; Mirzaee *et al.*, 2014; Pepori *et al.*, 2015).

De acordo com as análises filogenéticas da região ITS sequenciada existe uma alta porcentagem de similaridade com o clado grupo I para o gênero *Geosmithia* descrito por Kolarik, Kostovcik & Pazoutova, 2007; Kolařík & Kirkendall, 2010. Além disso, os resultados obtidos a partir das árvores filogenéticas de β -tubulina e EF-1 α quando comparados com a literatura que emprega a tipificação do ADN polimórfico aleatoriamente amplificado (RAPD) para o gênero *Geosmithia* (Kolařík *et al.*, 2004; Kolarik, Kostovcik & Pazoutova, 2007; Kolařík & Kirkendall, 2010), evidencia-se um agrupamento bem definido e reconhecível por unidades taxonômicas operacionais (OTU's) que permitem classificar o fungo endofítico SSP7 no clado grupo I, mas com baixa porcentagem de similaridade ≤ 70 % (Raja *et al.*, 2017).

Contudo, os resultados das análises filogenéticas a partir da região ITS indicam que a cepa SSP7 apresenta características próximas para algumas espécies do gênero *Geosmithia* como: *Geosmithia lavendula*, *Geosmithia rufescens*, *Geosmithia putterilli* e *Geosmithia pallida*, as quais também são classificadas dentro do clado I (Kolařík & Kirkendall, 2010). Portanto, o fungo endofítico SSP7 isolado das folhas de *S. speciosa* foi denominado de *Geosmithia* sp. SSP7, não sendo possível se chegar na identificação da espécie. Relatos da literatura reportam que a região ITS é considerada como um dos marcadores com maior probabilidade de identificações corretas para um grupo muito amplo de fungos amostrados, sendo adequada como *barcoding* fúngico (Raja *et al.*, 2017). É importante destacar que os isolados de *Geosmithia* reportados na literatura são ubíquos e estão associados à besouros (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), principalmente na Europa (Kolařík *et al.*, 2004; Kolarik, Kostovcik & Pazoutova, 2007; Pepori *et al.*, 2015). Segundo nosso conhecimento, este estudo descreve o primeiro registro de *Geosmithia* como fungo endofítico associado à família Gesneriaceae.

Em relação às condições de crescimento de *Geosmithia* sp. SSP7 nos meios de cultura líquidos testados no presente estudo, de acordo com os resultados obtidos, o meio MID favoreceu a obtenção de maior quantidade de biomassa. Esse meio de

cultura tem sido utilizado para os processos de otimização nutricional em cepas fúngicas como *Pestalotiopsis microspora*, *Podospora pauciseta*, *Phyllosticta spinarum*, *Lasiodiplodia theobromae*, entre outras, que biossintetizam metabólitos secundários como o taxol, sendo uma importante fontes de carbono e nitrogênio (Kathiravan & Sureban, 2009; El-Sayed *et al.*, 2018). Quanto à composição, o meio MID é considerado um meio de cultura menos complexo quando comparado aos demais meios avaliados. No entanto, em termos metabólicos, este meio favorece a eliminação de produtos intermediários, dispensáveis processo de purificação de metabólitos secundários (Strobel, 2018).

5.3. Perfil cromatográfico e análise qualitativa por UHPLC-ESI-MS

Baseados nos resultados dos perfis cromatográficos dos extratos metanólicos obtidos de folhas de *S. speciosa* foi possível verificar a presença do Calceolariosídeo B, glicosídeo fenólico amplamente descrito na família Gesneriaceae (Verdan & Stefanello, 2012) e detectado nas espécies *Episcia cupreata* (Hook.) Hemsl; *Nematanthus wettsteinii* (Fritsch.) H. E. Moore; *Chirita sinensis* Lindl.; *Aeschynanthus bracteatus*, *Chirita longgangensis* var. Hongyao; *Didymocarpus hedyotideus*, *Corallodiscus flabellatus*, *Paraboea glutinosa* (Wang *et al.*, 2011); *Sinningia hatschbachii* (Amorim *et al.*, 2017), *Sinningia canescens* e *Sinningia leucotricha* (Verdan *et al.*, 2017), *Sinningia aggregata* (Verdan *et al.*, 2010; Verdan, Souza de Mera, *et al.*, 2015), onde esta substância foi detectada nos tubérculos. No caso da Pustulina, essa antraquinona também já foi detectada em extratos de tubérculos de *S. aggregata* (Verdan, Souza de Mera, *et al.*, 2015). Estes achados evidenciam a presença destes constituintes químicos em outras espécies do gênero *Sinningia* e seu acúmulo em outros órgãos vegetais.

É importante mencionar que os etilciclohexanos e esteroides isolados das partes aéreas de *S. speciosa* em estudos prévios realizados por Verdan *et al.* (2009) não foram detectados nos extratos metanólicos aqui avaliados. Entre todas as substâncias descritas para *S. speciosa*, os esteroides como o sitosterol e estigmasterol têm sido isolados de muitas plantas até o momento e avaliados farmacologicamente, demonstrando grande potencial por suas propriedades biológicas (Kaur *et al.*, 2011; Shirishkumar, Ashwini & Prashant, 2014). Entretanto, este é o primeiro relato que descreve a ocorrência do Calceolariosídeo B e Pustulina para extratos metanólicos de

S. speciosa “grupo *fyfiana*” *in natura*, *in vitro*, calos, e em co-cultura sintéticas de plântulas com *Geosmithia* sp. SSP7.

5.4. Análise quantitativa por UHPLC/ESI-MS/MS de Calceolariosídeo B e Pustulina

O desenvolvimento de procedimentos biotecnológicos pode ser um recurso para melhorar a produção *in vitro* de metabólitos secundários de plantas (Matkowski, 2008; Ludwig-Müller, 2015). Conforme mostrado pela Tabela 3, foi observado, no estudo quantitativo do extrato da plântula *in vitro* obtida por organogênese, que as condições de cultivo e o balanço de fitorreguladores utilizados favoreceram o aumento (planta *in natura* = 64,2 µg/mL x plântula *in vitro* propagada por organogênese = 137,4 µg/mL) da concentração do Calceolariosídeo B, corroborando o observado por Monfort *et al.* (2018), que descreveram que fitorreguladores como substâncias modificadoras podem ser empregados para melhorar a biossíntese de metabólitos *in vitro*.

Além disto, condições de luminosidade em espécies vegetais podem modificar as quantidades de seus metabólitos secundários biossintetizados (Irshad *et al.*, 2018; Niazian, 2019). Yang *et al.* (2018) e Efferth (2019) descreveram que, em condições *in vitro*, culturas com fotoperíodo podem ter seu conteúdo de substâncias fenólicas modulado. No presente estudo, existe uma diferença no teor do Calceolariosídeo B nos extratos provenientes de plântulas expostas à luz (planta *in natura* = 64,2 µg/mL; plântula *in vitro* propagada por sementes = 30,4 µg/mL) e com uso de fitorreguladores (plântula *in vitro* propagada por organogênese = 137,4 µg/mL) quando comparado àquele verificado em plantas cultivadas na ausência de luz, como as culturas de calos ($\leq 7,81$ µg/mL). Assim, a luminosidade, entre outros fatores, modulou positivamente a concentração deste glicosídeo fenólico. Em relação à co-cultura sintética *S. speciosa*-*Geosmithia* sp. SSP7, a análise quantitativa do extrato metanólico revelou aumento do teor do Calceolariosídeo B e Pustulina com valores próximos dos observados para esses metabólitos secundários encontrados no extrato da planta *in natura*. Os bioestimuladores vegetais constituem um grupo de substâncias e/ou micro-organismos que podem contribuir para melhorar o desenvolvimento vegetal (Mustafavi *et al.*, 2018).

5.5. Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana, leishmanicida e da citotoxicidade

Nas últimas décadas, existe uma busca crescente por compostos capazes de reverter o estresse oxidativo. No que diz respeito aos resultados obtidos conforme à Tabela 4, esses sugerem que os extratos da planta *S. speciosa in natura* e plântula obtida *in vitro* apresentaram considerável capacidade antioxidante, variando na plântula *in vitro* de acordo com sua origem (obtida por sementes ou por organogênese). Os extratos metanólicos de *Geosmithia* sp. SSP7 em CZP (1015,6 $\mu\text{mol TE/g}$) e MID (1697,6 $\mu\text{mol TE/g}$) foram ativos, com valores de capacidade antioxidante superiores a 800 $\mu\text{mol TE/g}$ de extrato em base seca, não sendo verificada atividade para o extrato desse fungo cultivado em MS, nem para os extratos metanólicos dos controles desses meios de cultura. Por outro lado, o extrato da co-cultura sintética plântula *in vitro* oriunda de sementes + *Geosmithia* sp. SSP7 em MS apresentou considerável capacidade antioxidante, com valor superior ao da plântula *in vitro* obtida de sementes e ao dos extratos desse fungo endofítico nos três meios de cultura estudados, o que sugere que essa associação fungo-planta é favorável para esse aumento da capacidade antioxidante. Segundo Salvador *et al.* (2006) e Prior *et al.* (2003) amostras com valor de capacidade antioxidante $\geq 800 \mu\text{mol TE/g}$ são consideradas ativas. É interessante destacar que plantas *in vitro* são uma importante fonte de metabólitos bioacumulados. Curiosamente, existe uma complexidade nos mecanismos dos processos antioxidantes. Portanto, nos processos de busca de novos metabólitos recomenda-se ensaios que avaliam o poder antioxidante dos extratos ou substâncias em estudo (Matkowski, 2008).

De modo especial, as diferenças na capacidade antioxidante dos extratos de calos em relação às outras amostras da planta provavelmente ocorreram em virtude da necessidade de otimização do processo de biossíntese, influenciado por fatores ambientais e nutricionais como a exposição à luz, que por sua vez se correlaciona com a concentração do Calceolariosídeo B, que pode ser o responsável pela capacidade antioxidante. Estruturalmente, a presença de várias hidroxilas fenólicas confere à substância uma forte atividade antioxidante, porém, nos extratos de calos essa capacidade foi baixa. Segundo Matkowski (2008), também existem alguns casos em que o desenvolvimento do tecido completo é útil para produzir uma quantidade

considerável dos metabólitos secundários, sobretudo se a cultura celular indiferenciada não acumula compostos antioxidantes.

