

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

ANGELA APARECIDA DA SILVA

**ESTUDO DA COMUNIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
CULTIVÁVEIS PRESENTES EM *Justicia brandegeana* WASSH. &  
L.B.SM. E SUA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

Maringá  
2019

ANGELA APARECIDA DA SILVA

**ESTUDO DA COMUNIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
CULTIVÁVEIS PRESENTES EM *Justicia brandegeana* WASSH. &  
L.B.SM. E SUA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biologia das Interações Orgânicas.

**Orientador:** Prof. Dr. João Alencar Pamphile  
**Co-orientador:** Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho

Maringá

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S586e Silva, Angela Aparecida da  
Estudo da comunidade de fungos endofíticos cultiváveis presentes em *Justicia brandegeana* WASSH. & L.B.SM. e sua aplicação biotecnológica / Angela Aparecida da Silva. -- Maringá, 2019.  
127 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. João Alencar Pamphile.  
Coorientador: Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2019.

1. Micro-organismos endofíticos. 2. Fungos endofíticos. 3. *Mycoleptodiscus indicus*. 4. *Flavodon flavus*. I. Pamphile, João Alencar, orient. II. Abreu Filho, Benício Alves de, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. IV. Título.

CDD 23.ed. 579

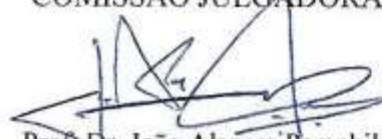
## FOLHA DE APROVAÇÃO

ANGELA APARECIDA DA SILVA

### **Estudo da comunidade de fungos endofíticos cultiváveis presentes em *Justicia brandegeana* Wassh. & L.B.Sm. e sua aplicação biotecnológica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

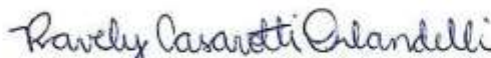
#### COMISSÃO JULGADORA



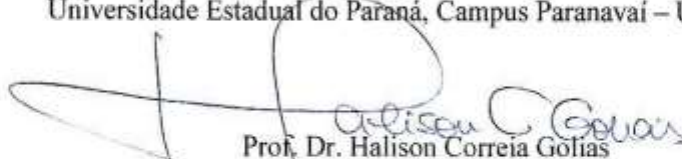
Prof. Dr. João Alencar Pamphile  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)



Prof. Dr. Marcos Alessandro dos Santos Ribeiro  
Universidade Estadual de Maringá



Prof.ª Dr. Ravelly Casarotti Orlandelli  
Universidade Estadual do Paraná, Campus Paranavaí – UNESPAR



Prof. Dr. Halison Correia Góias  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR



Prof.ª Dr. Ana Luiza de Brito Portela Castro  
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 28 de junho de 2019.

Local de defesa: Bloco H67, sala 01, *campus* da Universidade Estadual de Maringá

Dedico este trabalho aos meus pais Maria e Pedro por toda vida de dedicação e amor. Aos meus irmãos André, Patrícia e Pedro Rodrigo. Ao Jardel Cezar, meu companheiro de todos os momentos, bons e ruins, por toda sua paciência. A todos meus professores, amigos e colegas destes anos de trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, pela força e sabedoria por ter conseguido alcançar todos os meus objetivos.

Agradeço a minha Mãe e meu Pai, Maria e Pedro, que nunca me abandonaram durante todos estes anos, me apoiando, me dando amor e carinho, e tudo que só uma mãe e um pai faz por seus filhos.

Dedico aos meus irmãos André, Patrícia e Pedro Rodrigo.

Ao meu companheiro e amigo Jardel Cezar por todo amor, carinho e paciência.

Dedico a todos meus professores que me acompanharam nesta jornada de trabalho, principalmente ao meu orientador prof. Dr. João Alencar Pamphile e meu co-orientador Benício Alves de Abreu filho, por todo carinho, paciência e dedicação, no qual me inspiro a cada dia em ser uma profissional semelhante a eles.

Eu agradeço a todos meus amigos e colegas, que são muitos e acho melhor não citar nomes por medo de não citar alguém e cometer a injustiça de não colocá-los aqui.

As técnicas e técnicos dos laboratórios no qual trabalhei, sem eles meu trabalho seria muito mais difícil de ser realizado.

Agradeço a minha princesa Yasmin que surgiu como um passe de mágica em minha vida, me iluminando ainda mais.

Agradeço a força da vida que esta dentro de mim em cada dia que acordo.

Enfim, agradeço a todos que estiveram do meu lado nestes anos, me apoiando, me ajudando, direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado.

A todos vocês, muito obrigada.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.  
Todos nós sabemos alguma coisa. Todos  
nós ignoramos alguma coisa. Por isso  
aprendemos sempre”

(Paulo Freire)

## **Estudo da comunidade de fungos endofíticos cultiváveis presentes em *Justicia brandegeana* Wassh. & L.B.Sm. e sua aplicação biotecnológica**

### **RESUMO**

A diversidade da flora brasileira é conhecida mundialmente por sua imensa riqueza, fator que proporciona grande campo de pesquisa com diversas aplicações nas mais variadas áreas. Apesar de existirem muitas pesquisas, há uma diversidade de plantas com potenciais biotecnológicos inexplorados. *Justicia brandegeana*, pertencente à família Acanthaceae, que apresenta algumas espécies com propriedades medicinais. Em seu interior estão presentes os fungos endofíticos que podem viver em simbiose com o vegetal. Estes endófitos produzem metabólitos secundários que são relatados na literatura por sua aplicação nas indústrias farmacêuticas, químicas e alimentícias. Estudos mostram a ação dos metabólitos secundários como agente antimicrobiano, antioxidante, antitumoral entre outras. Neste contexto, este trabalho teve como objetivos: isolar e identificar a microbiota fúngica foliar de *J. brandegeana* Wassh. & L.B.Sm., por método dependente de cultivo, com taxonomia molecular baseada em análise multilocus; extrair e avaliar o potencial dos extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos selecionados quanto à sua atividade biológica associada à área da saúde e à indústria alimentícia. Os endófitos foram isolados pelo método da fragmentação. Para a avaliação taxonômica foram utilizados os primers ITS, fator de alongação 1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina, gliceraldeído-3-fosfato e actina. A triagem preliminar dos fungos endofíticos com potencial biotecnológico foi realizada por meio da atividade antibacteriana do extrato bruto dos fungos endofíticos pela metodologia do ágar-ágar contra as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). A partir destes resultados, foi obtido o extrato bruto do fungo com melhores resultados e avaliado quanto à sua atividade antibacteriana, antioxidante, atividade citotóxica, com a determinação dos compostos fenólicos presentes no extrato bruto. Foram isolados cinco gêneros de fungos endofíticos de *Justicia brandegeana*, com predominância do gênero *Colletotrichum*. A espécie que apresentou melhor resultado na triagem preliminar da atividade biológica foi a linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06). O extrato bruto do endófito não apresentou resultados significativos contra as cepas Gram-positivas, uma vez que a concentração inibitória mínima (CIM) foi de 2 mg/mL para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. A avaliação da atividade antioxidante e dos compostos fenólicos do extrato bruto foram melhor avaliados pelo método ABTS, resultando em atividade antioxidante equivalente ao composto padrão de aproximadamente 52,43%. No ensaio citotóxico, o extrato bruto apresentou atividade contra as células tumorais dos hepatócitos humanos, conforme resultados apresentados neste trabalho. Além disso, bioprospectando fungo com atividade biológica contra contaminantes de alimentos, o extrato bruto da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) apresentou importante potencial biotecnológico na indústria de alimentos, visando o tratamento de sucos de laranja para o controle da *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

**Palavras-chave:** Bioatividade do extrato endofítico. *Mycoleptodiscus indicus*. *Flavodon flavus*. Cromatografia em fase Gasosa-Espectrômetro de Massa. Ressonância Magnética Nuclear.



## Study of the community of cultivable endophytic fungi present in *Justicia brandegeana* Wassh. & L.B.Sm. and its biotechnological application

### ABSTRACT

The diversity of the Brazilian flora is known worldwide for its immense wealth, a factor that provides a great field of research with diverse applications in the most varied areas. Although there is much research, there are a variety of plants with unexplored biotechnology potential. *Justicia brandegeana*, belonging to the family Acanthaceae, presents some species with medicinal properties. In its interior are present the endophytic fungi, which live in symbiosis with the vegetable. These endophytes produce secondary metabolites that are reported in the literature for their application in the pharmaceutical, chemical and food industries. Studies show the action of secondary metabolites as antimicrobial agent, antioxidant, antitumor among others. In this context, this work has as objectives: isolate and identify the fungal microbiota of *Justicia brandegeana* Wassh. & L.B.Sm., by culture-dependent method, with molecular taxonomy based on multilocus analysis; extract and evaluate the potential of the crude extracts produced by selected endophytic fungi, as well as their biological activity with biotechnological potential associated with the health area and the food industry. The endophytes were isolated from *Justicia brandegeana* by the method of fragmentation. For the taxonomic evaluation ITS, elongation factor 1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e actin primers were used. The preliminary screening of endophytic fungi with biotechnological potential was carried out through the antibacterial activity of the crude extract of the endophytic fungi by the agar-agar methodology. From these results, the crude extract of the fungus with the best results was obtained and evaluated for its antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity, with the determination of the phenolic compounds present in the crude extract. Five genus of endophytic fungi were isolated from *Justicia brandegeana*, with predominance of the genus *Colletotrichum*. The species that presented the best result in the preliminary screening of the biological activity was the endophytic line *Mycoleptodiscus indicus* (JB06). The crude extract of the endophyte did not present significant results against the Gram-positive strains, since minimum inhibitory concentration (MIC) was of 2,000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. The evaluation of the antioxidant activity and the phenolic compounds of the crude extract were better evaluated by the ABTS method, resulting in antioxidant activity equivalent to the standard compound of approximately 52.43%. In the cytotoxic assay, the crude extract showed activity against human hepatocyte tumor cells. according to the results presented in this work. In addition, bioprospecting fungus with biological activity against food contaminants, the crude extract of the endophytic strain *Flavodon flavus* (JB257) presented an important biotechnological potential in the food industry, aiming the treatment of orange juice for the control of *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

**Keyword:** Bioactivity of the endophytic extract. *Mycoleptodiscus indicus*. *Flavodon flavus*. Gas-phase Chromatography-Mass Spectrometer. Nuclear Magnetic Resonance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Dendograma resultante da análise filogenética dos fungos endofíticos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* isolados das folhas de *Justicia brandegeana* definido pela análise bayesiana, com alinhamento de quatro genes combinados (ITS, ACT, GPD e TUB). Foi utilizado como grupo externo *Monilochaetes infuscans* (CBS 869 96). Desvio padrão de 0.01 para 1.000,000 gerações.....32
- Figura 2** – Dendograma resultante da análise filogenética dos fungos pertencentes ao gênero *Diaporthe* isolados das folhas de *Justicia brandegeana* definido pela análise bayesiana, com alinhamento de dois genes combinados (ITS e EF1 $\alpha$ ). Foi utilizado como grupo externo *Diaporthe corylina* (CBS121124). Desvio padrão de 0.01 para 1.000,000 gerações.....33
- Figura 3** - Dendograma resultante da análise filogenética dos endofíticos *Flavodon flavus*, *Corynespora cassiicola* e *Mycoleptodiscus terrestris* isolados das folhas de *Justicia brandegeana* definido pela análise bayesiana, com alinhamento do gene ITS. Foi utilizado como grupo externo *Aspergillus niger* (ATCC 201201 KU72903.1). Desvio padrão de 0.01 para 1.000,000 gerações.....34
- Figura 4** – Cromatograma da corrente iônica total do extrato bruto de *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) por CG-EM: cafeína (1), Metil-lathodoratina (2), 8-metóxi-metil-lathodoratina (3), 3-etil-5-hidroxi-7,8-dimetóxiroman-4-ona (4).....39
- Figura 5** – Estrutura química dos metabólitos voláteis majoritários detectados por CG-EM do extrato bruto do isolado endofítico *Mycoleptodiscus indicus* (JB06).....40
- Figura 6** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtido do extrato bruto do isolado endofítico *Mycoleptodiscus indicus* (JB06), em CDCl<sub>3</sub>.....40

**Figura 7** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato bruto do isolado endofítico *Mycoleptodiscus indicus* (JB06). .....41

**Figura 8** – Efeito citotóxico do extrato bruto extraído da linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) das folhas de *Justicia brandegeana* pelo método MTT, sobre a atividade enzimática mitocondrial succinato desidrogenase, em células HepG2/C3A, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, com  $10^4$  células/poço. Dox: Doxorubicina, Cont: Controle. \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).....43

## CAPÍTULO 2

**Figura 1** - Dendograma resultante da análise filogenética baseado no método *Maximum Likelihood* empregando o modelo de Jukes-Cantor. *Riopa metamorphosa* (NR 147661.1) foi utilizada como grupo externo. Os números na árvore indicam a porcentagem de agrupamento durante a análise (bootstrap com 10.000 repetições).....93

**Figura 2** - Cromatograma da corrente iônica total do extrato bruto de *F. flavus* por CG-EM: álcool fenilético (**1a**, **1b**); *N*-acetil-tyramina (**2**); ácido 4-isopropil-4-cicloexene-1,2-dicarboxílico (**3**); 1-phenil-hexahidro-3-(2-methylpropil)-pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona (**4**); 19-hidroxi-17-oxoandrost-5-en-3-il acetato (**5**) .....93

**Figura 3** - Estrutura química dos metabólitos majoritários detectados por GC-MS do extrato bruto do isolado endofítico *Flavodon flavus*.....94

**Figure 4** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos em  $\text{CDCl}_3$  e o TMS como padrão interno, do extrato bruto do isolado endofítico *Flavodon flavus*, espectro total e ampliações.....95

**Figure 5** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtidos em  $\text{CDCl}_3$  e o TMS como padrão interno do extrato bruto do isolado endofítico *Flavodon flavus*.....96

**Figura 6** - Isoblograma mostrando a interação sinérgica entre o extrato bruto da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) combinado com a nisina (FIC=0,18). As linhas resultam

em curvas altamente côncavas caracterizando sinergismo entre os compostos (índice FIC <0,5).....98

**Figura 7** - Atividade antibacteriana do extrato bruto (EB) da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) sozinho e combinado com a bacteriocina nisina contra células vegetativas e esporos de *A. acidoterrestris* em suco de laranja reconstituído a 11 °Brix (CIM do EB = 250 µg/mL; CIM nisina = 31,25 µg/mL) com período de incubação de 24 horas a 45 °C. (A) Tratamento aplicado contra as células vegetativas e (B) contra os esporos de *A. acidoterrestris*: (-)JB257 e (x) JB257 + nisina.....99

**Figura 8** - Efeito citotóxico do extrato bruto da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) isolado das folhas de *J. brandegeana* contra células tumorais de hepatócitos humanos HepG2/C3A cultivadas *in vitro* e avaliadas pelo método MTT. A Concentração citotóxica para 50% do tapete celular (•=CC<sub>50</sub>) foi de 180 µg/mL.....100

**Figura 9** - Microscopia Eletrônica de Varredura das células vegetativas e esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* após tratamento com o extrato bruto (EB) da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) com período de incubação de 24 horas a 45 °C em meio BAT: (A) controle - célula vegetativa; (B) célula vegetativa tratada com EB na concentração de 250 µg/mL; (C) controle - esporo; (D) esporo tratado com EB na concentração de 500 µg/mL. As setas (→) indicam os locais que ocorreram alterações na membrana celular bacteriana.....101

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1** - Genes/loci utilizados nas análises dos fungos endofíticos de *Justicia brandegeana*, com seus primers e condições para ampliações do PCR.....26

**Tabela 2** - Análise no BLASTn para os genes ITS, Actina (ACT), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD) e Tubulina (TUB) para os endófitos do gênero *Colletotricum* sp.....35

**Tabela 3** - Análise no BLASTn para os genes ITS e Fator de Elongação para os endófitos do gênero *Diaporthe* sp.....37

**Tabela 4** - Análise no BLASTn para os genes ITS para os endófitos dos gêneros *Flavodon* sp., *Corynespora* sp. e *Mycoleptodiscus* sp.....37

**Tabela 5** - Triagem preliminar da atividade antibacteriana dos fungos endofíticos isolados das folhas de *Justicia brandegeana* pelo método do ágar-ágar. ....38

**Tabela 6**- Metabólitos identificados no extrato bruto da linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) por CG-EM-IE. Os valores são expressos como uma porcentagem da corrente total de íons (TIC).....39

**Tabela 7** - Atividade antibacteriana do extrato bruto da linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) isolada de *Justicia brandegeana* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....42

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1** - Metabólitos identificados no extrato bruto da linhagem endofítica *F. flavus* (JB257) por GC-MS. Os valores são expressos como uma porcentagem da corrente total de íons (% , TIC).....93

<b>Tabela 2</b> - Atribuição deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ NMR do álcool feniletílico.....	95
--	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. Referências</b> .....	18
<b>2. CAPÍTULO 1</b> .....	21
Estudo genético de fungos endofíticos cultiváveis de <i>Justicia brandegeana</i> com análise dependente de cultivo e seleção de endófito com potencial biotecnológico aplicado à saúde.....	22
ANEXO 1.....	52
ANEXO 2.....	55
<b>3. CAPÍTULO 2</b> .....	79
Extrato metabólico do fungo endofítico <i>Flavodon flavus</i> isolados de <i>Justicia brandegeana</i> no controle de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	80
ANEXO 3.....	106

## 1. INTRODUÇÃO

A flora brasileira é conhecida internacionalmente por sua biodiversidade, no qual existem mais de 55 mil espécies de plantas conhecidas, que compõe 22% do total mundial (SAVI et al., 2019). A Acanthaceae apresenta vários gêneros ornamentais utilizados mundialmente, dentre eles encontramos o gênero *Justicia*, que apresenta grande valor econômico devido às suas inflorescências que chamam a atenção para o paisagismo. Existem poucas espécies em regiões temperadas sendo que os principais centros de distribuição encontram-se na Indonésia e Malásia, África, Brasil e América Central. São encontradas em diversos habitats como em florestas densas ou abertas, em matagais, campos molhados e vales, em pântanos, bosques de mangue, na costa do mar e em zonas marinhas (MAHBUBUR RAHMAN et al., 2014).