Outro aspecto a ser considerado é a presença dos fitorreguladores como fator para a otimização dos metabólitos (Matkowski, 2008), como é o caso da plântula *in vitro* propagada por organogênese empregando diferentes concentrações de BAP e ANA. Inicialmente, foram investigadas diferentes concentrações destes fitorreguladores para se estabelecer a melhor combinação de auxina e citocinina. Essa etapa é essencial para a estimulação das rotas metabólicas, o que pode ser observado na Tabela 4 e comprovado por meio do aumento da concentração do Calceolariosídeo B para este extrato, como mostra a Tabela 3. Alguns autores como (Bahmankar *et al.*, 2017; Salehi, Moieni & Safaie, 2017) sugerem que a organogênese indireta induz variações podendo, portanto, resultar em uma melhora no perfil metabólico das plantas.

Sob a ótica microbiológica, os resultados da atividade antimicrobiana e leishmanicida sugerem que será necessário avaliar os extratos metanólicos testados em concentrações maiores que 1,0 mg/mL para a atividade antimicrobiana e superiores aos valores de EC₅₀ obtidos frente aos promastigotas de *L. amazonensis* (PH8). Vale ressaltar que extratos de plantas são misturas complexas onde outras moléculas presentes podem atuar sinergicamente, mas também como antagonistas (Yunes, Pedrosa & Filho, 2001). Para o gênero *Sinningia* existem relatos na literatura onde foram avaliados extratos e substâncias isoladas contra várias cepas bacterianas de interesse clínico, assim como espécies de *Candida*, sendo principalmente inativas ou com baixo efeito biológico, como os trabalhos descritos para *S. hatshbachii* CIM > 100 µg/mL (Amorim *et al.*, 2017), *S. aggregata* CIM > 100 µg/mL (Verdan *et al.*, 2010) e *S. warmingii* CIM > 500 µg/mL (Winiewski *et al.*, 2017). No caso de substâncias bioativas isoladas de *Geosmithia*, uma 1-acetil-2,4,6,8-tetra-hidroxi-9,10-antraquinona isolada a partir do estudo fitoquímico em *G. lavendula*, revelou atividade frente a *S. aureus* ATCC® 33591 resistente à meticilina (MRSA) com IC₅₀ de 16,1 µg/mL (Malak *et al.*, 2013) e uma rodolamprometrina – 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahidroxiantraquinona frente a *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC® 25923 com CIM de 64 µg/mL (Lkováa *et al.*, 2009). Também em bioensaios realizados por Malak *et al.* (2014), extratos de acetato de etila e metabólitos isolados mostraram-se ativos contra *Leishmania donovani* com valores de IC₅₀ entre 3,3 e 9,2 µM.

Por outro lado, após análise dos resultados obtidos na avaliação *in vitro* do efeito dos extratos metanólicos na viabilidade celular da linhagem celular proveniente de fibroblasto de embrião de camundongo - 3T3, foram considerados citotóxicos os extratos com $IC_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$ (Oturan et al., 2017). Os extratos provenientes de plântulas *in vitro* por organogênese e em co-cultura sintética plântula *in vitro* sementes + SSP7 apresentaram efeito citotóxico para esta linhagem celular. Efeito contrário foi observado para os extratos da planta *in natura* e plântula *in vitro* obtida por sementes, que evidenciaram um estímulo no crescimento da população celular, o que sugere efeito positivo na proliferação celular. Estes efeitos podem estar correlacionados com o teor das substâncias presentes nestes extratos e efeitos antagônicos e sinérgicos de seus constituintes.

Com este estudo multidisciplinar foi possível observar o potencial de *S. speciosa* “grupo Fyfiana” (planta *in natura*, plântula *in vitro* e cultura de calos) e de *Geosmithia* sp. SSP7, obtido de suas folhas, na modulação da biossíntese de moléculas nessas matrizes biológicas, com destaque para o Calceolariosídeo B, que mostrou elevada capacidade antioxidante e seu possível efeito citotóxico nos extratos onde seu teor foi maior.

6. CONCLUSÕES

Com este estudo foi possível concluir que:

- Plântulas *in vitro* foram obtidas tanto de sementes quanto por via organogênese indireta em meio MS suplementado com fitorreguladores BAP 1,0 mg/L x ANA 0,2 mg/L, resultando em uma alta eficiência de regeneração após 4 semanas. Os calos foram obtidos a partir de um balanço relativamente baixo em concentração (0,05 mg/L) de BAP e de 2,4-D;
- A caracterização morfológica e molecular do isolado endofítico sugere que a cepa SSP7 pertence ao gênero *Geosmithia*. Quanto ao cultivo desse micro-organismo, em termos de produção de biomassa, o caldo MID foi o que melhor favoreceu o crescimento fúngico. Porém, a maior quantidade de extrato metanólico em massa (mg) foi obtida a partir do cultivo no meio CZP;
- Os cromatogramas dos extratos metanólicos de *S. speciosa* obtidos por UHPLC/ESI-MS/MS, nos modos íon negativo e íon positivo, permitiram observar similaridade qualitativa no perfil químico desses extratos das folhas e partes subterrâneas da planta *in natura*. Quando comparado o perfil cromatográfico do extrato metanólico de *S. speciosa* e de *Geosmithia* sp. SSP7, verificou-se a ocorrência de regiões com similaridade de picos cromatográficos e outras em que os picos diferem bastante. Ainda, pelas análises por UHPLC/ESI-MS/MS (em baixa e alta resolução) foram identificados e quantificados um glicosídeo fenólico-Calceolariosídeo B e uma antraquinona-Pustulina, substâncias que foram detectadas na maioria dos extratos provenientes da planta e em co-cultura sintética *in vitro* plântula ou cultura de calos – *Geosmithia* sp. SSP7, sendo os teores dessas substâncias variáveis em termos de concentração estimada nas amostras estudadas. Os resultados mostraram que a associação endófito-planta modula positivamente a concentração destas duas substâncias, a diferença das matrizes sem *Geosmithia* sp. SSP7, sugerindo um efeito positivo da associação simbiote na biossíntese.
- Os resultados da avaliação da atividade antioxidante sugerem que os extratos da planta *S. speciosa in natura* e obtida *in vitro* apresentaram considerável capacidade antioxidante. Os extratos metanólicos de *Geosmithia* sp. SSP7 crescido em CZP e MID mostraram valores de capacidade antioxidante superiores a 800 µmol de TE/g de extrato em base seca, não se verificando atividade para o extrato cultivado no meio

MS nem para os extratos metanólicos dos controles dos meios de cultura. Ainda, o extrato metanólico da co-cultura sintética plântulas *in vitro* oriunda de semente + *Geosmithia* sp. SSP7 em MS apresentou considerável capacidade antioxidante e com valor superior ao dos extratos desse fungo endofítico sozinho. A substância Calceolariosídeo B apresentou elevada capacidade antioxidante no ensaio ORAC-FL.

- As amostras de extratos foram consideradas inativas na avaliação da atividade antimicrobiana frente a bactérias, levedura e à promastigotas de *L. amazonenses* nas condições experimentais estudadas. Por outro lado, no caso da triagem de citotoxicidade sobre a viabilidade celular na linhagem celular proveniente de fibroblasto de embrião de camundongo 3T3, os resultados sugerem que a maioria das amostras de extratos não apresentam efeito citotóxico com valores de $IC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$. No entanto, as amostras de extratos metanólicos da planta *in natura* e da plântula *in vitro* obtida a partir de sementes, apresentaram efeito favorecendo a proliferação desta linhagem celular.

Assim, com este estudo multidisciplinar avaliou-se o potencial de *S. speciosa*, “grupo Fyfiana” (planta *in natura*, plântula *in vitro* e cultura de calos) e do fungo endofítico *Geosmithia* sp. SSP7 a ela associado na modulação da biossíntese de moléculas como o Calceolariosídeo B e a Pustulina. Verificou-se que fatores como a luminosidade e balanço de fitorreguladores nas etapas de cultivo, bem como o estímulo biológico por parte de *Geosmithia* sp. SSP7, impactaram positivamente no desenvolvimento das culturas da planta *in vitro*, no teor de Calceolariosídeo B e de Pustulina e na atividade antioxidante e a citotoxicidade dos extratos estudados.

7. PERSPECTIVAS

Este estudo abre perspectivas para trabalhos futuros com a continuidade de novas investigações tais como:

- Estudos sobre os efeitos da sazonalidade e de ciclos circadianos no metabolismo vegetal de substâncias de interesse farmacêutico ou químico;
- Detalhamento dos estudos de biotecnologia vegetal para a produção de moléculas bioativas, incluindo a avaliação da cinética de crescimento dos calos, com vistas à cultura de células em suspensão, além da implementação de um procedimento eficiente para a criopreservação das células vegetais;
- Estabelecimento de um procedimento fazendo uso de marcadores moleculares para determinar se a cepa SSP7 corresponde a uma nova espécie associada ao gênero *Geosmithia*;
- Detalhamento dos estudos de co-cultura sintética *S. speciosa*/*Geosmithia* sp. SSP7 e melhoramento da avaliação do potencial desse endófito como bioestimulante e no desenvolvimento vegetal.

REFERÊNCIAS

- Abdalla, M. A., Sulieman, S. and McGaw, L. J. (2017) 'Microbial communication: A significant approach for new leads', *South African Journal of Botany*, 113, pp. 461–470.
- Aly, A. H., Debbab, A. and Proksch, P. (2013) 'Fungal endophytes – secret producers of bioactive plant metabolites', *Pharmazie*, 68, pp. 499–505.
- Amorim, M. S. *et al.* (2017) 'Chemical Constituents of *Sinningia hatschbachii*', *Natural Product Communications*, 12(11), pp. 1763–1764.
- Araujo, A. O. DE and Chautems, A. (2015) 'A new species of *Sinningia* (Gesneriaceae) and additional floristic data from Serra dos Carajás, Pará, Brazil', *Phytotaxa*, 227(2), pp. 158–166.
- Bahmankar, M. *et al.* (2017) 'Chemical compositions, somatic embryogenesis, and somaclonal variation in Cumin', *Biomed Res Int.*, 2017, pp. 1–15.
- Bahuguna, A. *et al.* (2017) 'MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug', *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12, pp. 115–118.
- Barbosa, F. L. *et al.* (2013) 'Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and 8-methoxylapachenol from *Sinningia allagophylla* tubers', *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 113(1), pp. 1–7.
- Bone, R. E. and Atkins, H. J. (2013) 'Four new species of *Cyrtandra* (Gesneriaceae) from the latimojong mountains, south sulawesi', *Edinburgh Journal of Botany*, 70(3), pp. 455–468.
- Buzatto, C. R. and Singer, R. B. (2012) '*Sinningia lutea* (Gesneriaceae), a new species from Southern Brazil', *Brittonia*, 64(2), pp. 108–113.
- Carbone, I. and Kohn, L. (1999) 'A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes', *Mycologia*, pp. 553–556.
- Castellani, A. (1939) 'Viability of some pathogenic fungi in distilled water', *Tropical Medicine*, 42, pp. 225–226.
- Chae, S. C., Kim, H. H. and Park, S. U. (2012) 'Ethylene inhibitors enhance shoot organogenesis of gloxinia (*Sinningia speciosa*)', *The Scientific World Journal*, 2012, pp. 1–4.
- Chagas, F. O. *et al.* (2018) 'Chemical signaling involved in plant-microbe interactions', *Chemical Society Reviews*, 47(5), pp. 1652–1704.
- Chapla, V. M., Biasetto, C. R. and Araujo, A. (2013) 'Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais', *Rev. Virtual Quim.*, 5(3), pp. 421–437.
- Chautems, A. *et al.* (2010) 'Taxonomic revision of *Sinningia* Nees (Gesneriaceae) IV : six new species from Brazil and a long overlooked taxon', *Candollea*, 65(2), pp. 241–266.
- Chautems, A., Peixoto, M. and Rossini, J. (2015) 'A new species of *Sinningia* Nees (Gesneriaceae) from Espírito Santo and Rio de Janeiro states, Brazil', *Candollea*, 70(2), pp. 231–235.

- Clark, J. L. and Clavijo, L. (2017) '*Cremospermopsis galaxias* (Gesneriaceae), a new species from northwestern Colombia', *Phytotaxa*, 323(3), pp. 282–288.
- CLSI, C. A. L. S. I. (2012) 'Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically', in *Approved Standard - Ninth Edition. CLSI document M07-A9*. Wayne, PA.
- CLSI, C. A. L. S. I. (2014) 'Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing', in *Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24*. Wayne, PA.
- Dembitsky, V. (2005) 'Astonishing diversity of natural surfactants: 5. Biologically active glycosides of aromatic metabolites', *Lipids*, 40, pp. 869–900.
- Ding, C. hong *et al.* (2018) 'The improvement of bioactive secondary metabolites accumulation in *Rumex gmellini* Turcz through co-culture with endophytic fungi', *Brazilian Journal of Microbiology*. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 49(2), pp. 362–369.
- Efferth, T. (2019) 'Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures', *Engineering*. Chinese Academy of Engineering, 5(1), pp. 50–59.
- El-Najjar, N. *et al.* (2011) 'The chemical and biological activities of quinones : overview and implications in analytical detection', *Phytochem Rev*, 10, pp. 353–370.
- El-Sayed, A. S. A. *et al.* (2018) 'Induction of Taxol biosynthesis by *Aspergillus terreus*, endophyte of *Podocarpus gracilior* Pilger, upon intimate interaction with the plant endogenous microbes', *Process Biochemistry*. Elsevier, (April), pp. 1–10.
- Felsenstein, J. (1985) 'Confidence limits on phylogenies: An approach using the *bootstrap*.' pp. 783–791.
- Ferrara, M. A. (2006) 'Endophytic Fungi. Potential for the Production of Bioactive Substances', *Revista Fitos*, 02, pp. 73–79.
- Ferreira, G. E., Chautems, A. and Waechter, J. L. (2015) 'Taxonomy of *Sinningia* Nees (Gesneriaceae) in Rio Grande do Sul, southern Brazil', *Acta Botanica Brasilica*, 29(3), pp. 310–326.
- Ferreira, G. E., Waechter, J. L. and Chautems, A. (2013) '*Sinningia* × *vacariensis* (Gesneriaceae) from Southern Brazil, the first natural hybrid described for the genus', *Phytotaxa*, 119(1), pp. 45–50.
- Ferreira, G. E., Waechter, J. L. and Chautems, A. (2014) '*Sinningia ramboi* (Gesneriaceae), a New Species From South Brazil', *Systematic Botany*, 39(3), pp. 975–979.
- Fick, T. A. (2007) *Estabelecimento in vitro e propagação de Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (LOURO-PARDO). Universidade Federal de Santa Maria.
- Flick, C. E. (1983) 'Organogenesis', in Evans, D. *et al.* (eds) *Handbook of Plant Cell Culture, Volume 1: Techniques for Propagation and Breeding*. New York, USA: Macmillan Publishing Company, pp. 13–81.
- Flora do Brasil 2020 em construção (2019) *Flora do Brasil 2020, Sinningia Nees*. Available at: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB7879> (Accessed: 10 December 2019).
- Freire, das C. O. F., Vasconcelos, F. R. and Coutinho, B. de L. I. (2014) 'Fungos

- endofíticos: Uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade', *Essentia, Sobral*, 16, pp. 61–102.
- Frisvad, J. C. (1981) 'Physiological Criteria and Mycotoxin Production as Aids in Identification of Common Asymmetric *Penicillia*', *Applied and Environmental Microbiology*, 41(3), pp. 568–579.
- Fu, G., Pang, H. and Wong, Y. H. (2008) 'Naturally occurring phenylethanoid glycosides: potential leads for new therapeutics current medicinal chemistry', *Schiphol*, 15(25), pp. 2592–2613.
- Gessler, N. N., Egorova, A. S. and Belozerskaya, T. A. (2013) 'Fungal Anthraquinones', *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(2), pp. 109–123.
- Glass, N. and Donaldson, G. (1995) 'Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes', *Applied and Environmental Microbiology*, 61, pp. 1323–1330.
- Gomes, R. a N. and Shepherd, S. L. K. (2000) 'Estudo de nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de cerrado', *Revista Brasileira de Botânica*, 23, pp. 153–159.
- Gonçalves, B., Bastos, E. and Hanna, S. (2017) 'Prospecção tecnológica de fungos endofíticos e aplicações na indústria farmacêutica', *Cad. Prospec*, 10, pp. 56–67.
- Griga, M. *et al.* (2001) 'Biotechnology', in Hedley, C. . (ed.) *Carbohydrates in Grain Legume Seeds Improving Nutritional Quality and Agronomic Characteristics*. Nickolay K. Norwich UK: CABI Publishing, pp. 146–207.
- Gunatilaka, A. A. L. (2006) 'Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity and implication of their occurrence.', *J. Nat. Prod.*, 69, pp. 509–526.
- Hall, T. (1999) 'BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT', *Nucleic Acids Symposium Series*, pp. 95–98.
- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R. and Quinn, R. J. (2015) 'The re emergence of natural products for drug discovery in the genomics era.', *Nature Reviews Drug Discovery*, 14, pp. 111–129.
- Hasing, T. *et al.* (2019) 'Extensive phenotypic diversity in the cultivated Florist's Gloxinia, *Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern, is derived from the domestication of a single founder population', *Plants, People, Planet*, 1(4), pp. 363–374.
- Hong, X. *et al.* (2018) '*Primulina cangwuensis* (Gesneriaceae), a new species from the karst limestone area in Guangxi, China', *Annales Botanici Fennici*, 55(1–3), pp. 37–42.
- Humber, R. A. (1997) 'Fungi — Preservation of Cultures', *Manual of Techniques in Insect Pathology*, pp. 269–280.
- Irshad, M. *et al.* (2018) 'Accumulation of anthocyanin in callus cultures of red-pod okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Hongjiao) in response to light and nitrogen levels. Plant Cell Tissue Organ', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134, pp. 29–39.
- Jensen, S. R. (1996) 'Caffeoyl Phenylethanoid glycosides in *Sanango racemosum* and in the Gesneriaceae', *Phytochem Rev*, 43(4), pp. 777–783.

- Jiao, J. *et al.* (2018) 'Remarkable enhancement of flavonoid production in a co-cultivation system of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures and immobilized *Aspergillus niger*', *Industrial Crops and Products*, 112, pp. 252–261.
- Kathiravan, G. and Sureban, S. M. (2009) 'Effect of taxol from *Pestalotiopsis mangiferae* on A549 cells-*in vitro* study.', *Journal of basic and clinical pharmacy*, 1(1), pp. 1–9.
- Kaur, N. *et al.* (2011) 'Stigmasterol: A comprehensive review', *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(9), pp. 2259–2265.
- Khong, D. T. and Judeh, Z. M. A. (2017) 'Short Synthesis of Phenylpropanoid Glycosides Calceolarioside B and Eutigoside-A', *Tetrahedron Letters*, pp. 109–111.
- Kolařík, M. *et al.* (2004) 'Morphological and molecular characterisation of *Geosmithia putterillii*, *G. pallida* comb. nov. and *G. flava* sp. nov., associated with subcorticolous insects', *Mycological Research*, 108(9), pp. 1053–1069.
- Kolařík, M. and Kirkendall, L. R. (2010) 'Evidence for a new lineage of primary ambrosia fungi in *Geosmithia* Pitt (Ascomycota: Hypocreales)', *Fungal Biology*, 114(8), pp. 676–689.
- Kolarik, M., Kostovcik, M. and Pazoutova, S. (2007) 'Host range and diversity of the genus *Geosmithia* (Ascomycota: Hypocreales) living in association with bark beetles in the Mediterranean area', *Mycological Research* III, 111, pp. 1298–1310.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) 'MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets', pp. 1870-1874.
- Kusari, S., Singh, S. and Jayabaskaran, C. (2014) 'Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: Hope versus hype', *Trends in Biotechnology*, 32(6), pp. 297–303.
- Larralde, C. (1996) '*Cinética de Crecimiento de hongos filamentosos*' *Morfometría de los micelios de A. niger y G. fujikuroi y su posible utilización en la predicción de la tasa específica de crecimiento*.
- Lee, J. C. *et al.* (1996) 'Torreyanic acid: A selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*', *Journal of Organic Chemistry*, 61(10), pp. 3232–3233.
- Li, S. *et al.* (2018) '*Hemiboea suiyangensis* (Gesneriaceae): A new species from Guizhou, China', *PhytoKeys*, 106(99), pp. 99–106.
- Lim, C. L., Kiew, R. and Haron, N. W. (2013) '*Codonoboea oreophila* (Gesneriaceae), a new species from Peninsular Malaysia', *Blumea: Journal of Plant Taxonomy and Plant Geography*, 58(1), pp. 68–70.
- Lindroth, R. L. and Pajutee, M. S. (1987) 'Chemical analysis of phenolic glycosides: Art, Facts, and Artifacts', *Oecologia*, 74, pp. 144–148.
- Lkováa, E. S. T. O. D. Ů. *et al.* (2009) 'Hydroxylated Anthraquinones Produced by *Geosmithia* species', *Folia microbiologica*, 54(3), pp. 179–187.
- Lomba, L. A. *et al.* (2017) 'A Naphthoquinone from *Sinningia canescens* Inhibits Inflammation and Fever in Mice', *Inflammation*. Inflammation, 40(3), pp. 1051–1061.
- Mabberley D.J (2017) *Mabberley's Plant-Book*. 4th edn, *Mabberley's Plant-book-A Portable*

Dictionary of Plants, their Classification and Uses. 4th edn. Edited by C. U. Press.