As espécies do gênero *Justicia* possuem diversas ações medicinais e podem ser utilizadas em tratamentos contra dores de estômago, diarreia, disenteria, gripe, contusões e torções, problemas nervosos, tratamento de doenças respiratórias, eczema, artrite e reumatismo, febre e tumores glandulares e podem ser empregadas também como inseticidas (AOYAMA; INDRIUNAS, 2014; MAHBUBUR RAHMAN et al., 2014).

A palavra endofítico é de origem grega (“endo”= dentro; “phyto”= planta) e são representados pelos micro-organismos que vivem dentro de órgãos e tecidos dos vegetais habitando os espaços intercelulares e intracelulares, durante ou parte de seu ciclo de vida sem lhes causar doenças (FELBER et al., 2015; KUSAI et al., 2012). Os fungos endofíticos parecem ser ubíquos na natureza, podem ser encontrados em todos tipos de plantas como em briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (ARNOLD; LUTZONI, 2007; SOUZA et al., 2004; U’REN et al., 2010). A diversidade dos micro-organismos endofíticos pode variar conforme a estação do ano, o clima local, a espécie vegetal, o local de instalação do endófito (folha, caule, raiz, etc.) e a fase de desenvolvimento dessas partes (OKI et al., 2008).

Os fungos endofíticos produzem compostos bioativos que podem ter ação antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antioxidante, hormonal, antidiabética, imunossupressora, inibidora de acetilcolinesterase entre outras funções biológicas, tornando-se assim de grande interesse industrial e biotecnológico (JOSEPH; PRIYA, 2011; PALANICHAMY et al., 2018; PEIXOTO-NETO; AZEVEDO, ARAÚJO, 2002). Estas



atividades biológicas estão relacionadas a uma ampla diversidade de compostos bioativos presente em seus extratos metabólicos, como, alcaloides, benzopirranonas, quinonas, flavonoides, compostos fenólicos, esteroides, taninos, terpenoides, proteínas e aminoácidos, tetralonas, xantonas entre outros (RAMOS et al., 2010; DING et al., 2010; TONG, 2011; XING et al., 2011; MEFTEH et al., 2018; YAN et al., 2018; ALURAPPA; CHOWDAPPA, 2018).

Existem diversos compostos bioativos já conhecidos produzidos por fungos endofíticos, dentre eles podemos citar os compostos anticancerígenos paclitaxel (taxol) (STIERLE et al., 1993) e podofilotoxina (EYBERGER et al., 2006), e antidepressivos hiperina e emodina (KUSARI et al., 2008).

Sendo assim, os fungos endofíticos apresentam grande potencial como produtores de compostos bioativos que podem ser isolados e purificados. Esses metabólitos secundários podem ser utilizados em diversas áreas da saúde humana e animal, ou como conservantes em alimentos, além de outras aplicações biotecnológicas (BALAKUMARAN et al., 2015; SAVI et al., 2019).

O endófito *Mycoleptodiscus* é um gênero que pode ser encontrado como patógeno de plantas, sendo oportunistas de animais, sapróbicos e como endófitos (HERNÁNDEZ-RESTREPO et al., 2019; ROSA et al., 2012). O extrato bruto do endófito *Mycoleptodiscus indicus* isolado da planta *Echinacea purpurea* apresentou atividade larvicida contra *A. aegypti* e atividade antifúngica (ROSA et al., 2012). Conforme Vieira et al. (2012) a espécie *Flavodon flavus* é um fungo Basidiomycota raramente encontrado como endofítico. Poucos trabalhos mostram o isolamento desse fungo em condição endofítica. De acordo com o trabalho realizado por Brum et al. (2012), foi possível isolar uma variedade de endófitos de *Vitis labrusca*, entre esses a espécie *Flavodon flavus*. No entanto, poucos trabalhos mostram a atividade biológica dos extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos *Mycoleptodiscus indicus* e *Flavodon flavus*, e não foi encontrado nenhum trabalho que apresenta o isolamento destes fungos endofíticos presente nas folhas da planta *Justicia brandegeana*. Por este motivo, este trabalho teve como objetivo avaliar a microbiota fúngica foliar de *Justicia brandegeana* Wassh. & L.B.Sm., por método dependente de cultivo, com taxonomia molecular baseada em análise multilocus. Além disso, um outro objetivo deste trabalho, foi avaliar a bioatividade

dos extratos brutos dos fungos endofíticos selecionados, sendo esses, com potencial biotecnológico associado à área da saúde e à indústria alimentícia.

## 2. Referências

- ALURAPPA, R; CHOWDAPPA, S. Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Endophytic Fungal Extracts Isolated from Ethno-Pharmaceutical Plant *Rauwolfia tetraphylla* L. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 317-332, 2018.
- AOYAMA, E. M.; INDRIUNAS, A. Micromorfologia e anatomia foliar de duas espécies de *Justicia* L. (Acanthaceae) de uso medicinal. **Ver. Biol. Neotrop.** v. 11, n. 2, p. 97-106, 2014.
- BALAKUMARAN, M. D.; RAMACHANDRAN, R.; KALAICHELVAN, P. T. Exploitation of endophytic fungi, *Guignardia mangiferae* for extracellular synthesis of silver nanoparticles and their *in vitro* biological activities. **Microbiological Research**, v. 178, p. 9-17, 2015.
- BRUM, M. C. P.; ARAÚJO, W. L.; MAKI, C. S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. **Genet. Mol. Res.**, v. 11, n. 4, p.4187-4197, 2012.  
<https://dx.doi.org/10.4238/2012>
- DING, T.; JIANG, T.; ZHOU, J.; XU, L.; GAO, Z. M. Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 2104-2112, 2010.
- ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 541-549, 2007.  
<https://doi.org/10.1890/05-1459>
- EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1121-1124, 2006.
- FELBER, A. C.; ORLANDELLI, R. C.; RHODEN, A. S.; GARCIA, A.; COSTA, A. T.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. **Annals of Microbiology**, p. 1-11, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1162-6>.
- HERNÁNDEZ-RESTREPO, M.; BEZERRA, J. D. P.; TAN, Y. P.; WIEDERHOLD, N.; CROUS, P. W.; GUARRO, J.; GENÉ, J. Re-evaluation of *Mycocleptodiscus* species and morphologically similar fungi. **Persoonia**, v. 42, p. 205-227, 2019.  
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.42.08>
- JOSEPH, B.; PRIYA, M. Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: a review. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, n. 3, p. 291-309, 2011.
- KUSARI, S.; LAMSHOFT, M.; ZUHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 26-29, 2008.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.
- MAHBUBUR RAHMAN, A. H. M.; WAHIDA AFSANA, M.; RAFIUL ISLAM, A. K. M. Taxonomy and medicinal uses on *Acanthaceae* family of Rajshahi, Bangladesh. **Journal of Applied Science and Research**, v. 2, n. 1, p. 82-93, 2014.

- MEFTEH, F. B.; DAOUD, A.; BOUKET, A. C.; THISSERA, B.; KADRI, Y.; CHERIF-SILINI, H.; ESHELLI, M.; ALENEZI, F.; VALLAT, A.; OSZADO, T.; KADRI, A.; ROS-GARCÍA, J. M.; RATEB, M. E.; GHARSALLAH, N.; BELBAHRI, L. Date Palm Trees Root-Derived Endophytes as Fungal Cell Factories for Diverse Bioactive Metabolites. **Int J Mol Sci**, v. 19, p.1986, 2018. [https://10.3390/ijms19071986](https://doi.org/10.3390/ijms19071986)
- OKI, Y.; FERNANDES, G. W.; CORREA JUNIOR, A. Fungos: amigos ou inimigos? **Ciência Hoje**, v. 252, p. 64-66, 2008.
- PALANICHAMY, P.; KRISHNAMOORTHY, G.; KANNAN, S.; MARUDHAMUTHU, M. Bioactive potential of secondary metabolites derived from medicinal plant endophytes. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 4, p. 303-312, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2018.07.002>
- PEIXOTO-NETO, P. A. D. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biociência**. **Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-76, 2002.
- RAMOS, H. P.; BRAUN, G. H.; PUPO, M. T.; SAID, S. Antimicrobial activity from endophytic fungi *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immerse*. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 629-632, 2010.
- ROSA, L. H.; TABANCA, N.; TECHEN, N.; WEDGE, D. E.; PAN, Z.; BERNIER, U. R.; BECNEL, J. J.; AGRAMONTE, N. M.; WALKER, L. A.; MORAIS, R. M. Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with micropropagated medicinal Plant *Echinacea purpurea* (L.) Moench. **American Journal of Plant Sciences**, n. 3, p. 1105-1114, 2012. <https://dx.doi.org/10.4236/ajps.2012.38133>
- SAVI, D. C.; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Brazilian Plants: An Unexplored Source of Endophytes as Producers of Active Metabolites. **Planta Med**, v. 85, p. 619-636, 2019. [https://10.1055/a-0847-1532](https://doi.org/10.1055/a-0847-1532)
- SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FILHO, A. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.
- TONG, W. Y.; DARAH, I.; LATIFFAH, Z. Antimicrobial activities of endophytic fungal isolates from medicinal herb *Orthosiphon stamineus* Benth. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 831-836, 2011.
- U'REN, J. M.; LUTZONI, F.; MIADLIKOWSKA, J.; ELIZABETH ARNOLD, A. Community analysis reveals close affinities between endophytic and endolichenic fungi in mosses and lichens. **Microb Ecolo**, v. 60, p. 340-353, 2010. [https://10.1007/s00248-010-9698-2](https://doi.org/10.1007/s00248-010-9698-2)
- VIEIRA, M. L. A.; HUGHES, A. F. S.; GIL, V. B.; VAZ, A. B. M.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (*Solanaceae*). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 54-66, 2012. [https://10.1139/w11-105](https://doi.org/10.1139/w11-105)
- XING, Y.; CHEN, J.; CUI, J.; CHEN, X.; GUO, S. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. **Curr Microbiol**, v. 62, p. 1218-1224, 2011. [https://10.1007/s00284-010-9848-2](https://doi.org/10.1007/s00284-010-9848-2)

YAN, D. H.; SONG, X.; LI, H.; LUO, T.; DOU, G.; STROBEL, G. Antifungal activities of volatile secondary metabolites of four *Diaporthe* strains isolated from *Catharanthus roseus*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 65, 2018. <https://10.3390/jof4020065>

## CAPÍTULO 1

**Estudo genético de fungos endofíticos cultiváveis de *Justicia brandegeana*  
com análise dependente de cultivo e seleção de endófito com potencial  
biotecnológico aplicado à saúde**

Artigo elaborado e formatado  
conforme as normas para publicação  
científica no periódico *Current  
Microbiology*

**Estudo genético de fungos endofíticos cultiváveis de *Justicia brandegeana*  
com análise dependente de cultivo e seleção de endófito com potencial  
biotecnológico aplicado à saúde**

<sup>1</sup>Angela Aparecida da Silva, <sup>1</sup>Julio Cesar Polonio, <sup>1</sup>João Arthur dos Santos Oliveira, <sup>1</sup>Aline Maria Bulla, <sup>2</sup>Halison Correia Golias, <sup>1</sup>Andressa Domingos Polli, <sup>1</sup>Lilian Capelari Soares, <sup>1</sup>Veronica Elisa Pimenta Vicentini, <sup>3</sup>Arildo José Braz de Oliveira, <sup>4</sup>José Eduardo Gonçalves, <sup>3</sup>Regina Aparecida Correia Gonçalves, <sup>5</sup>João Lúcio Azevedo, <sup>6</sup>Benício Alves de Abreu Filho, <sup>1\*</sup>João Alencar Pamphile

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Rua Marcílio Dias, 635, CEP: 86812-460, Jardim Paraíso, Apucarana, Paraná, Brasil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

<sup>4</sup>Programa de Mestrado em Promoção da Saúde e Programa de Mestrado em Tecnologias Limpas, Centro Universitário de Maringá, Avenida Guedner, 1610, CEP: 87050-900, Maringá, Paraná, Brasil

<sup>5</sup>Departamento de Genética - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, CEP: 13418-260, Piracicaba, São Paulo, Brasil

<sup>6</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

\*Autor correspondente e-mail: prof.pamphile@gmail.com

## **Resumo**

Os fungos endofíticos podem ser encontrados em todos tipos de plantas, inclusive em *Justicia brandegeana* uma angiosperma pertence à família Acanthaceae. O objetivo deste trabalho foi avaliar a microbiota fúngica foliar de *Justicia brandegeana* acessada por método dependente de cultivo, com análise taxonômica multilocus. Outro aspecto abordado foi a seleção de um

endófito com atividade biológica relevante. Os endófitos foram isolados de *Justicia brandegeana* pelo método da fragmentação. Para a avaliação taxonômica foram utilizados os primers ITS, fator de alongação 1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina, gliceraldeído-3-fosfato e actina. A triagem preliminar dos fungos endofíticos com potencial biotecnológico foi realizada por meio da atividade antibacteriana pelo método ágar-ágar. A partir destes resultados, foi obtido o extrato bruto do fungo com melhores resultados e avaliado seus componentes químicos por meio cromatografia GC-MS e por RMN, assim como sua atividade antibacteriana, antioxidante, citotóxica e compostos fenólicos. Foram isolados cinco gêneros de fungos endofíticos de *Justicia brandegeana*, com predominância do gênero *Colletotrichum*. A espécie que apresentou melhor resultado na triagem preliminar da atividade biológica foi a linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06). O extrato bruto do endófito não apresentou resultados significativos contra as bactérias avaliadas. A avaliação da atividade antioxidante e dos compostos fenólicos do extrato bruto foram melhor avaliados pelo método ABTS. No ensaio citotóxico, o extrato bruto apresentou atividade contra as células tumorais dos hepatócitos humanos. Pode-se concluir a existência de uma microbiota fúngica variada em folhas de *Justicia brandegeana*, com a seleção do fungo endofítico *Mycoleptodiscus indicus* com potencial biotecnológico aplicado à área da saúde.

**Palavras-chave:** Micro-organismos endofíticos. Bioatividade do extrato endofítico. Diversidade de fungos endofíticos. *Mycoleptodiscus indicus*.

## Introdução

A flora brasileira é conhecida internacionalmente por sua biodiversidade, no qual existem mais de 55 mil espécies de plantas conhecidas, que compõe 22% do total mundial [42]. A planta *Justicia brandegeana* pertence à família Acanthaceae, com poucas espécies presentes em regiões temperadas e, com os principais centros de distribuição na Indonésia, Malásia, África, América Central e Brasil [36].

De acordo com Strobel [46], cerca de 1-2% das 300.000 plantas já conhecidas foram estudadas quanto à sua composição de micro-organismos endofíticos. Os fungos endofíticos



habitam os tecidos ou órgãos vegetais em todo seu ciclo de vida ou apenas em uma de suas fases de desenvolvimento em uma relação simbiótica, sendo que sua característica principal é a de não provocar doenças às plantas hospedeiras. Eles parecem ser ubíquos na natureza, estando presentes em plantas de altas a baixas latitudes, de climas frios como no ártico, assim como em regiões de florestas tropicais, estas últimas com uma maior diversidade [3]. Os fungos endofíticos podem ser encontrados em todos tipos de plantas como em briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas [44, 48]. A diversidade dos micro-organismos endofíticos pode variar conforme a estação do ano, o clima local, a espécie vegetal, o local de instalação do endófito (folha, caule, raiz, etc.) e a fase de desenvolvimento dessas partes [32].

Os fungos endofíticos possuem compostos bioativos que podem ter ação antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antioxidante entre outras funções biológicas, tornando-se assim de grande interesse industrial e biotecnológico [26, 34].

Neste sentido, dado a relevância do tema, este trabalho teve como objetivo avaliar a microbiota fúngica foliar de *Justicia brandegeana* Wssh. & L.B.Sm., por método dependente de cultivo, com taxonomia molecular baseada em análise multilocus, além de selecionar o endófito com atividades biológicas com potencial biotecnológico associado à saúde.

## **Materiais e métodos**

### **Material biológico, local da coleta e isolamento**

As linhagens de fungos endofíticos foram isoladas de folhas maduras assintomáticas e não danificadas de plantas da espécie *Justicia brandegeana* do viveiro da Universidade Estadual de Maringá (23°24' S 51°56' W). A precipitação durante o mês da coleta foi de 12.7 mm, a temperatura média 21 °C e a umidade relativa foi de 70%. O isolamento dos fungos endofíticos de *Justicia brandegeana* foram realizados pelo método da fragmentação, conforme descrito por Orlandelli et al. [33], com modificação na concentração e tempo de desinfecção utilizando o hipoclorito de sódio, no qual foi empregado a concentração de 4% por 4 min. O cálculo da frequência de colonização (FC%) foi realizado por meio da fórmula  $FC = (FF/FA) \times 100$  onde FF= número de fragmentos que apresentaram crescimento fúngico, e FA= número total de fragmentos amostrados. O processo de purificação foi realizado conforme descrito por Orlandelli et al. [33], os isolados foram preservados pelo método de

Castellani [7] e depositados na Coleção de Micro-organismos Endofíticos e do Ambiente, do Laboratório de Biotecnologia Microbiana, da Universidade Estadual de Maringá (LBIOMIC) e renovados antes de cada experimento.

### **Taxonomia molecular por análise multilocus (MLSA)**

A extração genômica do DNA, amplificação e a análise filogenética foram realizadas conforme Polonio et al. [35]. O DNA genômico foi extraído utilizando PowerSoil® DNA Isolation KIT (MO BIO Laboratories, Inc.), seguindo as especificações do fabricante.

Para a Análise Multilocus (MLSA), foram utilizadas as sequências parciais da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA (ITS), gene para o fator de alongação 1- $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ), gene para  $\beta$ -tubulina (TUB), gene que codifica a actina (ACT) e o gene para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD). Os primers utilizados na amplificação e as condições para realização dos PCRs (reação da polimerase em cadeia) estão apresentados na tabela 1.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5%, e posteriormente sequenciados utilizando o equipamento ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os resultados de sequenciamentos foram avaliados utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.2.2.

As seqüências foram tratadas e alinhadas utilizando o software Geneious Prime v. 2019.1.1. Uma vez que as seqüências mostraram uma grande semelhança no Genbank com outros fungos (Tabela 1, Tabela 2 e Tabela 3), uma análise filogenética foi realizada com base em dados filogenéticos pré-estabelecidos (Anexo 1). As seqüências foram então resgatadas e alinhadas com o MAFFT [22]. Após o alinhamento, foi realizado um conjunto multigene de seqüências. Para análise filogenética baseada na máxima verossimilhança e inferência bayesiana, MrModelTest v. 2.3 [30] foi utilizado para escolher o melhor modelo evolucionário. A árvore filogenética foi construída usando MrBayes v. 2.2.4 [39], levando em consideração os parâmetros gerados por MrModelTest, com cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), que durou até que o desvio padrão médio das frequências divididas fosse abaixo de 0.01 (1.000.000 gerações). A probabilidade bayesiana foi demonstrada nos nós entre cada indivíduo. A árvore foi editada com o FigTree v. 1.4.2 [37].

Tabela 1- Genes/loci utilizados nas análises dos fungos endofíticos de *Justicia brandegeana*, com seus primers e condições para ampliações do PCR.

Gene/ Loci	Primers PCR	Sequência (5'→3')	Condições de amplificação	Ref.
ITS	ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCCCGCTTATTGATATGC	92 °C: 4 min; (92° C 40s, 52 °C, 1 min e 30s, 72° C, 2 min) x 35 ciclos; 72 °C, 5 min	[51]
EF 1 $\alpha$	EF1-728F EF1-986R	CATCGAGAAGTTCGAGAAG G TACTTGAAGGAACCCTTACC	94 °C: 4 min; (94° C 1 min, 55 °C, 1 min, 72° C, 1 min) x 40 ciclos; 72°C, 3 min	[6]
TUB	T1 Bt-2b	AACATGCGTGAGATTGTAAG T ACCCTCAGTGTAGTGACCCT TGGC	94 °C: 4 min; (94° C 1 min, 55 °C, 1 min, 72° C, 1 min) x 40 ciclos; 72°C, 3 min	[31] [17]
ACT	ACT-512F ACT-783R	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	95 °C: 4 min; (95 °C 30s, 56 °C, 30s, 72 °C, 1 min) x35 ciclos; 72 °C, 7 min.	[6]
GPD	GPD1F GPD2R	CAACGGCTTCGGTCGCATTG GCCAAGCAGTTGGTTGTGC	96°C: 2 min; seguido de 30 ciclos: (96°C 1 min, 48°C, 45 s, 72°C, 45 s) x 30; com adição de 4 seg a cada novo ciclo; 72 °C, 10 min.	[4]

### Triagem por meio da atividade antibacteriana

Uma triagem preliminar para selecionar o fungo endofítico com melhor potencial biotecnológico aplicado à saúde, foi realizada baseada na análise de atividade antibacteriana presente nos metabólitos secundários liberados nos blocos meio batata dextrose ágar (BDA) (HiMedia®, Mumbai, India) com crescimento micelial dos endófitos de *Justicia brandegeana*. Esta primeira seleção foi avaliada pelo método do ágar-ágar, conforme descrito por Ichikawa et al. [21] com modificações.

Os fungos foram crescidos em meio BDA por 7 dias a 28 °C. As bactérias utilizadas foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). As cepas bacterianas foram crescidas em meio Mueller Hinton (Difco, Sparks, USA) por 24 horas a 35 °C. Em seguida foi preparada uma solução bacteriana ajustada em solução salina a 0,85% em uma concentração de  $5 \times 10^8$  UFC/mL. Logo após, uma alíquota de 100  $\mu$ L de solução bacteriana foi espalhada com a espátula de Drigalski, em placas contendo ágar

Mueller Hinton (Difco, Sparks, USA). Blocos de BDA (diâmetro de 6 mm) com micélio fúngico dos endófitos foram extirpados assepticamente do ágar BDA e colocados em triplicata nas superfícies das placas de Petri semeadas com a suspensão bacteriana. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C. Após o período de incubação foi realizada as leituras das placas, onde os resultados foram expressos em presença (+) ou ausência (-) do halo de inibição. O endófito com o melhor resultado antibacteriano foi selecionado para a realização da obtenção do extrato bruto endofítico, sendo o mesmo avaliado quanto a sua caracterização química e atividades biológicas.

### **Obtenção do extrato bruto do fungo endofítico selecionado**

Três discos (6mm de diâmetro) do micélio fúngico foram cultivados em 250 mL de caldo Batata Dextrose (BD) (HiMedia®, Mumbai, India) pH 6,6, incubado em condição estacionária à 28 °C por 21 dias. Após este período, o micélio foi separado do meio líquido por meio da filtração e eventual descarte da fração micelial, esta etapa foi repetida três vezes. Após filtração, o meio foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação e extraído com acetato de etila em uma proporção de 1:5, sendo esta etapa repetida três vezes. Em seguida, a fase orgânica foi separada e o solvente evaporado em evaporador rotativo (Tecnal TE-210) a 38 °C. O material resultante da evaporação foi estocado a 4 °C.

### **Análise por GC-MS e RMN dos componentes voláteis do extrato bruto**

Primeiramente, foram diluídos 5 mg do extrato bruto em 100 µL de anidrido acético e 80 µL de TFA 2M (Ácido Trifluoroacético), e mantidos em estufa a 50 °C por 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados 0,5 mL de acetona, com posterior secagem da amostra em fluxo de ar. Logo após, a amostra foi extraída por partição em 2 mL de água destilada e diclorometano, com posterior separação da fase orgânica por evaporação. No momento da análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG/EM), foram adicionados 500 µL de diclorometano a amostra.

Foi realizada uma análise dos constituintes voláteis acetilados presente no extrato bruto submetido a derivatização por meio de um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard (Agilent 7890B) – acoplado com espectrômetro de massa por ionização de impacto eletrônico (CG-EM-IE) Agilent 5977A MSD, da Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA. A coluna

capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; Agilent Technologies, EUA) foi utilizada. A temperatura do forno foi programada para ir de 90 °C á 200 °C com uma taxa de 3 °C/min, depois mantida a 200 °C durante 5 minutos, após aumentada para 280 °C com uma taxa de 10 °C/min e por fim mantida em 280 °C por 5 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas a 250 °C e 280 °C, respectivamente. O modo de divisão de fluxo com uma razão de 1:20 foi usado na separação e 1 µL de 1% de solução de extrato bruto diluído em diclorometano foi injetado no sistema GC-MS. O impacto de elétrons 70 eV foi utilizado e a faixa de varredura de massa foi ajustada de 29 a 600 uma para varredura completa. O software HP ChemStation foi empregado para analisar espectros de massa e cromatogramas. Os componentes voláteis do extrato derivatizado foram identificados por comparação com seus espectros de massa com os da biblioteca do equipamento (NIST MS Search 2.0).

Para a realização da análise de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) o extrato bruto endofítico (5 mg) foi dissolvido em 700 µL de clorofórmio de deuterado (CDCl<sub>3</sub>, 99,9%). Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram registrados a 298 K utilizando um espectrômetro Bruker (modelo Advance III HD) operando a 500 MHz para o núcleo de <sup>1</sup>H e 125 MHz para o núcleo de <sup>13</sup>C e utilizando as sequências de pulsos padrões do software Bruker. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão. O extrato bruto foi solubilizado em CDCl<sub>3</sub> e o tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão interno (δ, 0 ppm).

### **Atividade antibacteriana do extrato bruto: Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima**

As cepas bacterianas utilizadas foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). O inóculo utilizado foi padronizado conforme preconiza a Clinical and Laboratory Standards Institute [9] com modificações.

Foi utilizada uma suspensão bacteriana na concentração de 5x10<sup>5</sup> UFC/mL. O extrato bruto do endófito foi solubilizado em 5% de uma solução de Tween 80 a 1% em Caldo Mueller Hinton (Difco, Sparks, USA). A microplaca foi incubada a 35 °C por 24 horas, após este período obteve-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os poços sem crescimento

bacteriano visível foram utilizados para a realização do subcultivo de 10 µL (em triplicata) em placa com meio Ágar Mueller Hinton (Difco, Sparks, USA). O não crescimento de colônias bacterianas indica a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Foi realizado um controle nas mesmas condições do experimento para assegurar que a concentração utilizada do solubilizante não interferisse nos resultados. Foi realizado um segundo controle, no qual o inóculo foi crescido apenas em meio de cultura e, um terceiro controle para assegurar a esterilidade do meio. Esses controles foram preparados e incubados nas mesmas condições do experimento.

### **Determinação da atividade antioxidante do extrato bruto**

A solução estoque do extrato bruto foi preparada na concentração de 1mg/mL, onde a amostra foi solubilizada em água (95% v/v) e metanol (5% v/v), protegidos da luz. As avaliações antioxidantes foram determinadas conforme Ma et al. [27] com modificações, pelos métodos DPPH (oxidação de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila), ABTS (capacidade de sequestrar o radical 2,2'-azino-bis - (- 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico), sal diamônio, ~ 98%) e FRAP (poder antioxidante redutor de ferro).

Para o Método DPPH, 25 µL da solução estoque preparada anteriormente, foi adicionada em tubo de ensaio contendo 2 mL da solução de DPPH  $6,25 \times 10^{-5}$  mol/L e mantidos no escuro em repouso por 30 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Thermo Spectronic, Rochester, Ny USA) a 517 nm. Foi construída uma curva padrão com solução de trolox (ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico).

Na metodologia ABTS, foi preparada uma solução em tubos protegidos da luz contendo 30 µL da solução estoque mais 3 mL da solução do radical  $ABTS^+$  (5 ml solução de ABTS a 7 mmol/L e 88 µL de persulfato de potássio – 140 mmol/L, reação por 16 h em ambiente protegido da luz) e deixados em repouso por 6 min. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Thermo Spectronic, Rochester, Ny USA) a 734 nm.

No método FRAP, foi preparado um tampão de acetato 0,3 M (3,1 g  $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$  e 16 mL  $C_2H_4O_2$ ), pH 3,6; solução TPTZ 10 mM (2,4,6 tri (2-piridil)-1,3,5-triazina) em ácido clorídrico (HCl) 40 mM; cloreto férrico ( $FeCl_3$ ) 20 mM foram utilizadas neste ensaio. O reagente FRAP utilizado no ensaio foi preparado por uma mistura de 25 mL de tampão acetato, 2,5 mL de solução de TPTZ e 2,5 mL de solução de  $FeCl_3$ . Foi adicionado em um

tubo de ensaio 100 µL da solução estoque do extrato bruto mais 300 µL de água destilada misturada com 3 mL do reagente FRAP, seguido de homogeneização e mantido em banho-maria a 37 °C por 30 min. Após este período, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Thermo Spectronic, Rochester, Ny USA) a 595 nm.

Foi construída uma curva padrão com solução Trolox ((±) -6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). Os resultados para os ensaios DPPH, ABTS e FRAP foram expressos em µmol Trolox/mg. A inibição do radical DPPH e ABTS foram expressos em porcentagem (%) por meio da equação:  $I\% = [(A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{branco}}] \times 100$ , onde  $A_{\text{amostra}}$  é a absorvância do extrato bruto, e  $A_{\text{branco}}$  é a absorvância do branco. A inibição do radical FRAP foi expresso em porcentagem (%) por meio da equação:  $I\% = [1 - (A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{branco}}] \times 100$ , onde  $A_{\text{amostra}}$  é a absorvância do extrato bruto, e  $A_{\text{branco}}$  é a absorvância do branco. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

#### **Determinação dos compostos fenólicos do extrato bruto**

Esta metodologia foi realizada conforme Singleton & Rossi [43], com modificações. Foram adicionados em tubos protegidos da luz, 125 µl da solução do extrato bruto mais 125 µl de reagente de Folin-ciocauteau 50%/50% água destilada (v/v) e 2250 µl de solução de carbonato de sódio 3,79 M e mantidos em repouso por 30 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Thermo Spectronic, Rochester, Ny USA) a 725 nm. Foi construída uma curva de fenólicos a partir da solução de ácido gálico. Os resultados foram expressos em µg de ácido gálico equivalente a mg do extrato bruto (µg AGE/mg amostra) e em porcentagem (%) de inibição por meio da equação:  $I\% = [1 - (A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{branco}}] \times 100$ , onde  $A_{\text{amostra}}$  é a absorvância do extrato bruto e  $A_{\text{branco}}$  é a absorvância do branco.

#### **Linhagem celular tumoral e ensaio antiproliferativo – Método MTT**

Neste ensaio foram utilizadas as células tumorais de hepatócitos humanos HepG2/C3A que foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro, cultivada em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> com meio de cultura DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium-GibcoR<sup>®</sup>), alta glicose, suplementado com 10% de soro bovino fetal e mantida em estufa incubadora a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. A citotoxicidade foi determinada pelo método MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), conforme Mosmann [28]. Foi

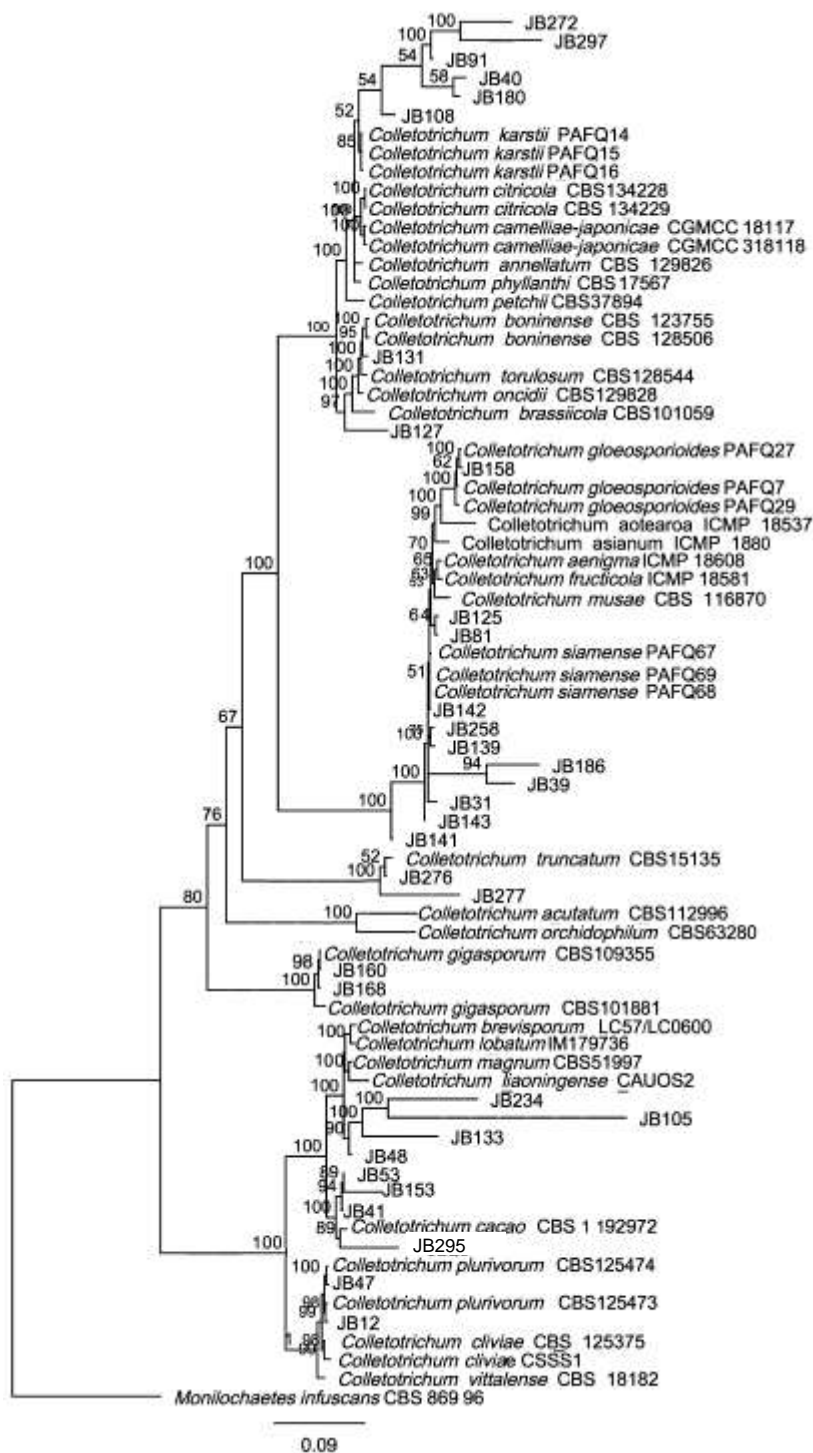
preparada uma suspensão de  $10^4$  células HepG2/C3A cultivada em 100  $\mu$ L de meio de cultura com soro por poço, em placas de 96 poços, por 24 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, e posteriormente foram tratadas nas concentrações de 62,5-1.000  $\mu$ g/mL. Foi realizado um controle utilizando apenas o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. O experimento foi incubado por 24, 48 e 72 horas em 3 repetições biológicas. Posteriormente, o meio de cultura foi descartado e adicionado a cada poço, meio de cultura sem soro com MTT (0,15mg/mL) e as células incubadas por mais 4 horas. Logo após, o meio foi retirado, adicionado 100 $\mu$ L de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi obtida por meio da leitura das placas em leitor Elisa a 550nm, e os dados foram expressos em absorbância. A análise da estatística dos dados da absorbância média foi realizada pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ,  $p<0,05$ ,  $n=3$ ). As análises foram realizadas com auxílio do programa GrafPad InStat versão 3.02.