- Malak, L. G. *et al.* (2013) 'New Anthraquinone Derivatives from *Geosmithia lavendula*', *Natural Product Communications*, 8(2), pp. 191–194.
- Malak, L. G. *et al.* (2014) 'Antileishmanial metabolites from *Geosmithia langdonii*', *Journal of Natural Products*, 77, pp. 1987–1991.
- Matkowski, A. (2008) 'Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - A review', *Biotechnology Advances*, 26(6), pp. 548–560.
- Middleton, D. *et al.* (2014) '*Billolivia*, a new genus of Gesneriaceae from Vietnam with five new species', *Phytotaxa*, 161(4), pp. 241–269.
- Mirzaee, M. R. *et al.* (2014) '*Geosmithia lavendula* , a new record for mycobiota of Iran', *Mycologia Iranica*, 1(2), pp. 121–122.
- Mishra, P. D. *et al.* (2013) 'Anti-inflammatory and anti-diabetic naphthoquinones from an endophytic fungus *Dendryphon nanum* (Nees) S. Hughes', *Indian Journal of chemistry*, 52B, pp. 565–567.
- Monfort, L. *et al.* (2018) 'Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*.' , *Ind Crop Prod*, 116, pp. 231–239.
- Mora, M. M. and Clark, J. L. (2016) 'Molecular Phylogeny of the Neotropical Genus *Paradrymonia* (Gesneriaceae), Reexamination of Generic Concepts and the Resurrection of *Trichodrymonia* and *Centrosolenia*', *Systematic Botany*, 41(1), pp. 82–104.
- Mosmann, T. (1983) 'Related Articles, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.', *J. Immunol. Methods*, 65, pp. 55–63.
- Moubasher, A. H. and Soliman, Z. (2011) 'Contribution to the mycobiota of Egypt *Geosmithia* Pitt with *G. lavendula*, a new record to Egypt', *Journal of Basic & Applied Mycology*, 2, pp. 91–94.
- Murashige, T. and Scoog, F. (1962) 'Murashige & Scoog 1962.pdf', *Physiologia plantarum*, 15, pp. 463–497.
- Mustafavi, S. *et al.* (2018) 'Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites.', *Acta Physiol Plant*, 40, p. 102.
- NCCLS, T. N. C. F. C. L. S. (2002) 'Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras', in *Norma Aprovada – 2a ed. NCCLS document M27-A2*. Wayne, PA.
- Niazian, M. (2019) 'Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants', *Planta*. Springer Berlin Heidelberg, 249(4), pp. 953–973.
- Nielsen, E., Temporiti, M. E. E. and Cella, R. (2019) 'Improvement of phytochemical production by plant cells and organ culture and by genetic engineering', *Plant Cell Reports*. Springer Berlin Heidelberg, 38(10), pp. 1199–1215.
- Nielsen, S. V. A., Poulsen, G. B. and Larsen, M. E. (1991) 'Regeneration of shoots from

- pea hypocotyl explants', *Physiologia Plantarum*, 82, pp. 99–102.
- O'Donnel, K. and Cigelnik, E. (1997) 'Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous.', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, pp. 103–116.
- Oturanel, C. *et al.* (2017) 'Cytotoxic, Antiproliferative and Apoptotic Effects of Perillyl Alcohol and Its Biotransformation Metabolite on A549 and HepG2 Cancer Cell Lines', *Anticancer Agents Med Chem.*, 17(9), pp. 1243–1250.
- Paiva, R. and Paiva, D. de O. P. (2001) 'Técnicas de estabelecimento *in vitro*', in Universitária/UFLA, G. (ed.) *Cultura de tecidos*. Centro de. Lavras, pp. 8–91.
- Park, E. H. *et al.* (2012) 'Improved shoot organogenesis of gloxinia (*Sinningia speciosa*) using silver nitrate and putrescine treatment', *Plant OMICS*, 5(1), pp. 6–9.
- Pepori, A. L. *et al.* (2015) 'Morphological and molecular characterisation of *Geosmithia* species on European elms', *Fungal Biology*, 119(11), pp. 1063–1074.
- 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), pp. 445–460.
- Pham, J. V. *et al.* (2019) 'A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics', *Frontiers in Microbiology*, 10, pp. 1–27.
- Phuong, V. X. *et al.* (2012) '*Raphiocarpus tamdaoensis* sp. nov. (Gesneriaceae) from Vietnam', *Nordic Journal of Botany*, 30(6), pp. 696–699.
- Pimenta, E. F. *et al.* (2010) 'Use of Experimental Design for the Optimization of the Production of New Secondary Metabolites by Two *Penicillium* Species.', *Jornal Natural Products*, 73, pp. 1821–1832.
- Pitt, J. I. (1981) 'The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*', *Mycologia*, 73(3), pp. 582–584.
- Prior, R. L. *et al.* (2003) 'Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL) of Plasma and Other Biological and Food Samples', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 3273–3279.
- Raja, H. A. *et al.* (2017) 'Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community', *Journal of Natural Products*, 80(3), pp. 756–770.
- Ramírez-Roa, A. and Cerros-Tlatilpa, R. (2018) 'First report of *Achimenes candida* (Gesneriaceae: Gloxiniinae) for the state of Morelos, Mexico', *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(4), pp. 351–355.
- Reyes-Martínez, A. *et al.* (2019) 'Callus from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers: a source of phenylethanoid glycosides with vasorelaxant activities', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 139, pp. 119–129.
- Riva, D. *et al.* (2012) 'Estudo químico de *Sinningia allagophylla* guiado por testes de atividade antiproliferativa', *Quimica Nova*, 35(5), pp. 974–977.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) 'The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.', pp. 406–425.

- Salehi, M., Moieni, A. and Safaie, N. (2017) 'A novel medium for enhancing callus growth of hazel (*Corylus avellana* L.)', *Sci. Rep.*, 7(15598), pp. 1–9.
- Salehi, M., Naghavi, M. R. and Bahmankar, M. (2019) 'A review of *Ferula* species: Biochemical characteristics, pharmaceutical and industrial applications, and suggestions for biotechnologists', *Industrial Crops and Products*, 139, p. 111511.
- Salvador, M. J. *et al.* (2006) 'Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Antioxidant Flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla', *Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen*, 61(c), pp. 19–25.
- Samson, R. A. *et al.* (2010) *Food and Indoor Fungi*. Utrecht, NL: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Scaramuzzi, F., Apollonio, G. and D'Emerico, S. (1999) 'Adventitious Regeneration from *Sinningia speciosa* leaf discs *in vitro* and stability of ploidy level in subcultures', *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35, pp. 217–221.
- Scharf, D. R. *et al.* (2016) 'Naphthochromenes and Related Constituents from the Tubers of *Sinningia allagophylla*', *Journal of Natural Products*, 79(4), pp. 792–798.
- Sharma, M., Kansal, R. and Dinesh, S. (2018) 'Endophytic Microorganisms: Their Role in Plant Growth and Crop Improvement', in Prasad, R., Gill, S., and Tuteja, N. (eds) *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, pp. 381–405.
- Shirishkumar, D. A., Ashwini, V. M. and Prashant, D. A. (2014) 'Pharmacological, nutritional, and analytical aspects of β -sitosterol: a review', *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 14(3), pp. 193–211.
- Silva, A. B. da *et al.* (2003) 'BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos', *Ciência e Agrotecnologia*, 27(2), pp. 255–260.
- Skog, L. E. and Clark, J. L. (2015) 'Novae Gesneriaceae Neotropicarum XIX: A third, new species of the elusive *Anetanthus* found in Guyana', *Phytotaxa*, 218(2), p. 177.
- Soares, A. S. *et al.* (2017) 'Naphthoquinones of *Sinningia reitzii* and Anti-inflammatory/Antinociceptive Activities of 8 - Hydroxydehydrodunnione', *Journal of Natural Products*, 80, pp. 1837–1843.
- Sommat, U. S. *et al.* (2008) 'Hydronaphthalenones and a Dihydroramulosin from the Endophytic Fungus PSU-N24', *Chem. Pharm. Bull.*, 56(12), pp. 1687–1690.
- Souza, G. V. *et al.* (2015) 'Antinociceptive Activity of the Ethanolic Extract, Fractions, and Aggregatin D Isolated from *Sinningia aggregata* Tubers', *PLoS ONE*, 10(2), pp. 1–22.
- Stefanello, M. É. A., Cervi, A. . and Wisniewski, J. (2005) 'Composição do óleo essencial de *Sinningia aggregata*', *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4), pp. 331–333.
- Strobel, G. (2018) 'The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise', *Journal of Fungi*, 4(57), pp. 2–19.
- Tamura, K., Nei, M. and Kumar, S. (2004) 'Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)', pp. 11030–11035.

- Thompson, J. D., Higgins, D. J. and Gibson, T. J. (1994) 'CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice', *Nucleic Acids Research*, pp. 4673–4680.
- Trisuwana, K. *et al.* (2010) 'Anthraquinone, Cyclopentanone, and Naphthoquinone Derivatives from the Sea Fan-Derived Fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135', *Journal of Natural Products*, 73, pp. 1507–1511.
- Tropicos® (2019) *Tropicos.org. Missouri Botanical Garden, Sinningia Nees*. Available at: <https://www.tropicos.org/Name/40000575> (Accessed: 10 December 2019).
- Verdan, M. H. *et al.* (2009) 'Anthraquinones and ethylcyclohexane derivatives from *Sinningia speciosa* "Fyfiana"', *Biochemical Systematics and Ecology*. Elsevier Ltd, 37, pp. 40–42.
- Verdan, M. H. *et al.* (2010) 'Lactones and quinones from the tubers of *Sinningia aggregata*', *Journal of Natural Products*, 73(8), pp. 1434–1437.
- Verdan, M. H. *et al.* (2013) 'Leucotrichoic acid, a novel sesquiterpene from *Sinningia leucotricha* (Gesneriaceae)', *Tetrahedron Letters*, 54(35), pp. 4735–4737.
- Verdan, M. H. *et al.* (2014) 'Chemical Constituents from *Sinningia canescens* and *S. warmingii*', *Natural Product Communications*, 9, pp. 1535–1537.
- Verdan, M. H., Koolen, H. H. F., *et al.* (2015) 'A New Naphthoquinone from *Sinningia leucotricha* (Gesneriaceae)', *Natural Product Communications*, 10(4), pp. 625–626.
- Verdan, M. H., Souza de Mera, L., *et al.* (2015) 'Two New Hydronaphthoquinones from *Sinningia aggregata* (Gesneriaceae) and Cytotoxic Activity of Aggregatin D', *Chemistry and Biodiversity*, 12, pp. 148–152.
- Verdan, M. H. *et al.* (2017) 'Further chemical constituents from *Sinningia canescens* and *S. leucotricha* (Gesneriaceae)', *Phytochemistry Letters*, 22, pp. 205–209.
- Verdan, M. H. and Stefanello, M. É. A. (2012) 'Secondary metabolites and biological properties of Gesneriaceae species.', *Chemistry & biodiversity*, 9, pp. 2701–31.
- Vinale, F. *et al.* (2017) 'Co-Culture of Plant Beneficial Microbes as Source of Bioactive Metabolites', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–12.
- Visagie, C. M. *et al.* (2014) 'Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*', *Studies in Mycology*, 78, pp. 343–371.
- Wagner, W., Wagner, A. and Lorence, D. (2013) 'Revision of *Cyrtandra* (Gesneriaceae) in the Marquesas Islands', *PhytoKeys*, 30, pp. 33–64.
- Wang, X. *et al.* (2011) 'Five new phenylpropanoid glycosides from *Paraboea glutinosa* (Gesneriaceae)', *Journal of Natural Medicines*, 65(2), pp. 301–306.
- Wang, X. Q. *et al.* (2014) 'Chemical constituents of *Paraboea glutinosa*', *Chemistry of Natural Compounds*, 50(5), pp. 952–954.
- Weber, A., Clark, J. L. and Möller, M. (2013) 'A new formal classification of Gesneriaceae', *Selbyana*, 31(2), pp. 68–94.
- White, T. *et al.* (1990) 'Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes

- for phylogenetics.', in Innis, M. et al. (eds) *PCR Protocols: a guide to methods and applications.*, pp. 315–322.
- Winefield, C. S. *et al.* (2005) 'Investigation of the biosynthesis of 3-deoxyanthocyanins in *Sinningia cardinalis*', *Physiologia plantarum*, 124, pp. 419–430.
- Winiewski, V. *et al.* (2017) 'Warmingiins A and B, Two New Dimeric Naphthoquinone Derivatives from', *J. Braz. Chem. Soc.*, 28(4), pp. 598–602.
- Yan, L. *et al.* (2018) 'Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions', *Applied Microbiology and Biotechnology*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(15), pp. 6279–6298.
- Yang, L. *et al.* (2018) 'Response of plant secondary metabolites to environmental factors', *Molecules*, 23(4), pp. 1–26.
- Yi, Q. S. *et al.* (2017) 'The antibacterial properties of *Euphorbia tirucalli* stem extracts against dental caries-related bacteria.', *Medicine & Health*, 12, pp. 34–41.
- Yunes, R. A., Pedrosa, R. C. and Filho, V. C. (2001) 'Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil', *Química Nova*, 24(1), pp. 147–152.
- Zaitlin, D. (2012) 'Intraspecific diversity in *Sinningia speciosa* (Gesneriaceae : Sinningieae), and possible origins of the cultivated florist's gloxinia', *AoB Plants*, 39, pp. 1–17.
- Zaitlin, D. and Pierce, A. J. (2010) 'Nuclear DNA content in *Sinningia* (Gesneriaceae); intraspecific genome size variation and genome characterization in *S. speciosa*', *Genome*, 53, pp. 1066–1082.
- Zhang, J. *et al.* (2016) 'Somatic embryogenesis and direct as well as indirect organogenesis in *Lilium pumilum* DC. Fisch., an endangered ornamental and medicinal plant', *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Taylor & Francis, 80(10), pp. 1898–1906.
- Zhang, Y. *et al.* (2017) 'Anthraquinones from the saline-alkali plant endophytic fungus *Eurotium rubrum*', *The Journal of Antibiotics*, 70, pp. 1138–1141.
- Zhou, B. *et al.* (1998) 'Phenylethanoid Glycosides from *Digitalis purpurea* and *Penstemon linarioides* with PKC α -Inhibitory Activity', *J. Nat. Prod.*, 61, pp. 1410–1412.

APÊNDICES

Apêndice 1. Lista da composição dos meios de cultura, soluções indicadoras e tampões usados neste estudo.

Meios de cultura ou soluções	Composição g ou mL/L
Ágar Batata Dextrose PDA (Neogen)	Infusão de batata de 200g (4,0g), dextrose (20g), ágar (15g)
Ágar Creatina Açúcar (CREA, Frisvad 1981, Visage et al., 2014) pH: 8,0 ±0,2	Sacarose (30g), creatina (3g), K ₂ PO ₄ 7H ₂ O (1,6g), MgSO ₄ 7H ₂ O (0,5g), KCl (0,5g), FeSO ₄ 7H ₂ O (0,01g), solução de oligoelementos (1mL), púrpura de bromocresol (0,05g), ágar (20g), água destilada (1,0 L)
Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA, Pitt, 1979) pH: 6,2±0,2	Sacarose (30g), solução de Czapek concentrado (10 mL), extrato de levedura (5,0g), K ₂ HPO ₄ (1,0 g), solução de oligoelementos (1,0 mL), ágar (20 g), água destilada (1,0L)
Ágar Extrato de Malte (MEA, Samson et al., 2010) pH: 5,4±0,2	Extrato de malte (50 g), solução de oligoelementos (1,0 mL), água destilada (1,0 L), ágar (20 g)
Ágar Muller Hinton	Extrato de carne (2,0 g), caseína hidrolizada (17,5 g), amido (1,5 g), ágar (17,0 g), água destilada (1,0 L)
Czapek caldo pH: 6,8±0,2	Sacarose (30g), NaNO ₃ (2,0 g), KCl (0,5 g), MgSO ₄ 7H ₂ O (0,5g), FeSO ₄ 7H ₂ O (0,01g), K ₂ HPO ₄ (1,0 g), água destilada (1,0 L).
MID caldo (Strobel, 2018) pH: 8,0 ±0,2	Sacarose (30g), extrato de levedura (0,5g), soytone (1,0 g), solução MID 10x (CaNO ₃ (0,28 g), KNO ₃ (0,08 g), KCl (0,06 g), MgSO ₄ (0,36g), NaHPO ₄ (0,02 g), H ₃ BO ₃ (0,014g), MnSO ₄ (0,050 g), ZnSO ₄ (0,025g), KI (0,007g), tartarato de amonio (5,0 g), água destilada (1,0 L).
MS caldo (Murashige & Scoog, 1962) pH: 6,0±0,2	Sacarose (30g), inositol (0,1 g), solução de macronutrientes (100 mL), solução de micronutrientes (1,0 mL), solução de Fe-EDTA (5 mL), solução de vitaminas (1,0 mL), água destilada (1,0 L).

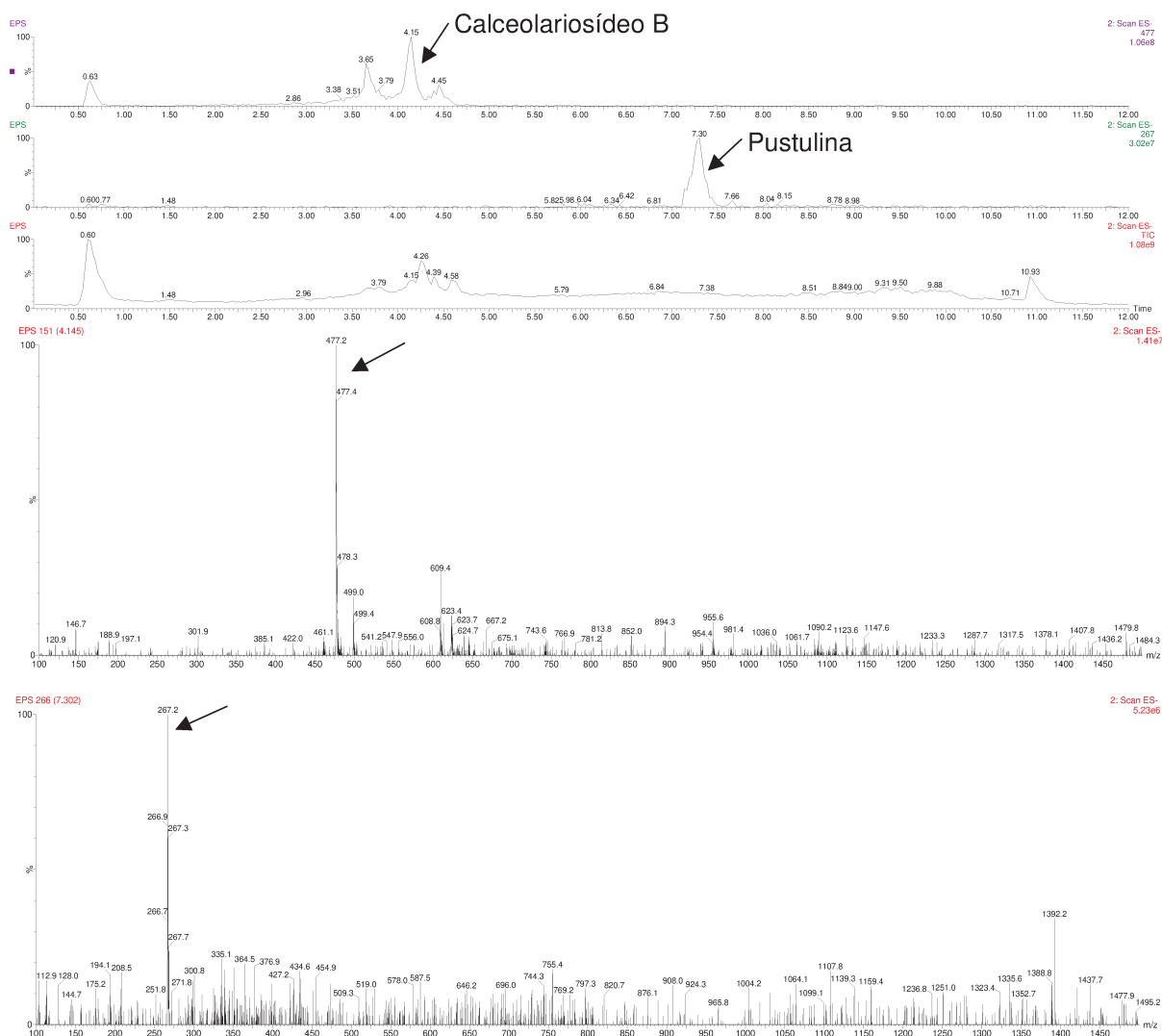
Meio de cultura MS (Murashige & Scoog, 1962) pH: 6,0±0,2	Sacarose (30g), inositol (0,1 g), phytigel (2,5 g), solução de macronutrientes (100 mL), solução de micronutrientes (1,0 mL), solução de Fe-EDTA (5 mL), solução de vitaminas (1,0 mL), carvão ativado* (0,5 g), água destilada (1,0 L). *Presente ou não dependendo da finalidade do meio.
Meio RPMI 1640 pH: 7,0±0,1	RPMI 1640 (10,40 g), Tampão MOPS (34,53 g), água destilada (1,0 L)
Meio M199 pH: 7,5 ± 0,2	Sais básicos, incluindo adenina, adenosina, hipoxantina, timina e vitaminas adicionais, sistema tampão de bicarbonato de sódio (2,2 g / L). Modo de preparo segundo o fabricante
Solução NT	Solução salina (0,9 %), Tween 80 (0,1%)
Solução MTT	Solução de 5mg/mL de MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), preparo segundo o fabricante.
Solução CTT	Solução de 5mg/mL de CTT, cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio, preparado segundo o fabricante.
Tampão fosfato ORAC pH: 7,05	KH ₂ PO ₄ (10,72 g), Na ₂ HPO ₄ (5,325g), água Mili-Q (1,0 L).