## **Resultados**

### **Isolamento, caracterização morfológica e identificação molecular dos fungos endofíticos**

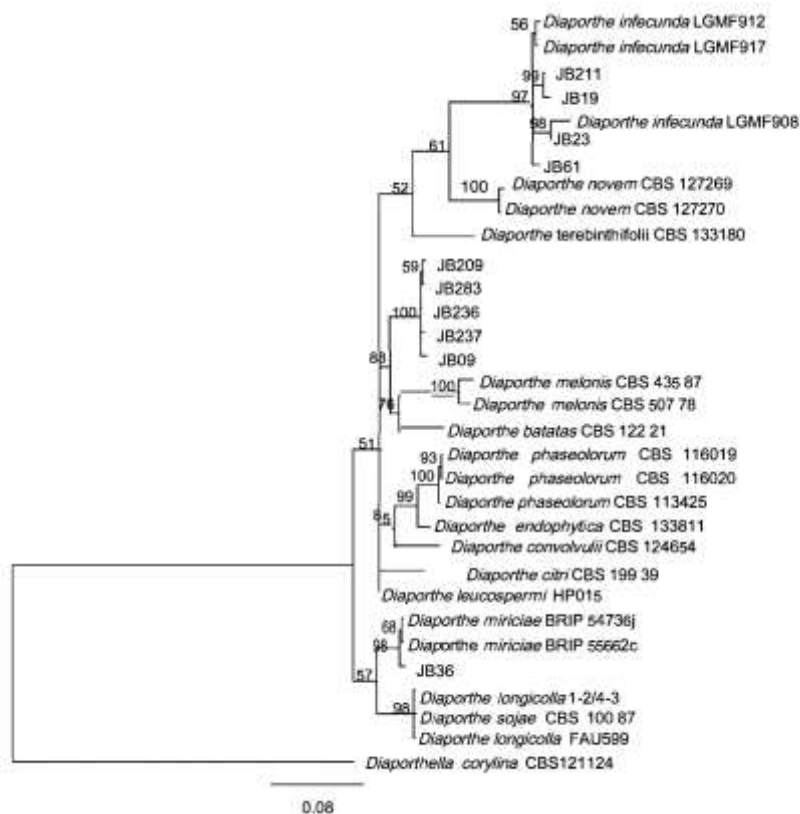
Das 500 amostras de fragmentos foliares de *Justicia brandegeana*, foi obtida uma frequência de isolamento para os fungos endofíticos de aproximadamente 98%. Foram isolados e purificados um total de 300 fungos endofíticos pertencente a diferentes morfogrupos de acordo com as características das colônias. Deste total foram selecionadas aleatoriamente 46 culturas axênicas em meio BDA para a posterior identificação molecular baseada na taxonomia por análise multilocus (MLSA). Por meio desta metodologia foi possível identificar que 71% dos fungos endofíticos identificados pertenciam ao gênero *Colletotrichum*, 22% *Diaporthe* e 6% à outros gêneros (*Flavodon*, *Corynespora* e *Mycocleptodiscus*). As tabelas 2, 3 e 4 descrevem as espécies encontradas com maior identidade de acordo com o BLASTn.





**Figura 1** – Dendograma resultante da análise filogenética dos fungos endofíticos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* isolados das folhas de *Justicia brandegeana* definido pela análise bayesiana, com alinhamento de quatro genes combinados (ITS, ACT, GPD e TUB). Foi utilizado como grupo externo *Monilochaetes infuscans* (CBS 869 96). Desvio padrão de 0.01 para 1.000,000 gerações.

O dendograma resultante para a análise multilocus para os endófitos do gênero *Colletotrichum* sp. está apresentado na Figura 1. Para este gênero, 13 fungos endofíticos foram identificados em nível taxonômico de espécie: JB131 (*C. boninense*; 100% de Bootstrap [BP]), JB158 (*C. gloeosporioides*; 100% BP), JB142 (*C. siamense*), JB277 e JB276 (*C. truncatum*; 100% BP) JB160 e JB168 (*C. gigasporum*; 100% BP), JB53, JB153, JB41 e JB295 (*C. cacao*; 100% BP), JB47 e JB12 (*C. plurivorum*; 100% BP). Outros 19 isolados endofíticos foram identificados em nível taxonômico de gênero, sendo divididos em 8 subgrupos: *Colletotrichum* sp. 1 (JB272, JB297, JB91, JB40, JB180 e JB108), *Colletotrichum* sp. 2 (JB127), *Colletotrichum* sp. 3 (JB125 e JB81), *Colletotrichum* sp. 4 (JB258 e JB139), *Colletotrichum* sp. 5 (JB186 e JB39), *Colletotrichum* sp. 6 (JB31 e JB143), *Colletotrichum* sp. 7 (JB141) e *Colletotrichum* sp. 8 (JB234, JB105, JB133 e JB48).



**Figura 2** – Dendograma resultante da análise filogenética dos fungos pertencentes ao gênero *Diaporthe* isolados das folhas de *Justicia brandegeana* definido pela análise bayesiana, com alinhamento de dois genes combinados (ITS e EF1 $\alpha$ ). Foi utilizado como grupo externo *Diaporthella corylina* (CBS121124). Desvio padrão de 0.01 para 1.000,000 gerações.



**Tabela 2** - Análise no BLASTn para os genes ITS, Actina (ACT), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD) e Tubulina (TUB) para os endófitos do gênero *Colletotrichum* sp.

ITS			ACT			GPD			TUB			
End.	E. M. I.	%	Cod. GB	E. M. I.	%	Cod. GB	E. M. I.	%	Cod. GB	E. M. I.	%	Cod. GB
JB12	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99	AJ301979.1	<i>Colletotrichum plurivorum</i>	10	MG60092	---	---	---	<i>Colletotrichum cliviicola</i>	99	KY677743
JB31	<i>Colletotrichum siamense</i>	97	MF380921	<i>Colletotrichum siamense</i>	10	MH49407	<i>Colletotrichum siamense</i>	10	KM053171	<i>Colletotrichum siamense</i>	99	KC566239
JB39	<i>Colletotrichum siamense</i>	97	MF380921	<i>Colletotrichum siamense</i>	10	MG49407	<i>Colletotrichum siamense</i>	99	KM053171	<i>Colletotrichum siamense</i>	81	KX620348
JB40	<i>Colletotrichum boninense</i>	10	MF076585.1	<i>Colletotrichum karstii</i>	10	KC512184	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	93	KM053200	---	---	---
JB41	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99	MF076619	<i>Colletotrichum cacao</i>	99	MG60097	<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	98	XM_02261874	---	---	---
JB47	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99	AJ301979	<i>Colletotrichum plurivorum</i>	99	MG74776	---	---	---	<i>Colletotrichum cliviicola</i>	10	MF627952
JB48	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99	MF076607	<i>Colletotrichum lobatum</i>	99	MG60097	<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	98	XM_02261874	<i>Colletotrichum liaoningense</i>	99	KY995484
JB53	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99	MF076617	<i>Colletotrichum cacao</i>	99	MG60097	<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	98	XM_02261874	<i>Colletotrichum brevisporum</i>	96	JQ247635
JB81	<i>Colletotrichum siamense</i>	99	MF380921	<i>Colletotrichum siamense</i>	10	MG49407	<i>Colletotrichum siamense</i>	99	KM053171	---	---	---
JB91	<i>Colletotrichum boninense</i>	99	MF076585.1	<i>Colletotrichum karstii</i>	10	KT821382	---	---	---	---	---	---
JB10 5	<i>Colletotrichum sp.</i>	99	MF076603	<i>Colletotrichum lobatum</i>	99	MG60097	---	---	---	---	---	---
JB10 8	<i>Colletotrichum boninense</i>	99	MF076585.1	<i>Colletotrichum karstii</i>	10	MG38795	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	94	KM053200	---	---	---
JB12 5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99	MH863850.1	<i>Colletotrichum siamense</i>	10	MG49407	<i>Colletotrichum siamense</i>	99	KM053171	---	---	---
JB12 7	<i>Colletotrichum boninense</i>	98	MF076598.1	<i>Colletotrichum boninense</i>	92	KT821379	<i>Colletotrichum aoteroa</i>	95	KU221340	---	---	---
JB13 1	<i>Colletotrichum boninense</i>	99	MF076598.1	<i>Colletotrichum boninense</i>	99	Kt821391	<i>Colletotrichum aoteroa</i>	95	KU221340	---	---	---
JB13	<i>Colletotrichum</i>	89	KU498265	<i>Colletotrichum</i>	99	MG60097	<i>Colletotrichum</i>	93	MG600821	---	---	---

3	<i>brevisporum</i>			<i>lobatum</i>	2	<i>brevisporum</i>						
JB13	<i>Colletotrichum</i>	10	MG642980	---	---	<i>Colletotrichum</i>	99	KM053171	---	---	---	
9	<i>siamense</i>	0				<i>siamense</i>						
JB14	<i>Colletotrichum</i>	99	MF076594.1	<i>Colletotrichum</i>	10	MH29085	<i>Colletotrichum</i>	99	KM053171	<i>Colletotrichum</i>	10	KX094300
1	<i>boninense</i>			<i>siamense</i>	0	4	<i>siamense</i>			<i>siamense</i>	0	
JB14	<i>Colletotrichum</i>	99	MH863850.	<i>Colletotrichum</i>	10	MG49407	<i>Colletotrichum</i>	99	KM053171	<i>Colletotrichum</i>	10	MH35113
2	<i>gloeosporioides</i>		1	<i>siamense</i>	0	8	<i>siamense</i>			<i>siamense</i>	0	9
JB14	<i>Colletotrichum</i>	99	MF380921	<i>Colletotrichum</i>	10	MH29086	<i>Colletotrichum</i>	99	KM053171	<i>Colletotrichum</i>	10	KX94300
3	<i>siamense</i>			<i>siamense</i>	0	4	<i>siamense</i>			<i>siamense</i>	0	
JB15	<i>Colletotrichum</i>	93	MF076617	---	---	---	---	---	---	<i>Colletotrichum</i>	96	JQ247635
3	<i>gloeosporioides</i>									<i>brevisporum</i>		
JB15	<i>Colletotrichum</i>	99	MG561710.	<i>Colletotrichum</i>	10	MG38795	<i>Colletotrichum</i>	99	KM053197	<i>Colletotrichum</i>	10	MF423174
8	<i>gloeosporioides</i>		1	<i>gloeosporioides</i>	0	6	<i>gloeosporioides</i>			<i>gloeosporioides</i>	0	
JB16	<i>Colletotrichum</i>	10	KX381170	<i>Colletotrichum</i>	10	KF687787	<i>Colletotrichum</i>	10	KF687827	<i>Colletotrichum</i>	10	KF687870
0	<i>acutatum</i>	0		<i>gigasporum</i>	0		<i>gigasporum</i>	0		<i>gigasporum</i>	0	
JB16	<i>Colletotrichum</i>	10	MF076620	<i>Colletotrichum</i>	10	KF687787	<i>Colletotrichum</i>	10	KF687827	---	---	---
8	<i>gloeosporioides</i>	0		<i>gigasporum</i>	0		<i>gigasporum</i>	0				
JB18	<i>Colletotrichum</i>	99	MF919399	<i>Colletotrichum</i>	10	KC512184	---	---	---	---	---	---
0	<i>gloeosporioides</i>			<i>karstii</i>	0							
JB18	<i>Colletotrichum</i>	99	MF661903	<i>Colletotrichum</i>	10	MG49407	---	---	---	<i>Colletotrichum</i>	80	GQ369602
6	<i>gloeosporioides</i>			<i>siamense</i>	0	8				<i>musae</i>		
JB23	<i>Colletotrichum</i>	84	MF076597	<i>Colletotrichum</i>	99	MG60097	<i>Colletotrichum</i>	98	XM_02261874	---	---	---
4	<i>gloeosporioides</i>			<i>lobatum</i>	2		<i>orchidophilum</i>	2				
JB25	<i>Colletotrichum</i>	10	MF322919	<i>Colletotrichum</i>	10	MG49407	<i>Colletotrichum</i>	99	KM053171	---	---	---
8	<i>gloeosporioides</i>	0		<i>siamense</i>	0	8	<i>siamense</i>					
JB27	<i>Colletotrichum</i>	94	MF076594.1	<i>Colletotrichum</i>	10	KT821382	---	---	---	---	---	---
2	<i>boninense</i>			<i>karstii</i>	0							
JB27	<i>Colletotrichum</i>	99	MK569229.	<i>Colletotrichum</i>	10	KT439349	---	---	---	---	---	---
6	<i>truncatum</i>		1	<i>truncatum</i>	0							
JB27	<i>Colletotrichum</i>	99	MG009237	---	---	---	---	---	---	<i>Colletotrichum</i>	10	MF693396
7	<i>truncatum</i>									<i>truncatum</i>	0	
JB29	<i>Colletotrichum</i>	84	MF076617	<i>Colletotrichum</i>	99	MG60097	<i>Colletotrichum</i>	98	XM_02261874	<i>Colletotrichum</i>	96	MF401550
5	<i>gloeosporioides</i>			<i>cacao</i>	6		<i>orchidophilum</i>	2		<i>brevisporum</i>		
JB29	<i>Colletotrichum</i>	88	EU822803	<i>Colletotrichum</i>	10	KT821382	---	---	---	---	---	---
7	<i>boninense</i>			<i>karstii</i>	0							

Legenda: Linhagem Endofítica: Linh.; Espécie com Maior Identidade: E. M. I.; Código de Acesso no GenBank: Cod. GB; % de Identidade: %

**Tabela 3** - Análise no BLASTn para os genes ITS e Fator de Elongação para os endófitos do gênero *Diaporthe* sp.

ITS				FATOR DE ELONGAÇÃO		
End.	E. M. I.	%	Cód. GB	E. M. I.	%	Cód. GB
JB40	<i>Diaporthe meonis</i>	98	KP182391	<i>Diaporthe batatas</i>	97	MF085049
JB19	<i>Diaporthe longicolla</i>	99	JQ753971	<i>Diaporthe infecunda</i>	98	KP182387
JB23	<i>Diaporthe leucospermi</i>	93	JN712460	<i>Diaporthe infecunda</i>	99	KP182387
JB36	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	99	KT964567	<i>Diaporthe miriciae</i>	99	KJ197245
JB61	<i>Diaporthe infecunda</i>	99	KU212353	<i>Diaporthe infecunda</i>	99	KP182387
JB209	<i>Diaporthe melonis</i>	98	KP182391	<i>Diaporthe batatas</i>	99	MF085049
JB211	<i>Diaporthe longicolla</i>	99	JQ753971	<i>Diaporthe infecunda</i>	99	KP182387
JB236	<i>Diaporthe melonis</i>	98	KP182391	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	99	MF85049
JB237	<i>Diaporthe melonis</i>	98	KP182391	<i>Diaporthe batatas</i>	99	MF085049
JB283	<i>Diaporthe melonis</i>	98	KP182391	<i>Diaporthe batatas</i>	99	MF085049

Legenda: Linhagem Endofítica: Linh.; Espécie com Maior Identidade: E. M. I.; Código de Acesso no GenBank: Cod. GB; % de Identidade: %

**Tabela 4** - Análise no BLASTn para os genes ITS para os endófitos dos gêneros *Flavodon* sp., *Corynespora* sp. e *Mycoleptodiscus* sp.

ITS			
End.	E. M. I.	%	Cód. GB
JB06	<i>Mycoleptodiscus indicus</i>	90	GU980698
JB172	<i>Corynespora cassiicola</i>	100	KU204615
JB257	<i>Flavodon flavus</i>	99	Fj478126

Legenda: Linhagem Endofítica: Linh.; Espécie com Maior Identidade: E. M. I.; Código de Acesso no GenBank: Cod. GB; % de Identidade: %

### Triagem por meio da atividade antimicrobiana

Por meio da triagem preliminar pôde-se observar que 10,87% dos fungos selecionados apresentaram atividade antibacteriana pelo método ágar-ágar, os fungos que não apresentaram atividade antibacteriana por este método, não foram apresentados na tabela (Tab. 5). A linhagem endofítica JB06 (*Mycoleptodiscus indicus*) apresentou atividade antibacteriana contra todas as bactérias avaliadas, tanto contra as Gram-negativas contra as Gram-positivas. As linhagens endofíticas JB91, JB133, JB186 e JB209 apresentaram atividade antibacteriana contra pelo menos uma das bactérias avaliadas. Desta maneira, a linhagem *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) foi selecionada para as demais avaliações da atividade biológica.

**Tabela 5** - Triagem preliminar da atividade antibacteriana dos fungos endofíticos isolados das folhas de *Justicia brandegeana* pelo método do ágar-ágar.

N. Linh.	FUNGO ENDOFÍTICO Espécie	CEPAS BACTERIANAS				
		EC	SE	PA	SA	BS
JB06	<i>Mycoleptodiscus indicus</i>	+	+	+	+	+
JB91	<i>Colletotrichum</i> sp.	+	-	-	-	-
JB133	<i>Colletotrichum</i> sp.	-	-	+	+	-
JB186	<i>Colletotrichum</i> sp.	-	-	+	-	-
JB209	<i>Diaporthe</i> sp.	+	+	+	-	-

Cepas bacteriana: EC - *Escherichia coli*; SE - *Salmonella* Enteritidis; PA - *Pseudomonas aeruginosa*; SA- *Staphylococcus aureus*; BS - *Bacillus subtilis*. Atividade antibacteriana: presença (+) e ausência (-). Observação: as linhagens endofíticas isoladas de *Justicia brandegeana* que não apresentaram nenhuma atividade antibacteriana não foram apresentadas na tabela.

### Caracterização Química do Extrato Bruto dos Fungos Endofíticos

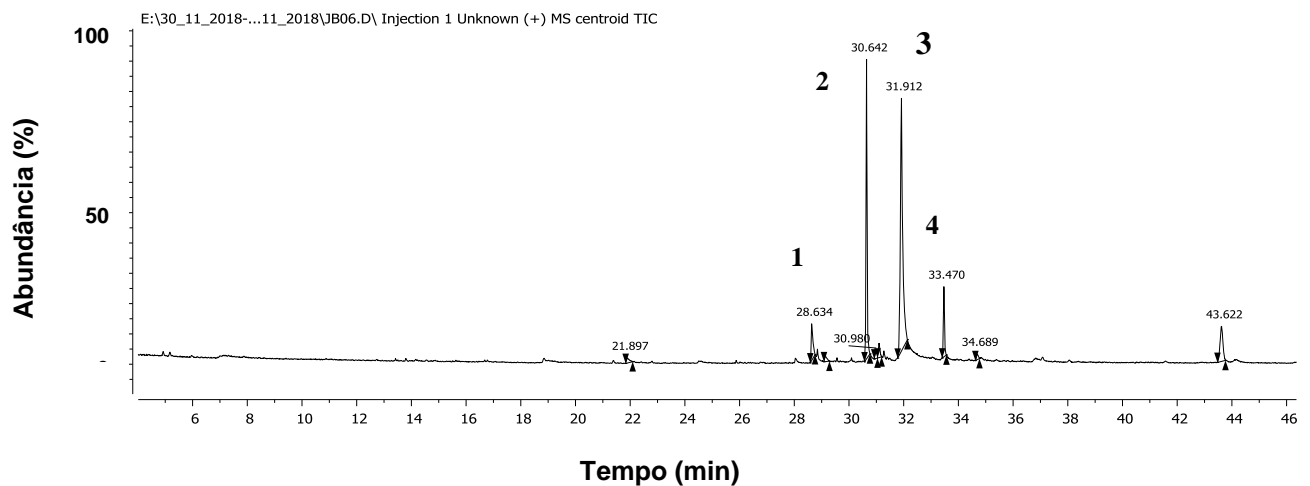
Os compostos voláteis identificados a partir do extrato bruto derivatizado da linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) foram determinados por análises de CG-EM-IE (Fig. 4). Os compostos voláteis identificados por GC-MS estão representados na Tabela 6. O composto 8-metóxi-metil-lathodoratina (**3**) é relativamente o principal composto volátil identificado (59,9%). Os componentes do EB da linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) atribuídos por CG-EM são mostrados no cromatograma de íons totais apresentado na Figura 4, e suas estruturas químicas na figura 5.

A análise de RMN de  $^1\text{H}$  do EB mostrou os sinais característicos de fitoalexinas do tipo lathodoratina [10], Figura 6, onde foram observados os sinais dos hidrogênios da cadeia etílica ligada ao anel aromático a  $\delta_{\text{H}}$  1,20 (C-11, t,  $\text{CH}_3$ ) e 2,35 (C-12, q,  $\text{CH}_2$ ), os sinais da metoxilas  $\delta_{\text{H}}$  3,88 (s), os sinais referentes ao anel aromático entre  $\delta_{\text{H}}$  6,37 e 6,05, o sinal do hidrogênio olefínico da dupla da carbonila alfa, beta-insaturada a  $\delta_{\text{H}}$  8,39 e 8,04 (H-8) e por fim o sinal da hidroxila fenólica a  $\delta_{\text{H}}$  10,15.

**Tabela 6-** Metabólitos identificados no extrato bruto da linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) por CG-EM-IE. Os valores são expressos como uma porcentagem da corrente total de íons (TIC).

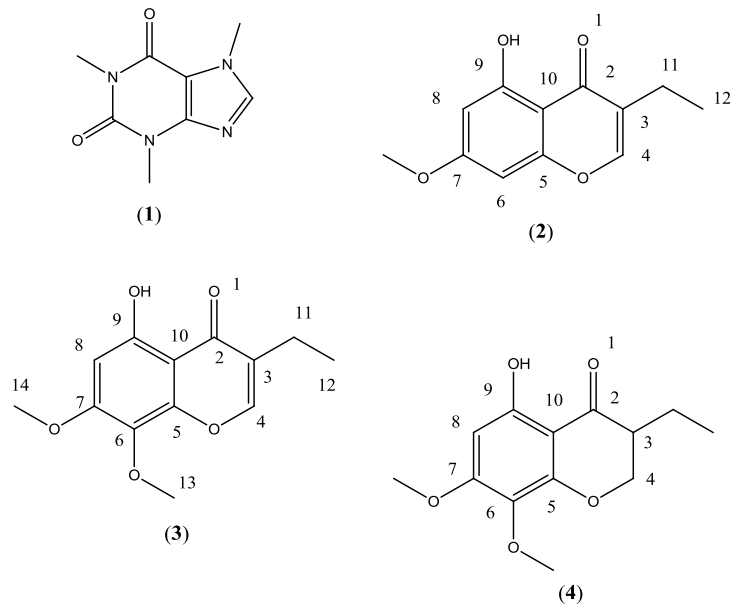
Numero	Composto	*TR	**%	***M <sup>+</sup>
1	Cafeína	28.6	6.00	194,0
2	Metil-lathodoratina	30.6	25.9	220,0
3	8-metóxi-metil-lathodoratina	31.9	59.9	251,9
4	3-etil-5-hidroxi-7,8-dimetóxicroman-4-ona	33.4	8.00	252,3

Legenda: \*TR: Tempo de Retenção (min); \*\*%: Porcentagem da Corrente Total de Íons observados; \*\*\* M<sup>+</sup>: Massa Protonada

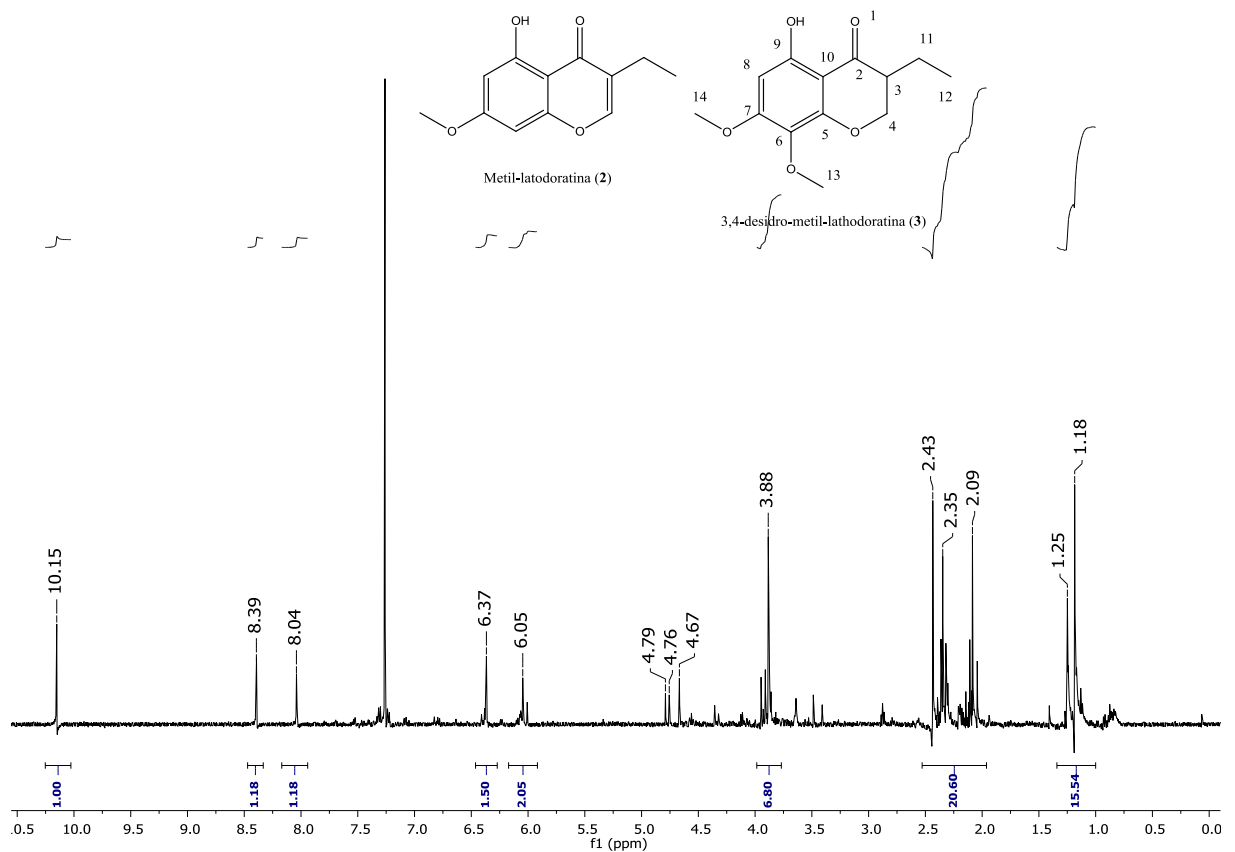


**Figura 4-** Cromatograma da corrente iônica total do extrato bruto de *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) por CG-EM: cafeína (1), Metil-lathodoratina (2), 8-metóxi-metil-lathodoratina (3), 3-etil-5-hidroxi-7,8-dimetóxicroman-4-ona (4).



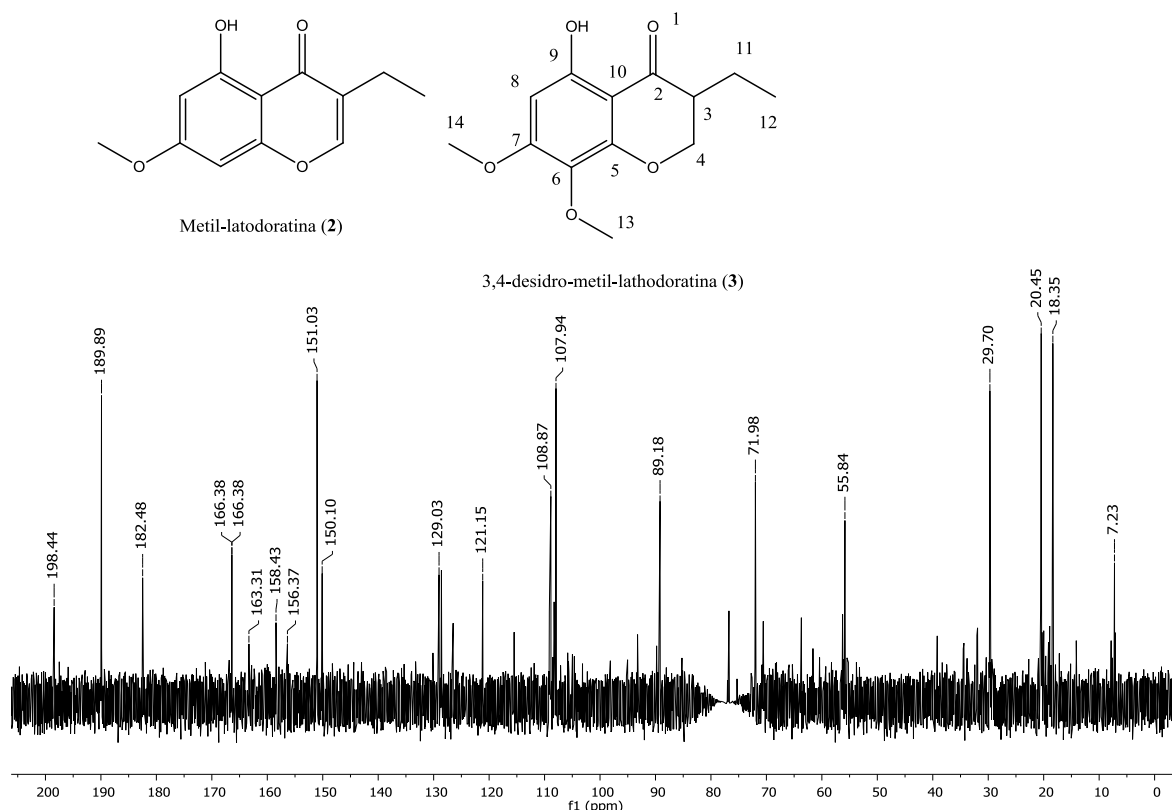


**Figura 5-** Estrutura química dos metabólitos voláteis majoritários detectados por CG-EM do extrato bruto do isolado endofítico *Mycoleptodiscus indicus* (JB06).



**Figura 6-** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido do extrato bruto do isolado endofítico *Mycoleptodiscus indicus* (JB06), em  $\text{CDCl}_3$ .

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  corroboram com os dados de atribuição característicos de fitoalexinas do tipo lathodoratina, discutidos baseados no RMN de  $^1\text{H}$ , que também revelou a presença dos grupos da cadeia alifática devido a presença dos sinais a  $\delta_{\text{C}}$  18,35 (C-11,  $\text{CH}_3$ ) e 20,45 (C-12,  $\text{CH}_2$ ), da metoxilas ligada ao anel aromático a  $\delta_{\text{C}}$  55,84, os carbonos ligados a hidrogênio no anel aromático a  $\delta_{\text{C}}$  150,10 (C-4) e 89,18 (C-3), os sinais dos carbonos ligados a oxigênio a  $\delta_{\text{C}}$  166,38 (C-2), 158,03 (C-4), os sinais dos carbonos olefínicos da dupla da carbonila alfa,beta-insaturada a  $\delta_{\text{C}}$  151,03 (C-8) e 121,15 (C-9) e por fim o sinal do carbono ligado a hidroxila fenólica a  $\delta_{\text{C}}$  163,31 (C-8), Figura 7.



**Figura 7-** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato bruto do isolado endofítico *Mycoleptodiscus indicus* (JB06).

### Atividade antibacteriana: Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

O extrato bruto da linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) apresentou baixa atividade bacteriostática e bactericida contra as cepas Gram-positivas e Gram-negativas avaliadas, no entanto as bactérias Gram-positivas foram as mais sensíveis ao tratamento

aplicado (Tab. 7). A CIM para *S. aureus* e *B. subtilis* foi de 2 mg/mL, e a CBM foi de 8 e 16 mg/mL, respectivamente. Para as cepas Gram-negativas as CIMs foram iguais para todas, com valor de 8 mg/mL, no entanto nesta mesma concentração para *E. coli* e para *P. aeruginosa* foi possível reduzir em 100% da contagem bacteriana, sendo esta também considerada como sua concentração bactericida.

**Tabela 7** - Atividade antibacteriana do extrato bruto da linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) isolada de *Justicia brandegeana* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Espécie	Extrato bruto			
	CIM	R.L.	%R.	CBM
<i>Echerichia coli</i>	8	9,38	100	8
<i>Salmonella</i> Enteritidis	8	6,59	69,7	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	9,03	100	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1,32	15,4	8
<i>Bacillus subtilis</i>	2	0,84	10,3	16

Legendas: CIM – Concentração Inibitória Mínima (mg/mL); CBM – Concentração Bactericida Mínima (mg/mL); R.L. – Redução Logarítmica Bacteriana (Log CFU/mL); %R. – Porcentagem de Redução Bacteriana comparada ao controle positivo (célula com mesmas condições de crescimento bacteriano sem tratamento com o extrato bruto).

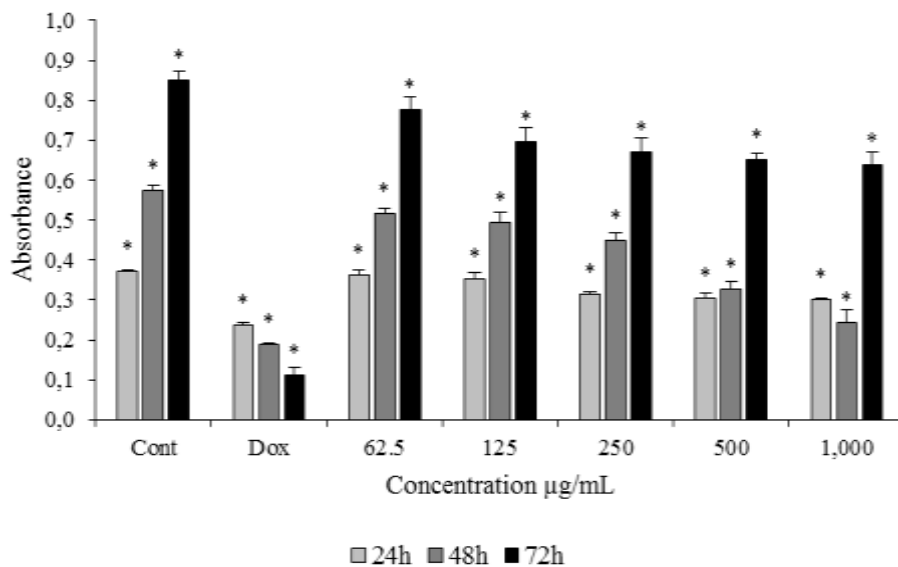
#### Determinação da atividade antioxidante e compostos fenólicos do extrato bruto

O extrato bruto da linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) apresentou atividade antioxidante em todas as metodologias utilizadas. A atividade antioxidante pelo método DPPH foi equivalente a 292,110  $\mu\text{mol}$  trolox/mg sendo este representado por 8,86% da atividade comparada ao trolox. Ao utilizar a metodologia do FRAP, foi possível observar uma atividade antioxidante de 250,88  $\mu\text{mol}$  trolox/mg comparada ao trolox, representando um equivalente de 48,43% da atividade. A metodologia ABTS apresentou melhor resultado antioxidante, com 52,43% da atividade antioxidante comparada ao trolox, com equivalente de 134,33  $\mu\text{mol}$  trolox/mg. Para os compostos fenólicos, a atividade foi de 238,890  $\mu\text{g}$  AGE/mg representando um equivalente de 13,14% quando comparado ao ácido gálico.

#### Ensaio antiproliferativo - Método MTT

Com os resultados obtidos neste ensaio foi possível avaliar a atividade antiproliferativa do extrato bruto da linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) contra as células

tumorais dos hepatócitos humanos HepG2/C3A. A Figura 8 apresenta as médias da absorbância e desvio padrão, onde a viabilidade celular das células tratadas são comparadas ao controle (100% de absorbância) e a Doxorrubicina. Os resultados foram significativos estatisticamente em todas as concentrações e nos três tempos avaliados quando comparado ao controle (célula sem extrato bruto) e em relação às células tratadas com Doxorrubicina. Após 24 horas de tratamento na concentração de 1.000 µg/mL, a viabilidade celular foi reduzida em 19,14% comparada ao controle. O  $CC_{50}$  para 48 horas foi de 750 µg/mL, sendo esta a concentração capaz de reduzir em 50% o tapete celular das células HepG2/C3A. Na concentração de 1.000 µg/mL ocorreu a redução de 42,41% na absorbância. Na concentração de 1.000 µg/mL com 72 horas de tratamento, a linhagem celular foi reduzida em 24,94%.