Apêndice 2. Lista das substâncias utilizadas como amostra-padrão para o estudo de desreplicação por UHPLC/ESI-MS/MS.

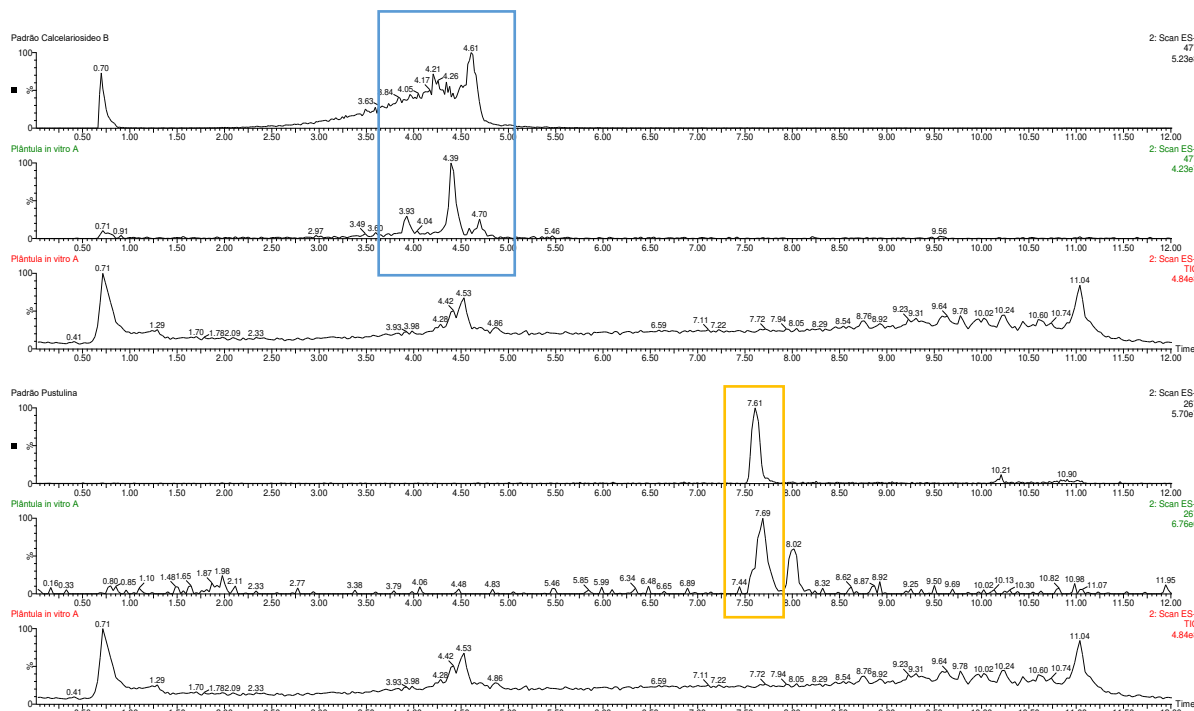
Substâncias padrão	Massa molar (g/mol)	Tempo de retenção (min)
7-hidroxi- α -duniona	258	7.1
α -duniona	241	7.6
Ácido betunílico	455	8.9
8-hidroxi-duniona	258	7.3
Cleroindicina C	156	1.87
Tirosol	138	3.17
Duniol	242	7.06
Calceolariosídeo B	478	4.61
1-hidroxi-tectoquinona	238	7.35
Tectoquinona	222	8.29
Agregatina D	325	8.39
7,8-metoxi- α -duniona	302	7.06
7,8-metoxi-duniona	302	6.8
7-hidroxi-tectoquinona	238	7.6
7-hidroxi-6-metoxi- α -duniona	288	6.9
1,6-hidroxi-tectoquinona	254	8.6
Cedrol + epicedrol	222	6.6
Cleroindicina B	158	0.65
Lapachenol	240	9.06
Halleridona	154	1.98
Pustulina	268	7.6

Apêndice 3. Cromatogramas do estudo por UHPLC/ESI-MS/MS dos extratos metanólicos de *Sinningia speciosa* (planta *in natura*, plântula *in vitro*, cultura de calos e co-culturas sintéticas planta-endófito), modo íon negativo; e de *Geosmithia* sp. SSP7 crescido nos meios CZP, MID e MS, modo íon negativo/positivo.

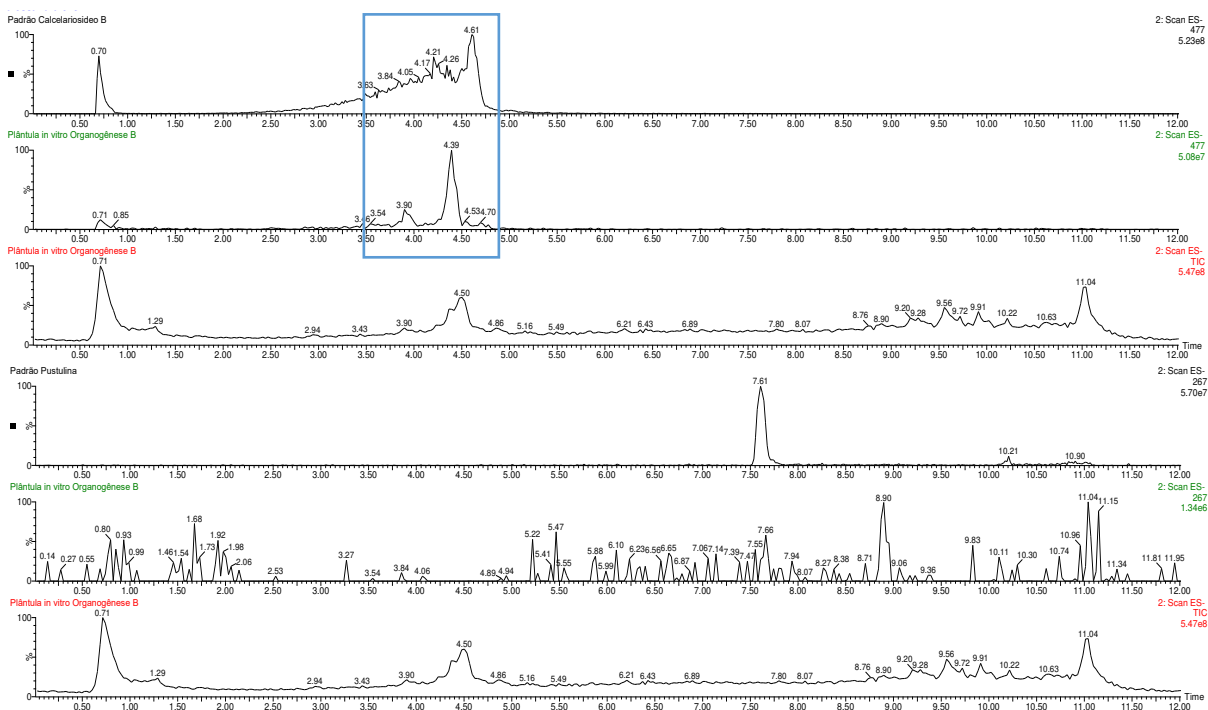
Apêndice 3.1. Cromatogramas e espectros amostra da planta *in natura*, modo íon negativo; m/z 477, correspondente ao Calceolariosídeo B e m/z 267, correspondente à pustulina.



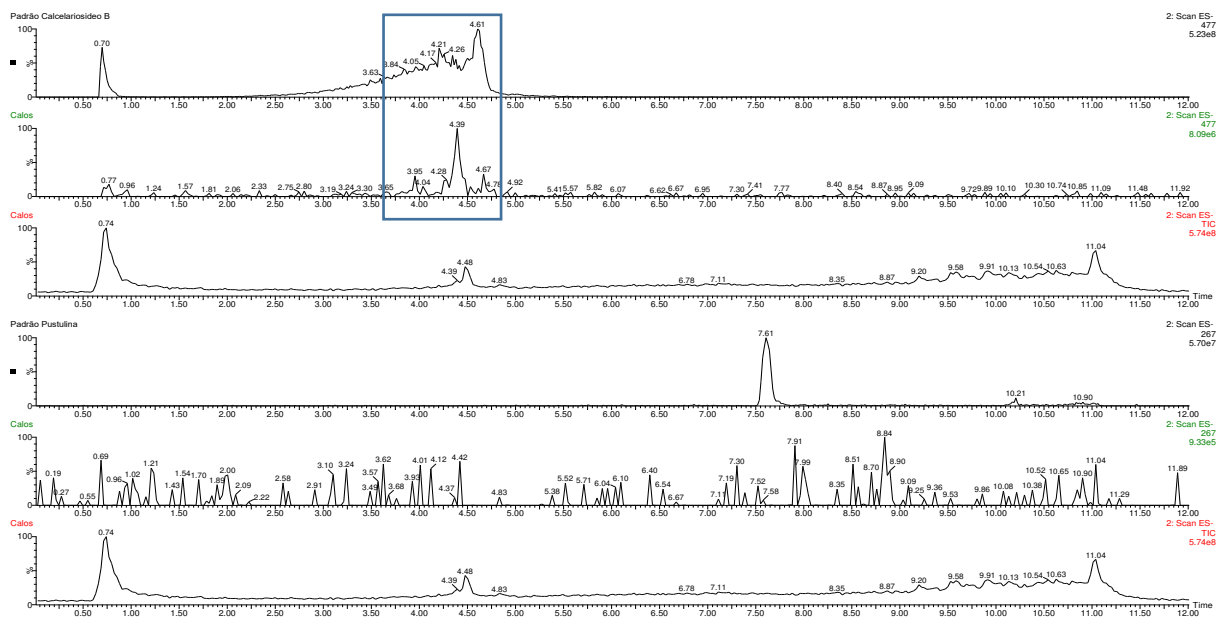
Apêndice 3.2. Cromatogramas do extrato da plântula *in vitro* obtida por semente, modo íon negativo. Íons m/z 477, correspondente ao Calceolariosídeo B (caixa azul) e m/z 267, correspondente à pustulina (caixa amarela) comparados com os padrões.