**Figura 8** Efeito citotóxico do extrato bruto extraído da linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) das folhas de *Justicia brandegeana* pelo método MTT, sobre a atividade enzimática mitocondrial succinato desidrogenase, em células HepG2/C3A, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, com  $10^4$  células/poço. Dox: Doxorrubicina, Cont: Controle. \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

O extrato do fungo endofítico JB06 apresentou atividade citotóxica contra as células tumorais de hepatócitos humanos, indicando que ocorreu uma redução da atividade mitocondrial celular por meio da avaliação da redução da absorbância na leitura realizada pelo

Leitor de placas de Elisa, indicando que ocorreu redução na proliferação e na viabilidade celular. Com isto, foi possível verificar que este extrato endofítico pode ser aplicado à saúde nos tratamentos de células tumorais.

## **Discussão**

A colonização dos fungos endofíticos está relacionado a diversos fatores como as condições ambientais e climáticas em que se encontra a planta, à sua idade entre outros fatores [42]. A frequência de isolamento da comunidade endofítica de *Justicia brandegeana* foi semelhante a obtida em outras angiospermas [33]. No trabalho realizado por Chougule e Andoji [8], foram isolados dez gêneros endofíticos de *Justicia adhatoda*, sendo os de maior frequência o gênero *Aspergillus*, nesta espécie de planta não foram encontrados nenhum gênero igual aos encontrados no presente trabalho, esta diferença pode estar relacionado as condições ambientais locais ou até mesmo pela espécie hospedeira que estes endofitos se encontram. Poucos trabalhos relatam sobre a planta *Justicia brandegeana* não sendo relatado nas bases de dados pesquisadas nenhum trabalho em que tenham sido isolados fungos endofíticos desta espécie vegetal.

O gênero *Colletotrichum* está amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado em diversas espécies de vegetais. Apresentam diversas espécies endofíticas que vivem em simbiose com seu hospedeiro [5, 49]. Conforme o trabalho realizado por Notarte et al. [29], os metabólitos isolados de espécies endofíticas deste gênero apresentam atividade antibacteriana, antioxidante e citotóxica. Além disso, foi verificado que estes compostos ainda apresentaram atividade antifúngica e antiviral, apresentando um grande potencial para as indústrias farmacêuticas.

No trabalho realizado por Savi et al. [42], o gênero *Diaporthe* foi o mais relatado nos estudos de isolamento de endófitos realizados entre 2012 a 2017, sendo eles encontrados em diferentes espécies de plantas de diferentes biomas brasileiros. Isso poderia estar relacionado às estratégias que estes endófitos desenvolveram para se proteger das defesas das plantas ou devido a sua capacidade de produzir compostos metabólicos que poderiam ser úteis para o desenvolvimento ou para a defesa de seu hospedeiro. Este gênero está amplamente distribuído entre os vegetais e presente em diversas partes de seu hospedeiro [5, 11, 42]. De acordo com De Carvalho et al. [11], o metabólito secundário produzido por endófitos deste gênero,

apresentaram atividade contra bactérias, fungos, protozoários, além de apresentarem outros compostos bioativos que poderiam ser utilizados no tratamento de diversas doenças.

*Mycoleptodiscus* é um gênero que pode ser encontrado como patógeno de plantas, sendo oportunista de animais, sapróbicos e como endófitos [20, 40]. O extrato bruto do endófito *Mycoleptodiscus indicus* isolado de *Echinacea purpurea* apresentou atividade larvicida contra *A. aegypti* e atividade antifúngica [40].

A espécie *Corynespora cassiicola* é considerado o agente causador da doença da queda da folha, sendo esta, uma doença fúngica muito importante de seringueiras na Ásia e na África. Essa espécie foi encontrada em plantações de seringueiras no Brasil sob a condição endofítica [13]. Esta espécie foi isolada de diversas espécies de plantas tropicais e subtropicais e, de diversas partes das plantas, além de já ter sido isolada de plantas medicinais como *Aquilaria sinensis* [13,23].

Esta variedade de espécies de fungos endofíticos presente em *J. brandegeana* pode significar um papel importante para o descobrimento de novas fontes alternativas de biomoléculas e substâncias com atividade biológica que ainda encontram-se inexploradas. Sabendo que a produção metabólica do endófito pode ser semelhante as substâncias presente nos metabólitos de seu hospedeiro.

Conforme Vieira et al. [49] a espécie *Flavodon flavus* é um fungo Basidiomycota raramente encontrado como endofítico. Poucos trabalhos mostram o isolamento do fungo endofítico *Flavodon flavus*. De acordo com o trabalho realizado por Brum et al. [5], foi possível isolar uma variedade de endófitos de *Vitis labrusca*, entre esses a espécie *Flavodon flavus*.

As fitoalexinas como a lathodoratina foram isolados anteriormente de uma espécie de ervilha a *Lathyrus odoratus* inoculada com o fungo *Helminthosporium carbonum*, e as estruturas incomuns de 3-etil-cromona foram atribuídos por espectroscopia [38]. Neste estudo foram detectados nos extratos acetato de etila por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , e os componentes mais voláteis presentes neste extrato foram identificados por CG-EM, obtidos da cultura do fungo endofítico *Mycoleptodiscus indicus* (JB06), compostos contendo um esqueleto carbônico similar a lathodoratina. Este extrato apresentou uma boa atividade como agente antioxidante e citotóxica contra células tumorais, mostrando o imenso potencial dos fungos endofíticos em produzir novos compostos bioativos [2]. Portanto, estes resultados sugerem a necessidade de

estudos químicos adicionais com este fungo, visando a produção destes compostos em maior quantidade para serem isolados, identificados e testados individualmente.

Considerando-se a avaliação da atividade antibacteriana do extrato bruto da linhagem endofítica JB06 (*Mycoleptodiscus indicus*) e, considerando-se que as atividades CIM foram superiores a 1 mg/mL, poder-se-ia desconsiderar a atividade bactericida do endófito. Diferentemente, os metabólitos secundários de outros fungos endofíticos apresentaram atividade antibacteriana contra cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas [15, 46]. Dissanayake et al. [14], observaram que o composto mycoleptodiscin B isolado de *Mycoleptodiscus* sp. apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas como *S. aureus* e *B. subtilis*. Diversos trabalhos mostram a atividade antibacteriana de extratos brutos e dos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos [1]. No entanto, ainda não havia sido avaliada, até onde temos conhecimento, a atividade antibacteriana do extrato bruto de endófitos do gênero *Mycoleptodiscus*.

O extrato bruto da linhagem endofítica *Mycoleptodiscus indicus* (JB06) apresentou atividade antioxidante pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS. Similarmente, Dzoyem et al. [15], observaram que os metabólitos secundários dos extratos do fungo endofítico *Epicoccum nigrum* associados com *Entada abyssinica*, apresentaram resultados satisfatórios, como agentes antioxidantes. Além disso, descobertas de novas moléculas com poder antioxidante nos extratos de fungos endofíticos têm sido observadas [46].

Existem pesquisas que mostram a atividade citotóxica dos extratos e dos isolados metabólicos produzidos por fungos endofíticos, podendo serem utilizados em diversos tratamentos, inclusive contra células cancerígenas [19, 42]. No entanto, até o nosso conhecimento, este é o primeiro relato da atividade citotóxica contra células tumorais de hepatócitos humanos HepG2/C3A, do extrato bruto acetato de etila da espécie *Mycoleptodiscus indicus*.

A produção de compostos bioativos pelos fungos endofíticos é um mercado promissor devido a alta capacidade de produção destes produtos por meio de biorreatores que podem facilitar e aumentar a sua produção conforme a necessidade do mercado. A produção em larga escala do extrato endofítico favorece a redução de áreas destinadas a plantação de árvores para a retirada destes biocompostos, devido a semelhança dos metabólitos secundários dos endófitos com os metabólitos de seus hospedeiros. Além de produzir metabólitos secundários

com atividades biológicas, os fungos endofíticos podem produzir biomoléculas que podem ser utilizadas em indústrias farmacêuticas. Sendo assim, a produção de extratos metabólitos por fungos endofíticos é uma alternativa economicamente e ecológica viável para o mercado consumidor.

## Conclusão

Este é o primeiro relato da ocorrência de fungos endofíticos em *Justicia brandegeana*. Por meio da análise multilocus MLSA foi possível identificar taxonomicamente 46 endófitos foliares desta espécie vegetal, no qual foram identificados cinco gêneros diferentes, com predominância do gênero *Colletotrichum*. Neste trabalho, a espécie endofítica *Mycoleptodiscus indicus* apresentou atividade biológica antioxidante e citotóxica contra células tumorais, com potencial biotecnológico aplicado à saúde.

## Declarações de interesse

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior da CAPES (Código Financeiro 001) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (307603 / 2017-2) e ao SETI / UGF. .65 / 2018) pelo apoio financeiro. Os autores agradecem também ao Complexo do Centro de Apoio à Pesquisa da Universidade de Maringá - Brasil (COMCAP-UEM).

## Referências

1. Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch, P (2010) Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity* 41(1):1-16. <https://doi:10.1007/s13225-010-0034-4>
2. Amorim MR, Somensi A, Araujo AR, Bonifácio BV, Bauab TM, Santos LC (2016) Compounds of *Anthostomella brabeji*, an Endophytic Fungus Isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 27(6):1048-1054.
3. Arnold AE, Lutzoni F (2007) Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88(3):541-549. <https://doi.org/10.1890/05-1459>
4. Berbee ML, Pirseyedi M, Hubbard S (1999) *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate



- dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91(6): 964-977.  
<https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061106>
5. Brum MCP, Araújo WL, Maki CS, Azevedo JL (2012) Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. *Genet. Mol. Res.* 11(4):4187-4197. <https://dx.doi.org/10.4238/2012>
  6. Carbone I, Kohn L (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91(3):553-556. <https://doi.org/10.2307/3761358>
  7. Castellani A (1963) The "water cultivation" of pathogenic fungi. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66:283-284.
  8. Chougule PM, Andoji Y (2015) Isolation and frequency distribution of endophytic fungi inhabiting *Justicia adhatoda* L. *Life Science Informatics Publications RJBPCS* 1(4):215. <https://doi.org/10.26479/2015.0104.07>
  9. CLSI / Clinical Laboratory Standards Institute (2012) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 9<sup>th</sup> ed. Approved Standard. CLSI Document M7-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
  10. Clough JM, Snell BK (1981) Confirmation of the structures of the phytoalexins lathodoratin and methyl-lathodoratin by synthesis. *Phytochemistry* 20(7):1752.
  11. De Carvalho CR, Ferreira, MC, Amorim SS, da Silva Florindo RH, de Assis JCS, Zani CL, Rosa LH (2019) Bioactive Compounds of Endophytic Fungi Associated with Medicinal Plants. *Data Quality and Trust in Big Data* 303-361. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14846-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14846-1_11)
  12. Damm U, Sato T, Alizadeh A, Groenewald JZ, Crous PW (2019) The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. *Studies in Mycology* 92:1-46. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.04.001>.
  13. Déon M, Scomparin A, Tixier A, Mattos CRR, Leroy T, Seguin M, Roeckel-Drevet P, Pujade-Renaud V, Pujade-Renaud V (2012) First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant cassiicolin genes recovered from rubber trees in Brazil. *Fungal Diversity* 54(1), 87-99. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0169-6>
  14. Dissanayake RK, Ratnaweera PB, Williams DE, Wijayarathne DC, Wijesundera RLC, Andersen RJ, de Silva ED (2016) Antimicrobial activities of mycoleptodiscin B isolated from endophytic fungus *Mycoleptodiscus* sp. of *Calamus thwaitesii* Becc. *J App Pharm Sci* 6(1):001-006. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.600101>
  15. Dzoyem J, Melong R, Tsamo AT, Maffo T, Kapche DGWF, Ngadjui BT, McGaw LJ, Eloff JN (2017) Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 27:251-253. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.011>
  16. Fu M, Crous PW, Bai Q, Zhang PF, Xiang J, Guo YS, Zhao FF, Yang MM, Hong N, Xu WX, Wang GP (2019) *Colletotrichum* species associated with anthracnose of *Pyrus* spp. in China. *Persoonia* 42:1-35. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.42.01>
  17. Glass NL, Donaldson G (1995) Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1323-1330.
  18. Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW (2013) *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia* -

- Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 31(1):1-41.  
<https://10.3767/003158513x666844>
19. Guo B, Wang Y, Sun X, Tang K (2008) Bioactive natural products from endophytes: a review. *Appl Biochem Microbiol* 44(2):136-142. <https://10.1134/S0003683808020026>
  20. Hernández-Restrepo M, Bezerra JDP, Tan YP, Wiederhold N, Crous PW, Guarro J, Gené J (2019) Re-evaluation of *Mycoleptodiscus* species and morphologically similar fungi. *Persoonia* 42:205-227. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.42.08>
  21. Ichikawa T, Ishikura T, Ozaki A (1971) Improvement of kasugamycin-producing strain by the Agar piece method and prototroph method. *Folia Microbiol* 16:218-224.
  22. Katoh K, Toh H (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9:286-298.
  23. Li T, Deng WQ, Li TH, Zhang WM, Hosen MI, Song B (2018) Endophytic fungal communities associated with leaves, stems and roots of four medicinal plants in South China. *Studies in Fungi* 3(1):126-140. <https://10.5943/sif/3/1/15>
  24. Li Y, Battersman CC, Skelton J, Jusino MA, Nolen ZJ, Simmons DR, Hulcr J (2017) Wood decay fungus *Flavodon ambrosius* (Basidiomycota: Polyporales) is widely farmed by two genera of ambrosia beetles. *Fungal Biology* 121(11):984-989.
  25. Liu F, Cai L, Crous PW, Damm U (2014) The *Colletotrichum gigasporum* species complex. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 33(1):83-97. <https://10.3767/003158514x684447>
  26. Joseph B, Priya M (2011) Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: a review. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 1(3):291-309.
  27. Ma X, Wu H, Liu L, Yao Q, Wang S, Zhan R, Xing S, Zhou Y (2011) Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. *Scientia Horticulture* 129:102-107. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.015>
  28. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
  29. Notarte KIR, Devanadera MKP, Mayor ABR, Cada MCA, Pecundo MH, Macabeo APG (2019) Toxicity, antibacterial, and antioxidant activities of fungal endophytes *Colletotrichum* and *Nigrospora* spp. isolated from *Uvaria grandiflora*. *Philippine Journal of Science* 148(3):505-512.
  30. Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
  31. O'Donnell K, Cigelnik E (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7:103-116.
  32. Oki Y, Fernandes GW, Correa Junior A (2008) Fungos: amigos ou inimigos? *Ciência Hoje* 252:64-66.
  33. Orlandelli RC, Alberto RN, Rubin Filho CJ, Pamphile, JA (2012) Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. *Genetics and Molecular Research* 11(2):1575-1585. <https://10.4238/2012.may.22.7>
  34. Palanichamy P, Krishnamoorthy G, Kannan S, Marudhamuthu M (2018) Bioactive potential of secondary metabolites derived from medicinal plant endophytes. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(4):303-312. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2018.07.002>

35. Polonio JC, Ribeiro MAS, Rhoden SA, Sarragiotto MH, Azevedo JL, Pamphile JA (2016) 3-Nitropropionic acid production by the endophytic *Diaporthe citri*: Molecular taxonomy, chemical characterization, and quantification under pH variation. *Fungal Biol* 120:1600-1608. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.08.006>
36. Mahbubur Rahman AHM, Wahida Afsana M, Rafiul Islam AKM (2014) Taxonomy and medicinal uses on *Acanthaceae* family of Rajshahi, Bangladesh. *Journal of Applied Science and Research* 2(1):82-93.
37. Rambaut A (2009) FigTree v1. 3.1: Tree figure drawing tool. Website: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
38. Robeson DJ, Ingham JL, Harborne JB (1980) Identification of two chromone phytoalexins in the sweet pea, *Lathyrus odoratus*. *Phytochemistry* 19:2171.
39. Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61(3):539-542.
40. Rosa LH, Tabanca N, Techen N, Wedge DE, Pan Z, Bernier UR, Becnel JJ, Agramonte NM, Walker LA, Morais RM (2012) Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with micropropagated medicinal Plant *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *American Journal of Plant Sciences* 3:1105-1114. <https://dx.doi.org/10.4236/ajps.2012.38133>
41. Santos JM, Vrandečić K, Čosić J, Duvnjak T, Phillips AJL (2011) Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 27(1):9-19. <https://10.3767/003158511x603719>
42. Savi DC, Aluizio R, Glienke C (2019) Brazilian Plants: An Unexplored Source of Endophytes as Producers of Active Metabolites. *Planta Med* 85:619-636. <https://10.1055/a-0847-1532>
43. Singleton VL, Rossi Jr JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3):144-158.
44. Souza AQL, Souza ADL, Filho AS, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO (2004) Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica* 34(2):185-195.
45. Steinrucken TV, Raghavendra AKH, Powell JR, Bissett A, Van Klinken RD (2017) Triggering dieback in an invasive plant: endophyte diversity and pathogenicity. *Australian Plant Pathol* 46:157-170.
46. Strobel G (2018) The emergence of endophytic microbes and their biological promise. *Journal of Fungi* 4(2):57. <https://10.3390/jof4020057>
47. Thompson SM, Tan YP, Shivas RG, Neate SM, Morin L, Bissett A, Aitken EAB (2015) Green and brown bridges between weeds and crops reveal novel *Diaporthe* species in Australia. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 35(1):39-49. <https://10.3767/003158515x687506>
48. U'Ren JM, Lutzoni F, Miadlikowska J, Elizabeth Arnold A (2010) Community analysis reveals close affinities between endophytic and endolichenic fungi in mosses and lichens. *Microb Ecolo* 60:340-353. <https://10.1007/s00248-010-9698-2>
49. Vieira MLA, Hughes AFS, Gil VB, Vaz ABM, Alves TMA, Zani CL, Rosa CA, Rosa LH (2012) Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community

- associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (*Solanaceae*). *Canadian Journal of Microbiology* 58(1):54-66. <https://10.1139/w11-105>
50. Yang Q, Fan XF, Guarnaccia V, Tian CM (2018) High diversity of Diaporthe species associated with dieback diseases in China, with twelve new species described. *Myckeys* 39:97-149.
51. White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego. pp. 315-322.

## ANEXO 1

Tabela 1. Sequências de artigos científicos comparadas com os fungos endofíticos isolados de *Justicia brandegeana*.

Espécie	Código de acesso ITS	Código de acesso Tubulina	Código de acesso GPD	Código de acesso Actina	Código de acesso Fator de alongação	Referência
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	MG748025	MG748107	MG747943	MG747715	---	Fu et al. 2019
	MG748026	MG748108	MG747944	MG747716		
	MG748027	MG748109	MG747945	MG747717		
	MG748036	MG748118	MG747954	MG747726	---	
<i>Colletotrichum siamense</i>	MG748037	MG74119	MG747955	MG747727		Fu et al. 2019
	MG748038	MG74120	MG747956	MG747728		
	KX853164	KX893580	KX893584	KX893576		
	KX8531665	KX893579	KX893583	KX893575	---	
<i>Colletotrichum camelliae-japonicae</i>	MG600718	MG600985	MG600781	MG600925	---	Fu et al. 2019
	MG600717	MG600984	MG600780	MG600924		
<i>Colletotrichum plurivorum</i>	KJ955215	KJ955361	KJ954916	KJ954483		Fu et al. 2019
	MG748063	MG748143	MG747981	MG747753	---	
	MG748064	MG748144	MG747982	MG747754		
<i>Colletotrichum karstii</i>	MG748065	MG748145	MG747983	MG747755		Fu et al. 2019
	JQ005776	---	JQ948677	JQ005839	---	
<i>Colletotrichum acutatum</i>	JQ005776	---	JQ948677	JQ005839	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum aenigma</i>	JX010244	JX010389	JX010044	JX009443	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum annellatum</i>	JQ005222	JQ005656	JQ005309	JQ005570		Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum aotearoa</i>	JX010205	JX010420	JX010005	JX009564	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum asianum</i>	FJ972612	JX010406	JX010053	JX009584	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum boninense</i>	JQ005153	JQ005588	JQ005240	JQ005501	---	Fu et al. 2019
	JQ005157	JQ005591	JQ005244	JQ005505		
<i>Colletotrichum brassicicola</i>	JQ005172	JQ005606	JQ005259	JQ005220	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum brevisporum</i>	JN050238	JN050244	JN050238	JQ005520	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum cacao</i>	MG600772	MG601039	MG600832	MG600976	---	Damm et al. 2019
<i>Colletotrichum cliviicola</i>	JX519223	JX519249	JX546611	JX519240	---	Fu et al. 2019
	GU109974	GU085869	GU085867	GU085861		
<i>Colletotrichum fructicola</i>	JX010165	JX010405	JX010033	FJ907426	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum gigasporum</i>	KF687736	KF687886	KF687841	KF687797	---	Liu et al. 2014
	KF687729	KF687870	KF687827	KF687798		
<i>Colletotrichum liaoningense</i>	KP890104	KP890111	KP890135	KP890097	---	Fu et al. 2019

<i>Colletotrichum lobatum</i>	MG600768	MG601035	MG600828	MG600972	---	Damm et al 2019
<i>Colletotrichum magnum</i>	MG600769	MG601036	MG600829	MG600973	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum musae</i>	JX010146	HQ596280	JX010050	JX009433	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum oncidii</i>	JQ005169	JQ005603	JQ005256	JQ005517	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	JQ948151	JQ949802	JQ948481	JQ949472	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum petchii</i>	JQ005223	JQ005657	JQ005310	JQ005571	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum phyllanthi</i>	JQ005221	JQ005665	JQ005308	JQ005569	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum torulosum</i>	JQ005164	JQ005598	JQ005251	JQ005512	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum truncatum</i>	GU227862	GU228156	GU228254	GU227960	---	Fu et al. 2019
<i>Colletotrichum vittalense</i>	MG600734	MG601001	MG600796	MG600940	---	Fu et al. 2019
<i>Diaporthe batatas</i>	KC343040	---	---	---	KC343766	Gomes et al. (2013)
<i>Diaporthe citri</i>	KC340051	---	---	---	KC343777	Gomes et al. (2013)
<i>Diaporthe convolvuli</i>	KC343054	---	---	---	KC343780	Gomes et al. (2013)
<i>Diaporthe endophytica</i>	KC343065	---	---	---	KC343791	Gomes et al. (2013)
<i>Diaporthe infecunda</i>	KC343127	---	---	---	KC343853	
	KC343128	---	---	---	KC343854	Gomes et al. (2013)
	KC343129	---	---	---	KC343855	
<i>Diaporthe leucospermi</i>	KT323120	---	---	---	---	Steinrucken et al. 2017
<i>Diaporthe longicolla</i>	KJ590728	---	---	---	KJ590767	Santos et al. (2011)
	HM347711	---	---	---	HM347682	
<i>Diaporthe melonis</i>	KC343141	---	---	---	KC343867	
	KC343142	---	---	---	KC343868	Gomes et al. (2013)
<i>Diaporthe miriciae</i>	KJ197282	---	---	---	KJ197244	Yang et al. 2018
	KJ197283	---	---	---	KJ197245	Thompson et al. (2015)
<i>Diaporthe novem</i>	KC343155	---	---	---	KC343881	Gomes et al. 2013
	KC343156	---	---	---	KC343882	
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	KC343174	---	---	---	KC343900	
	KC343175	---	---	---	KC343901	Gomes et al. (2013)
	KC343176	---	---	---	KC343902	
<i>Diaporthe sojae</i>	KC343196	---	---	---	KC343922	Gomes et al. (2013)
<i>Monilochaetes infuscans*</i>	JQ005780	JQ005864	JX546612	JQ005843	---	Fu et al. (2019)
<i>Diaporthe corylina**</i>	KC340304	---	---	---	KC343730	Gomes et al. 2013
<i>Flavodon ambrosius</i>	LC216225	---	---	---	---	Li et al. (2017)
<i>Flavodon ambrosius</i>	LC216226	---	---	---	---	Li et al. (2017)
<i>Flavodon ambrosius</i>	LC216227	---	---	---	---	Li et al. (2017)

<i>Mycoleptodiscus endophytica</i>	NR_158860.1	---	---	---	---	GenBank
<i>Mycoleptodiscus suttonii</i>	MK487753.1	---	---	---	---	GenBank
<i>Mycoleptodiscus terrestris</i>	MK487754.1	---	---	---	---	GenBank
<i>Mycoleptodiscus terrestris</i>	MK487755.1	---	---	---	---	GenBank
<i>Corynespora torulosa</i>	MH866095.1	---	---	---	---	GenBank
<i>Corynespora leucadendri</i>	KF251150.1	---	---	---	---	GenBank
<i>Corynespora olivacea</i>	MH860855.1	---	---	---	---	GenBank
<i>Hyphodermella corrugata</i>	FN600377.1	---	---	---	---	GenBank
<i>Hyphodermella corrugata</i>	FN600375.1	---	---	---	---	GenBank
<i>Hyphodermella rosae</i>	FN600386.1	---	---	---	---	GenBank
<i>Phanerochaete sp.</i>	ZLY-2010	---	---	---	---	GenBank
<i>Flavodon flavus</i>	FJ478126.1	---	---	---	---	GenBank
<i>Flavodon flavus</i>	FJ010207.1	---	---	---	---	GenBank
<i>Aspergillus niger</i>	KU729038.1	---	---	---	---	GenBank

\*Grupo externo utilizado para *Colletotrichum* sp.; \*\* Grupo externo utilizado para *Diaporthe* sp.

## ANEXO 2

### **Current Microbiology**

Editor-in-Chief: Erko **Stackebrandt**

ISSN: 0343-8651 (print version)

ISSN: 1432-0991 (electronic version)

Journal no. 284

Instructions for Authors

#### TYPES OF PAPERS

Original Papers, Review Papers, Letters, etc

#### OFFPRINTS

25 offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

#### MANUSCRIPT SUBMISSION

##### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

##### Online Submission



Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen. Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

## Materials and Methods

The Materials and methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work.

**NEW:** As of July 2017, all descriptions of novel Archaeal and Bacterial taxa must be accompanied by an entry in the Digital Protologue Database DPD ([Link](#)) and authors must include the respective Taxon Number in the text. For more information please read this editorial [The microorganisms used in the study](#) and in particular new isolates must be deposited in a publicly accessible culture collection belonging to the WDCM (e.g. DSM, ATCC, NCIMB; see the below [Link](#) for a complete list of the WDCM culture collections which are all suitable). The authors must refer to the collection and the strain number in the text to ensure that the strains are available to other scientists. If nucleic acid or amino acid sequences are presented (this includes also optimized sequences of known genes), a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and/or amino acid sequence data must be included in a separate paragraph at the end of the Materials and methods section. Huge sequencing datasets or raw data must also be deposited, e.g. as a NCBI BioProject (via the [Link](#) below). For studies in proteomics, the minimum information about a proteomics experiment (MIAPE) of the HUPO proteomics standard initiative (see the [Link](#) below) and publication guidelines for the analysis and documentation of peptide and protein identifications by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (at the below [Link](#)) must be followed up. One biological replicate will not be acceptable.

For X-ray crystallographic analyses of proteins (enzymes), the authors should obtain each PDB ID to one structure of protein from PDB (The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)) and add it to the manuscript just like as nucleotide accession numbers. For commercial sources of used materials, the name of the company, town and country should be indicated.

WDCM culture collections

NCBI Bio Project

HUPO proteomics standard initiative

American Society for Biochemistry and Molecular Biology guidelines

## TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

\*The name(s) of the author(s) must be formatted as ‘full first name, middle initial, full last name’

or John W. Doe

\*A concise and informative title

\*The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

\*The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

## GENOME SEQUENCING DATA

Authors are requested to provide full genome sequencing data along with their description of a new taxon. If it's not possible to obtain sequence data please give a short explanation on the reasons in your cover letter. Submissions without genome sequencing data will be evaluated on a case-by-case basis.

## TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

The text of a research paper should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest, and References.

Materials and Methods must include statement of Human and Animal Rights.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

### Acknowledgments and Funding Information

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full. In addition, please provide the funding information in a separate step of the submission process in the peer review

system. Funder names should preferably be selected from the standardized list you will see during submission. If the funding institution you need is not listed, it can be entered as free text. Funding information will be published as searchable metadata for the accepted article, whereas acknowledgements are published within the paper.

## SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units). Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

Genus and species names should be in italics.

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention. Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols, etc.: Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities

Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative) Bold for vectors, tensors, and matrices.

#### MANUSCRIPT LENGTH

1. The manuscript should not be longer than 12 pages, double spaced, including Figures and Tables. The 12-page limit does not include references. 2. The references should be listed alphabetically, then numbered.

#### REFERENCES

##### Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

##### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference

list. The entries in the list should be numbered consecutively. Journal article Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955->

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

#### Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086> Book South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

#### Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

#### Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

#### Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California  
Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN

#### List of Title Word

Abbreviations, see ISSN.org LTWA If you are unsure, please use the full journal title. For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of intext citations and reference list.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer’s LaTeX macro package.

## TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order. For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table. Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

### Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps. Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading. Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size. All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide. Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Halftone Art Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc. If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves. Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

### Combination Art

### Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent. If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

#### Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt). Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc. Do not include titles or captions within your illustrations.

**Figure Numbering** All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

#### Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file. Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type. No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption. Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs. Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible. When preparing your figures, size figures to fit in the column width. For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm. For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements) Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

### ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form. Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

### Submission



Supply all supplementary material in standard file formats. Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author. To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

#### Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

#### Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. A collection of figures may also be combined in a PDF file. Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel). Specialized Formats Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

#### Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

#### Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables. Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”. Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

#### Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file. Processing of supplementary files Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that.

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material.

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

### MATERIALS AND METHODS

The Materials and methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work.

**NEW:** As of May 2017 all descriptions of novel Archaeal and Bacterial taxa must be accompanied by an entry in the Digital Protologue Database DPD ([Link/](#)) and authors must include the respective Taxon Number in the text. For more information please read this editorial/

The microorganisms used in the study and in particular new isolates must be deposited in a publicly accessible culture collection belonging to the WDCM (e.g. DSM, ATCC, NCIMB; see the below [Link](#) for a complete list of the WDCM culture collections which are all suitable). The authors must refer to the collection and the strain number in the text to ensure that the strains are available to other scientists. If nucleic acid or amino acid sequences are presented (this includes also optimized sequences of known genes), a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and/or amino acid sequence data must be included in a separate paragraph at the end of the Materials and methods section. Huge sequencing datasets or raw data must also be deposited, e.g. as a NCBI BioProject (via the [Link](#) below). For studies in proteomics, the minimum information about a proteomics experiment (MIAPE) of the HUPO proteomics standard initiative (see the [Link](#) below) and publication guidelines for the analysis and documentation of peptide and protein identifications by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (at the below [Link](#)) must be followed up. One biological replicate will not be acceptable. For X-ray crystallographic analyses of proteins (enzymes), the authors should obtain each PDB ID to one structure of protein from PDB (The

Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)) and add it to the manuscript just like as nucleotide accession numbers. For commercial sources of used materials, the name of the company, town and country should be indicated.

WDCM culture collections

NCBI Bio Project

HUPO proteomics standard initiative

American Society for Biochemistry and Molecular Biology guidelines

## ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider: Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity. Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English. Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.

Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted. If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

## ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct. Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include\*: The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration. The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism')).

A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing'). Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers. Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data. No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

**Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.**

Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate). Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person. Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include

creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).

Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

\*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights. Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded. If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following

COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to: If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author. If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction: - an erratum/correction may be placed with the article - an expression of concern may be placed with the article - or in severe cases retraction of the article may occur. The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article. The author's institution may be informed A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

#### Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

#### AUTHORSHIP PRINCIPLES

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to. Authorship clarified The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted. The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their] specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines\*: All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;

- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. \*

Based on/adapted from:

ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors, Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt et al., PNAS February 27, 2018

#### Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or nonfinancial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate). The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

#### Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions. Role of the Corresponding Author

**One author** is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

### The Corresponding

Author is responsible for the following requirements: ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors; managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;

\* providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor; making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

\* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

### Author contributions

Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions regarding contribution statements. In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

### **Examples of such statement(s) are shown below:**

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing –



review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],.... For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work. For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author: A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006

#### Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not** accepted **after acceptance** of a manuscript. **Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!** Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current. Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

#### Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

#### Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peerreview process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

**Authorship issues or disputes** In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

**Confidentiality** Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

#### COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals. Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

**Research involving Human Participants and/or Animals Informed consent** Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully. The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the abovementioned guidelines.

#### DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following: Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research. The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here: The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s). See below examples of disclosures:

**Funding:** This study was funded by X (grant number X).

**Conflict of Interest:** Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z. If no conflict exists, the authors should state: Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

## RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

### 1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the name of the ethics committee that granted the exemption and the reasons for the exemption). Authors must - in all situations as described above - include the name of the ethics committee and the reference number where appropriate. The following statements should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee (include name of committee + reference number) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

### **Ethical approval retrospective studies**

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethical approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should

check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

## 2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists). Please provide the name of ethics committee and relevant permit number. For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.” If applicable (where such a committee exists):

“All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.(include name of committee + permit number)” If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

## INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential

for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning. The following statement should be included:

**Informed consent:** “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.” If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included: “Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

#### AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

#### Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

#### Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

#### Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs. Proof reading The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and

accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

### Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

### OPEN CHOICE

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication. Article processing charges (APCs) vary by journal – view the full list

#### Benefits:

Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication. Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average\*. Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications. It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information. \*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018. Open Choice Funding and Support pages  
Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License. Find more about the license agreement.

## CAPÍTULO 2

**Extrato metabólico do fungo endofítico *Flavodon flavus* isolados de *Justicia brandegeana* no controle de *Alicyclobacillus acidoterrestris***

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Industrial Crops and Products*.



**Extrato metabólico do fungo endofítico *Flavodon flavus* isolados de *Justicia brandegeana* no controle de *Alicyclobacillus acidoterrestris***

<sup>1</sup>Angela Aparecida Silva, <sup>1</sup>Julio Cesar Polonio, <sup>1</sup>Andressa Domingos Polli, <sup>1</sup>João Arthur dos Santos de Oliveira, <sup>1</sup>Lilian Capelari Soares, <sup>1</sup>Verci Alves de Oliveira Junior, <sup>1</sup>Veronica Elisa Pimenta Vicentini, <sup>2</sup>Arildo José Braz de Oliveira, <sup>3</sup>José Eduardo Gonçalves, <sup>2</sup>Regina Aparecida Correia Gonçalves, <sup>4</sup>João Lúcio Azevedo, <sup>1</sup>João Alencar Pamphile, <sup>5\*</sup>Benício Alves de Abreu Filho

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmaceuticas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

<sup>3</sup>Programa de Mestrado em Promoção da Saúde e Programa de Mestrado em Tecnologias Limpas, Centro Universitário de Maringá, Avenida Guedner, 1610, CEP: 87050-900, Maringá, Paraná, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Genética - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, CEP: 13418-260, Piracicaba, São Paulo, Brasil

<sup>5</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, CEP: 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

\*Autor correspondente: Tel.: +55 (44) 3011-4955; Fax: +55 (44) 3011-5941. Endereço de e-mail: baafilho@uem.br

## **RESUMO**

Os fungos endofíticos apresentam grande potencial como produtores de compostos bioativos. *Alicyclobacillus acidoterrestris* é um bacilo que possui a capacidade de deteriorar bebidas acidificadas e sucos cítricos industrializados, como o suco de laranja. O suco de laranja industrializado é um produto extremamente importante no âmbito do setor comercial. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do extrato bruto (EB) da

linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) isolada das folhas de *Justicia brandegeana* contra formas vegetativas e esporuladas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (CBMAI 0244<sup>T</sup>), sozinho e combinado com a nisina. Os componentes do EB foram analisados por meio cromatografia GC-MS e por RMN. As análises antibacterianas do EB e da nisina foram realizadas por meio da microdiluição. A concentração inibitória mínima (CIM) do EB e da nisina contra as formas vegetativas de *A. acidoterrestris* foram de 250 µg/mL e 31,5 µg/mL, respectivamente. A concentração bactericida mínima (CBM) foi de 1.000 µg/mL para o EB e de 62,5 µg/mL para a nisina. Para os esporos de *A. acidoterrestris*, com tratamento do EB na concentração de 500 µg/mL ocorreu uma redução de 47%, enquanto que a nisina em 62,5 µg/mL foi possível reduzir 100% do crescimento após período de incubação. A avaliação combinada *in vitro* do EB com a nisina pelo método *Checkerboard* contra *A. acidoterrestris*, apresentou uma interação sinérgica entre os dois compostos. As análises das atividades antibacterianas do EB em suco de laranja reconstituído a 11 °Brix contra as células vegetativas e esporos de *A. acidoterrestris* apresentaram melhores resultados quando se combinou o EB com a nisina. A análise da citotoxicidade e da viabilidade celular realizado pelo método MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) apresentou maior seletividade contra as células bacterianas ao combinar o EB com a nisina, tanto nas avaliações *in vitro*, como nas avaliações em suco de laranja. Conforme resultados apresentados em nosso trabalho, ficou evidente que o EB da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) apresenta importante potencial biotecnológico na indústria de alimentos, visando o tratamento de sucos de laranja para o controle de *A. acidoterrestris*.