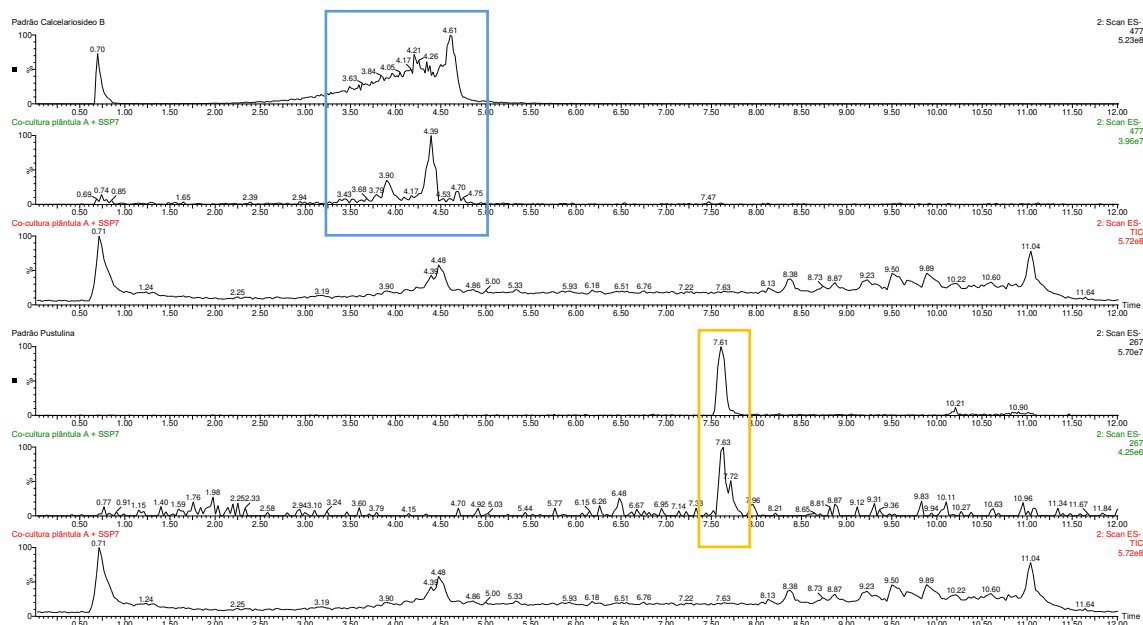
Apêndice 3.3. Cromatogramas do extrato da plântula *in vitro* organogênese, modo íon negativo. Íons m/z 477, correspondente ao Calceolariosídeo B (caixa azul) e m/z 267, correspondente à pustulina comparados com os padrões.



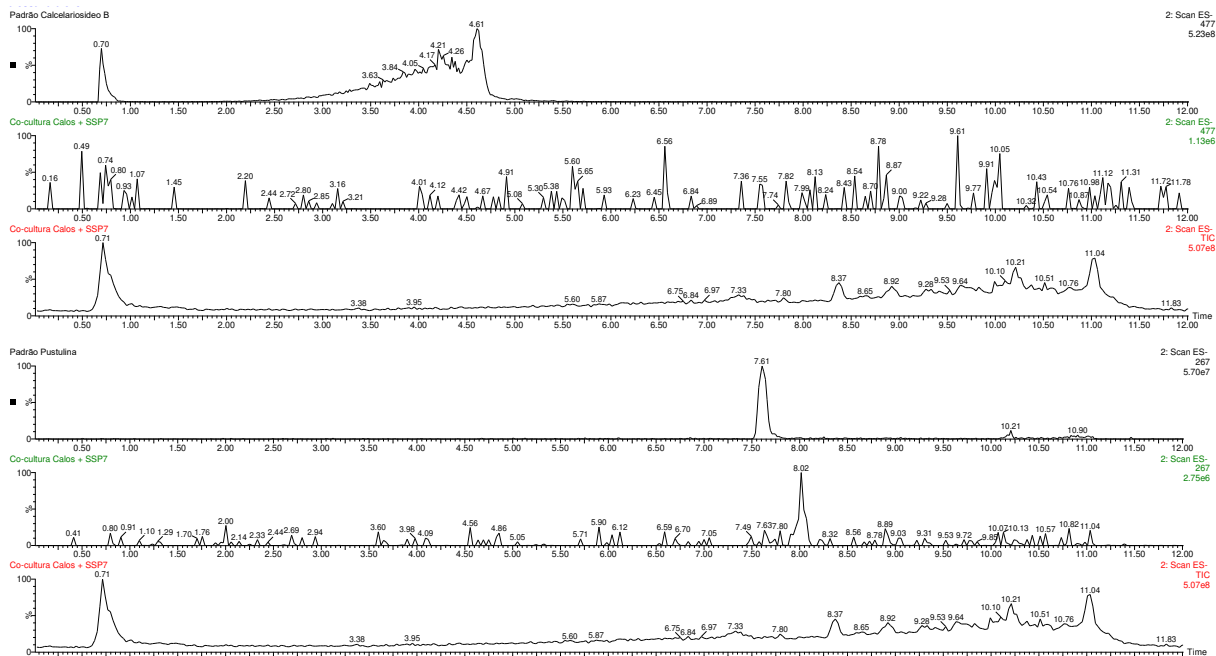
Apêndice 3.4. Cromatogramas do extrato dos calos, modo íon negativo. Íons m/z 477, correspondente ao Calceolariosídeo B e m/z 267, correspondente à pustulina comparados com os padrões.



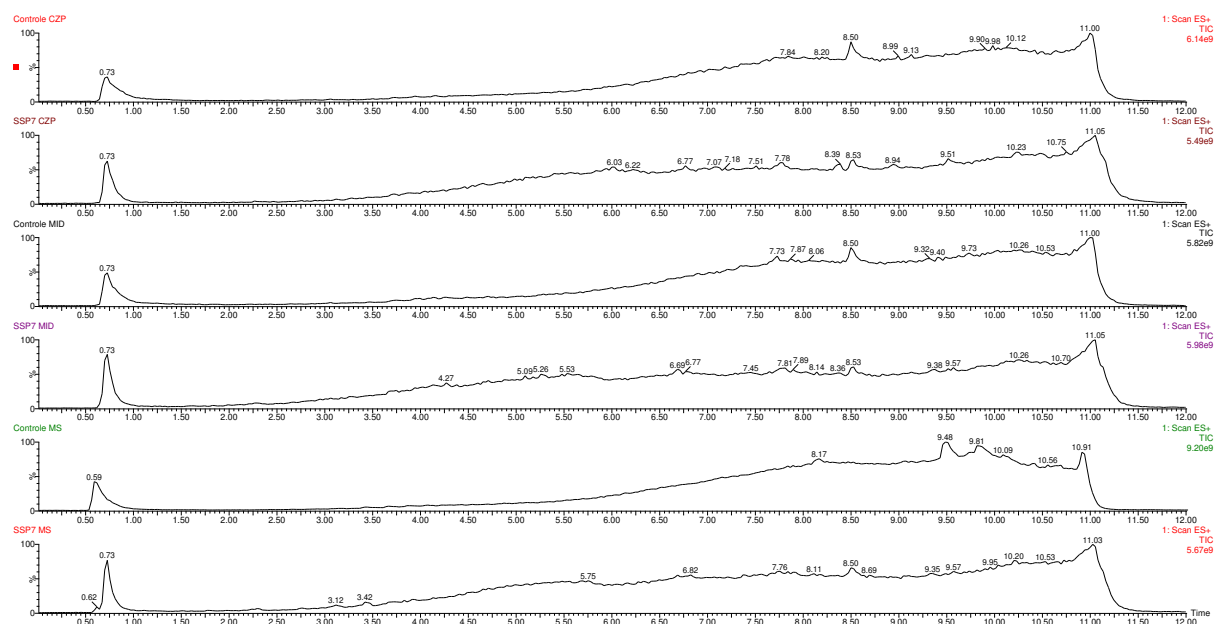
Apêndice 3.5. Cromatogramas do extrato da plântula *in vitro* obtida por semente em co-cultura com *Geosmithia* sp. SSP7, modo íon negativo. Íons m/z 477, correspondente ao Calceolariosídeo B (caixa azul) e m/z 267, correspondente à pustulina (caixa amarela) comparados com os padrões.



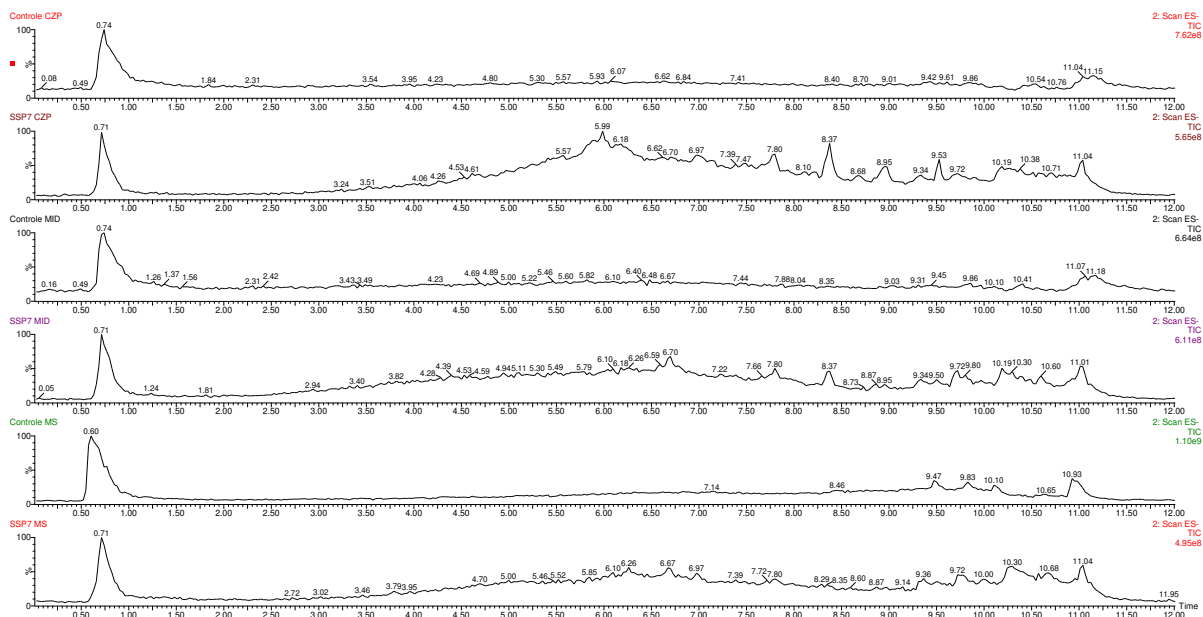
Apêndice 3.6. Cromatogramas dos extratos dos calos em co-cultura com *Geosmithia* sp. SSP7, modo íon negativo. Íons m/z 477, correspondente ao Calceolariosídeo B e m/z 267, correspondente à pustulina comparados com os padrões.



Apêndice 3.7. Cromatogramas dos extratos de *Geosmithia* sp. SSP7 crescido nos meios Czapek, MID e MS, modo íon positivo, comparados com os controles dos meios.



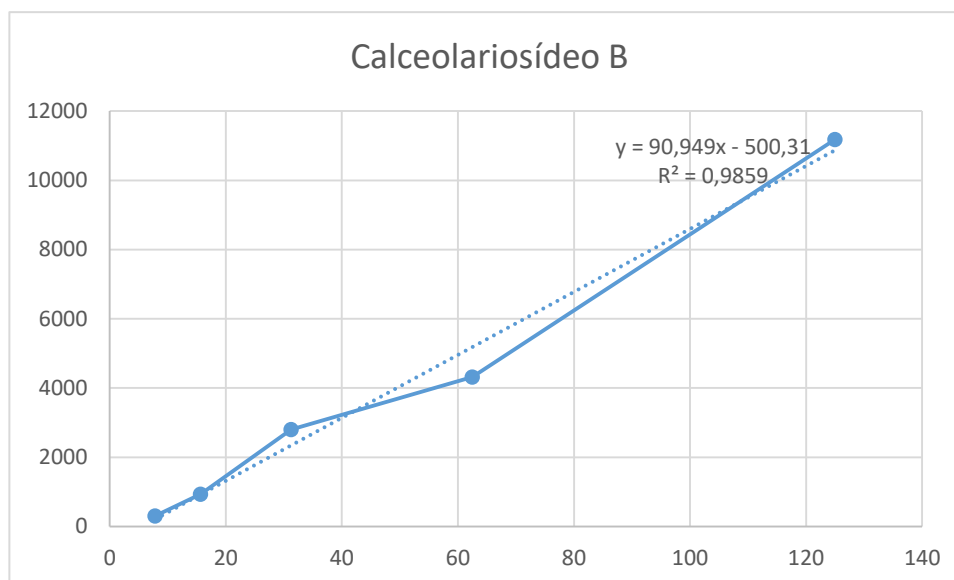
Apêndice 3.8. Cromatogramas do extrato de *Geosmithia* sp. SSP7 crescido nos meios Czapek, MID e MS, modo íon negativo, comparados com os controles dos meios.



Apêndice 4. Curva analítica para a quantificação por UHPLC/ESI-MS/MS das substâncias Calceolariosídeo B e Pustulina, detectadas em *Sinningia speciosa*.

Apêndice 4.1. Curva analítica e quantificação do Calceolariosídeo B

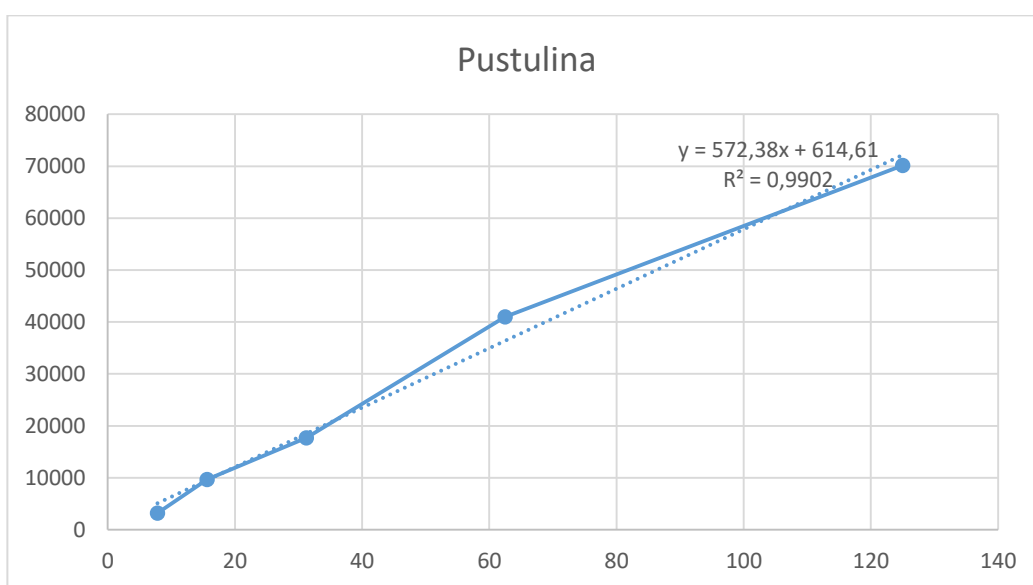
CURVA ANALÍTICA CALCEOLARIOSÍDEO B					
Amostra	CONCENTRAÇÃO	n=2		MEDIA	DP
		AREA 1	AREA 2		
0	250	-	-	-	-
1	125	11270,1	11096,2	11183,15	122,965869
2	62,5	3163,1	5462,3	4312,7	1625,77991
3	31,25	2678,4	2916,7	2797,55	168,503546
4	15,625	772,08	1088,6	930,34	223,813438
5	7,8125	291,4	311,46	301,43	14,184562



QUANTIFICAÇÃO DA SUBTÂNCIA NOS EXTRATOS (CALCEOLARIOSÍDEO B)						
CODIGO	NOME	n=2		MEDIA	DP	CONCENTRAÇÃO µg/mL
		AREA 1	AREA 2			
EOR15	Planta <i>in natura</i>	5525,7	5151,2	5338,45	264,81149	64,198177
EOR12	Plântula <i>in vitro</i> obtida por sementes	2330,6	2192,2	2261,4	97,863579	30,36547955
JAC3	Plântula <i>in vitro</i> obtida por organogênese	11730	12259,7	11994,85	374,55446	137,3864473
JAC4	Calos	-	-	-	-	≤7,81
JAC5	Co-cultura plântula <i>in vitro</i> sementes + SSP7	5733,5	5410,5	5572	228,39549	66,76609968

Apêndice 4.2. Curva analítica e quantificação da Pustulina

CURVA ANALÍTICA DE PUSTULINA					
Amostra	CONCENTRAÇÃO	n=2		MEDIA	DP
		AREA 1	AREA 2		
0	250	-	-	-	-
1	125	66689,5	73641	70165,25	4915,45279
2	62,5	41745,9	40255,7	41000,8	1053,73053
3	31,25	17602,3	17770,9	17686,6	119,218203
4	15,625	9750,86	9579	9664,93	121,523371
5	7,8125	2829,3	3527,5	3178,4	493,701955



QUANTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA NOS EXTRATOS (PUSTULINA)						
CODIGO	NOME	n=2		MEDIA	DP	CONCENTRAÇÃO µg/mL
		AREA 1	AREA 2			
EOR15	Planta <i>in natura</i>	24512	23139,7	23825,85	970,36264	42,69970998
EOR12	Plântula <i>in vitro</i> obtida por sementes	2506,6	2351,1	2428,85	109,9551	5,317201859
JAC3	Plântula <i>in vitro</i> obtida por organogênese	1788,9	2087,4	1938,15	211,07137	4,459904259
JAC4	Calos	379,6	339,11	359,355	28,630754	1,701605577
JAC5	Co-cultura plântula <i>in vitro</i> sementes + SSP7	24193,3	21855,3	23024,3	1653,2157	41,29932912

ANEXOS

Anexo 1. Comprovante de Cadastro de Acesso emitido pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN)



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº A3C4070

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A3C4070**
 Usuário: **UNICAMP**
 CPF/CNPJ: **46.068.425/0001-33**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Sinningia speciosa
Sinningia magnifica
Sinningia gigantifolia
Sinningia araneosa
Sinningia schiffneri
Sinningia mauroana
Sinningia striata
Sinningia sp
Sinningia douglasii
Seemannia sylvatica
Sinningia sp
Seemannia sp
Sinningia sp
Nematanthus fluminensis
Nematanthus fritschii
Sinningia sp
Sinningia sp

Título da Atividade: **Estudo químico, metabolismo e avaliação de atividade biológica de Gesneriaceae planta in natura e de cultura in vitro.**

Equipe

Marcos Jose Salvador	UNICAMP
Wallace Ribeiro Correa	Instituto Federal do Sul de Minas Gerais, Inconfidentes,
Alvaro Jose Hernandez-Tasco	IB-UNICAMP

Alessandra Freitas Serain	IB-UNICAMP
Maria Elida Alves Stefanello	UFPR
Candida Aparecida Leite Kassuya	Universidade Federal da Grande Dourados
Carlos José Alvarez Cantero	IB-UNICAMP

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: Trabalhos científicos publicados (completos e i

Outros resultados

Data do Cadastro: 04/11/2018 01:36:30

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 20:12 de 02/01/2020.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo 2. Declaração referente a Bioética e Biossegurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada “*Condições de cultivo, bioatividade e avaliação do potencial metabólico de Sinningia speciosa (planta in natura, plântula in vitro e calos) e do fungo endofítico Geosmithia sp. associado à suas folhas*”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Carlos Jose Alvarez C.

Assinatura: _____
Nome do(a) aluno(a): Carlos Jose Alvarez Cantero

Prof. Dr. Marcos José Salvador
Prof. Dr. Marcos José Salvador
Dep. Biologia Vegetal
Mestrado Unicamp 25129-3

Assinatura: _____
Nome do(a) orientador(a): Marcos José Salvador

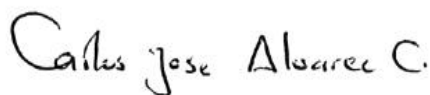
Data: 04 de abril de 2020

Anexo 3. Declaração de Direitos Autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **“Condições de cultivo, bioatividade e avaliação do potencial metabólico de *Sinningia speciosa* (planta in natura, plântula in vitro e calos) e do fungo endofítico *Geosmithia sp.* associado à suas folhas”**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

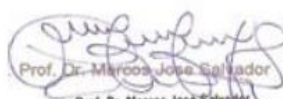
Campinas, 04 de abril de 2020



Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Carlos Jose Alvarez Cantero**

RG n.º G371662-H


Prof. Dr. Marcos José Salvador
Depto. Biologia Vegetal/IB
Matrícula Unicamp 25329-3

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Marcos José Salvador**

RG n.º 21878723