**Palavras-chave:** *Fungo endofítico*, extrato endofítico, *Flavodon flavus*, suco de laranja, sinergismo, álcool feniletílico.

### Highlights

- Presença de álcool feniletílico no extrato bruto do endófito *Flavodon flavus*.
- Ação antibacteriana do extrato endofítico contra *Alicyclobacillus acidoterrestris*.
- Ação sinérgica do extrato bruto com nisina contra *Alicyclobacillus acidoterrestris*.
- Ação esporicida do extrato bruto endofítico contra *Alicyclobacillus acidoterrestris*.
- Extrato endofítico em suco de laranja com ação em *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

## 1. Introdução

O suco de laranja industrializado representa cerca de 0,91% do mercado de bebidas mundial, sendo este produto extremamente importante no âmbito do setor comercial (Fava Neves e Trombin, 2017). O mercado consumidor vem ficando cada vez mais rigoroso quanto a busca por produtos naturais e seus derivados. Desde os tempos mais antigos, o homem procura na natureza compostos que apresentam atividades biológicas para usos medicinais e como conservante de alimentos.

Em sucos de frutas concentrados acima de 18 °Brix o *A. acidoterrestris* não consegue se desenvolver devido à alta concentração de sólidos solúveis presente no mesmo (Chang e Kang, 2004). No entanto, quando o suco de fruta é reconstituído para sua comercialização, o ambiente no qual ele se encontra torna-se favorável ao seu desenvolvimento. Portanto, é importante uma avaliação constante do produto final e, tratamento eficiente que consiga eliminar as formas vegetativas e esporuladas de *A. acidoterrestris*, garantindo assim a qualidade do produto.

*Alicyclobacillus acidoterrestris* é um bacilo Gram-positivo, não patogênico, acidotermorresistente, formador de endósporos que possui a capacidade de deteriorar bebidas acidificadas e sucos cítricos industrializados (Walker e Phillips, 2005). Um dos fatores que lhes conferem resistência em sobreviver a altas temperaturas e baixo pH está relacionado à constituição de sua membrana que é formada por ácidos graxos cíclicos e sua habilidade em formar esporos em condições desfavoráveis à realização de seu metabolismo (Fernández et al., 2017; Walker e Phillips, 2005). *A. acidoterrestris* pode sobreviver ao processo de pasteurização e causar um sabor e odor desagradável no produto pela produção do 2-methoxyphenol (guaiacol), 2,6-dibromofenol e 2,6-diclorofenol, tornando o produto inutilizável, resultando em perdas econômicas consideráveis (Anjos et al., 2018; Nakano et al., 2015).

Em 1928, Alexander Fleming descobriu a penicilina que é um antibiótico produzido pelo fungo *Penicillium notatum*, desde então a busca por novos compostos antimicrobianos vem intensificando cada vez mais. Os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos apresenta grande representatividade neste mercado. A palavra endofítico é de origem grega (“endo”= dentro; “phytón”= planta) e são representados pelos micro-organismos

que vivem dentro de órgãos e tecidos dos vegetais habitando os espaços intercelulares e intracelulares, durante todo seu ciclo de vida sem lhes causar doenças (Felber et al., 2015; Kusari et al., 2012).

A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* com ação contra bactérias Gram positivas incluindo *A. acidoterrestris*. Ela foi liberada pela Food and Drug Administration (FDA) desde 1969. Vários estudos apontam sua ação como inibidora do crescimento de *A. acidoterrestris* em suco de laranja e em bebidas acidificadas (Anjos et al., 2016; Huertas et al., 2014; Pascoli et al., 2018).

Existem diversos compostos bioativos já conhecidos produzidos por fungos endofíticos, dentre eles podemos citar os compostos anticancerígenos paclitaxel (taxol) (Stierle et al., 1993) e podofilotoxina (Eyberger et al., 2006), e antidepressivos hiperina e emodina (Kusari et al., 2008). Existem ainda, diversas pesquisas que evidenciam a atividade biológica dos metabólitos endofíticos como agentes antioxidantes, antiparasitários, anti-inflamatória, antivirais, antifúngica, imunossupressora e antibacterianos (Savi et al., 2019; Yuan et al., 2014; Zhang et al., 2011).

Os fungos endofíticos apresentam grande potencial como produtores de compostos bioativos que podem ser isolados e purificados. Esses metabólitos secundários podem ser utilizados em diversas áreas da saúde humana e animal, ou como conservantes em alimentos, além de outras aplicações biotecnológicas (Balakumaran et al., 2015; Savi et al., 2019). Os metabólitos dos fungos endofíticos apresentam atividades biológicas semelhantes à sua planta hospedeira com funções biológicas análogas (Kusari et al., 2009). Sendo assim, o extrato metabólico de fungos endofíticos representam uma alternativa promissora na produção de metabólitos secundários com aplicações biotecnológicas em escala industrial por meio de reatores biológicos.

O potencial antibacteriano presente nos extratos dos fungos endofíticos podem representar uma nova opção como conservante de origem natural com aplicação na indústria alimentícia como por exemplo em sucos de laranja, que necessitam de tratamentos para garantir a sua qualidade, prolongar seu tempo de prateleira e garantir a segurança alimentar.

Por este motivo, este trabalho tem como objetivo investigar a ação antibacteriana do extrato bruto da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) isolada de *Justicia*

*brandegeana* contra formas vegetativas e esporuladas de *A. acidoterrestris in vitro* em suco de laranja industrializado e reconstituído, bem como sua ação combinada com a nisina.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Fungo endofítico e condições de cultura

A linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) foi isolada das folhas maduras assintomáticas e não danificadas coletadas no mês de julho de 2015 (precipitação: 12.7 mm; temperatura média: 21 °C; umidade relativa: 70%.) de *Justicia brandegeana*, localizada no câmpus da Universidade Estadual de Maringá – Paraná (23°24' S 51°56' W). A precipitação durante o mês da coleta foi de 12.7 mm, a temperatura média 21 °C e a umidade relativa foi de 70%. A linhagem endofítica pertencente à Coleção de Micro-organismos Endofíticos e do Ambiente, vinculado ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, da Universidade Estadual de Maringá (LBIOMIC)-UEM. Este fungo encontra-se estocado em frasco âmbar pelo método Castellani (1963). O fungo selecionado foi retirado assepticamente e transferido para placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) (HiMedia®, Mumbai, India) com período de incubação de 7 dias à 28 °C, e repicado antes de cada experimento.

### 2.2. Extração de DNA e Análise filogenética

A extração genômica do DNA, a amplificação e a análise filogenética foram realizadas conforme Polonio et al. (2016). O DNA genômico foi extraído utilizando PowerSoil® DNA Isolation KIT (MO BIO Laboratories, Inc.), seguindo as especificações do fabricante. A amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 foi realizada com os primers ITS1 e ITS4 como descrito por White et al. (1990). A purificação dos *amplicons* obtidos com as enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) e *Exonuclease I* (EXO) foi realizada de acordo com Specian et. al (2016). Os amplicons foram posteriormente sequenciados por ACTGene Análises Moleculares Ltd. (Ludwigbiotec).

O resultado do sequenciamento foi verificado quanto a sua qualidade, utilizando o software BioEdit Sequence Alignment v.7.2.2. A sequência foi comparada com outras depositadas no GenBank e, após a obtenção das espécies com maior similaridade, baseado no

estudo de filogenia apresentados por Wu et al. (2017) (estudo ID 20276; (<http://purl.org/phylo/treebase/>) foram selecionadas espécies próximas do clado Phanerochaetaceae e Tyromyces utilizando a ferramenta *Organism optional* do BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para análise filogenética, as sequências resgatadas foram alinhadas utilizando a ferramenta ClustalW no programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013) empregando o método *Maximum Likelihood* baseado no modelo de Jukes-Cantor com 10.000 repetições (Saitou; Nei, 1987). A linhagem *Riopa metamorphosa* (NR 147661.1) foi utilizada como grupo externo.

### 2.3. Preparação do extrato bruto (EB)

O endófito foi repicado em placas de Petri contendo meio BDA e incubadas à 28 °C por 7 dias. Em seguida, foi realizado um subcultivo de 3 a 4 fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> do meio contendo micélio fúngico em Erlenmeyers com 250 mL de caldo batata dextrose (BD) (HiMedia®, Mumbai, Índia) com pH 6,6, e incubados a 28 °C por 21 dias em condições estacionárias.

A fração micelial foi retirada do fermentado por meio da filtração em gaze, processo repetido por três vezes. O fermentado foi submetido à partição líquido-líquido por meio de um funil de separação e extraído com Acetato de Etila (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) em uma proporção de 1:5. Logo após, a fase orgânica foi separada do solvente por meio de um evaporador rotativo (Tecnal TE-210) a 38 °C. O extrato endofítico foi estocado a 4 °C em frascos hermeticamente fechados e protegidos da luz.

### 2.4. Caracterização do Extrato Bruto dos Fungos Endofíticos

#### 2.4.1. Análise dos componentes voláteis do extrato bruto por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

O extrato para a análise consistiu de 5 mg do extrato bruto (EB) em 100 µL de anidrido acético e 80 µL de TFA (Ácido Trifluoroacético), e mantido em estufa a 50 °C por 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados 0,5 mL de acetona, logo após a amostra foi secada com fluxo de ar. A amostra foi extraída por partição em 2 mL de água e

diclorometano, com posterior separação da fase orgânica por evaporação. No momento da análise por CG/EM, a amostra foi diluída em 500 µL de diclorometano.

A análise dos constituintes voláteis acetilados nos extratos brutos foi realizada em um espectrômetro de massa da cromatografia a gás da Hewlett-Packard (GC-MS) sistema 7890B acoplado com Espectrometria de Massa Agilent 5977A MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). A coluna capilar de sílica fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; Agilent Technologies, EUA) foi diretamente acoplada à peça MS. A temperatura do forno foi programada a partir de 90 °C a 200 °C com uma taxa de 3 °C/min, mantida a 200 °C durante 5 minutos, após aumento para 280 °C com uma taxa de 10 °C/min e mantida em 280 °C por 5 minutos. As temperaturas nas portas do injetor e do detector foram ajustadas em 250 °C e 280 °C, respectivamente. O modo de divisão com uma razão de divisão de 1:20 foi usado na separação. 1 mL de 1% de solução de extrato bruto diluído em diclorometano foi injetado no sistema GC-MS. 70 V de impacto de elétrons foram adotados e a faixa de varredura em massa foi ajustada de 29 a 300 amu em varredura completa. O software HP ChemStation foi adaptado para analisar espectros de massa e cromatogramas. Os componentes voláteis dos extratos brutos foram identificados comparando seus espectros de massa com os de uma biblioteca de computadores (biblioteca Wiley e NIST)

#### 2.4.2. *Análise de Ressonância Magnética Nuclear*

O extrato de acetato de etila (5 mg) foi dissolvido em 700 µL de clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>, 99,9%). Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram registrados a 298 K utilizando um Espectrômetro Bruker (modelo Advance III HD) operando a 500 MHz para o núcleo <sup>1</sup>H e 125 MHz para o núcleo <sup>13</sup>C e utilizando as sequências de impulso padrão do software Bruker. Os desvios químicos (δ) foram expressos em partes por milhão. O tetrametilsilano (TMS) foi usado como referências internas (δ, 0 ppm).

#### 2.5. *Cepa bacteriana e suspensão de esporos*

O *Alicyclobacillus acidoterrestris* (CBMAI 0244<sup>T</sup>) foi adquirido da CBMAI (Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms) e estocado em meio BAT (*Bacillus acidoterrestris*) (Deinhard et al., 1987) com pH 4,0 contendo 30% de glicerol à -20

°C no Laboratório de Microbiologia da Água, Ambiente e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá-UEM.

Para a preparação dos esporos, o *A. acidoterrestris* foi cultivado em caldo BAT e incubados à 45 °C por 120 horas até atingir a formação de 80% dos esporos que foi avaliado por meio de microscopia. Em seguida, a suspensão de esporos foi centrifugada a 9500 g por 3 min, e lavadas em água deionizada autoclavada por três vezes e estocadas a 4 °C até sua utilização.

#### 2.6. Determinação da Atividade antibacteriana dos extratos bruto e da nisina

A atividade antibacteriana foi determinada por meio da diluição seriada em placas de 96 poços (TPP® – Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) conforme recomendações da Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI M7-A9, 2012) com modificações. Foi avaliada a atividade antibacteriana do EB da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) e da nisina nas concentrações de 15,6 a 1,000 µg/mL. Neste experimento foi possível avaliar a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração bactericida mínima (CBM) e a concentração esporicida mínima (CEM).

Em cada poço foi admitido um volume final de 100 µL (meio de cultura BAT, droga avaliada mais solubilizante). O EB do endófito foi solubilizado em Tween 80 na concentração de 0,05% (v/v). A nisina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Mo., U.S.A.) foi adquirida comercialmente e, a partir dela foi preparada uma solução estoque em ácido clorídrico (HCl) à 0,02 M e esterilizada em membrana de 0,22 µm (Millipore, São Paulo, Brazil).

A suspensão do inóculo bacteriano foi padronizada utilizando a escala de MacFarland 0.5 conforme preconiza a Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI M7-A9, 2012). Após diluições, foram adicionados 5 µL do inóculo bacteriano (célula vegetativa ou esporos) ajustado em  $5 \times 10^4$  UFC/mL por poço. A placa foi incubada à 45 °C por 24 horas. Foi realizado um controle de esterilidade do meio e um controle contendo apenas o inóculo bacteriano (célula vegetativa e esporos) e meio BAT para avaliar o crescimento celular de *A. acidoterrestris*.

Para os esporos, após período de incubação, foi realizado um choque térmico em banho de água (Nova Técnica, Piracicaba, Brazil) na temperatura de 80 °C por 10 min para



sua ativação. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir visivelmente o crescimento do inóculo na microplaca (ação bacteriostática).

Para a determinação da CBM e da CEM foi realizado um subcultivo de 10 µL em placa com meio BAT em triplicata para a avaliação da viabilidade celular e contagem do crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 45 °C por 24 horas. A CBM foi determinada como a concentração capaz de inibir o crescimento de *A. acidoterrestris* depois da sua inoculação e incubação a 45 °C por 24 horas. A CEM foi determinada como a concentração capaz de reduzir ou inibir o crescimento das colônias bacterianas comparada ao controle positivo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 2.7. Aplicação do Extrato Bruto e da Nisina no Suco de laranja reconstituído

O suco de laranja concentrado (aproximadamente 65 °Brix) utilizado em nossos ensaios foi adquirido comercialmente. Primeiramente foi realizado uma avaliação para garantir que o suco concentrado estivesse livre de contaminação por *Alicyclobacillus* spp. O suco de laranja foi reconstituído com água estéril para obter uma concentração de aproximadamente 11 °Brix. Este ensaio foi realizado em placas de 24 poços (TPP® – Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) contendo 5 mL de suco de laranja reconstituído. As drogas avaliadas (extrato bruto endofítico e nisina) para as células vegetativas foram preparadas nas concentrações de 1xCIM, 2xCIM, 4xCIM, 8xCIM e 16xCIM. Para os esporos, as concentrações das drogas avaliadas variaram de 31,25-1.000 µg/mL. O extrato bruto (EB) foi solubilizado com Tween 80 a 0,05% (v/v). Foi realizado um controle utilizando apenas o suco de laranja reconstituído contaminado com o microrganismo nas mesmas condições do tratado. Em seguida, foi adicionado o inóculo de *A. acidoterrestris* (células vegetativas e esporos) na concentração de  $5 \times 10^4$  UFC/mL por poço, seguido de incubação à 45 °C por 24 horas. Para os esporos, após período de incubação no suco de laranja, foi dado choque térmico em banho de água na temperatura de 80 °C por 10 min para sua ativação. Logo após este período, foi realizado um subcultivo em placas de ágar BAT e incubados a 45 °C por 24 horas para avaliação da redução bacteriana comparado ao controle (células vegetativas e esporos). Os ensaios foram realizados em triplicata.

## 2.8. Combinações antibacterianas

As combinações antibacterianas foram testadas em meio caldo BAT e em suco de laranja reconstituído à 11 °Brix.

**Ensaio “in vitro”:** O método *Checkerboard* foi utilizado para avaliar a atividade antibacteriana no meio BAT contra as formas vegetativas de *A. acidoterrestris* combinando o EB endofítico com a nisina. Este ensaio foi realizado conforme Schelz et al. (2006) em microplaca de 96 poços para a obtenção do índice da concentração fracionária inibitória (FIC). As concentrações avaliadas para o EB da linhagem endofítica foram de 7,81-500 µg/mL, e para a nisina as concentrações avaliadas foram de 0,97-500 µg/mL. Neste ensaio, foram realizadas diluições seriadas 1:2 e admitido um volume final em cada poço de 100 µL. No eixo x foram aliquotadas a solução de nisina, e no eixo y o EB endofítico. Ao término das diluições foram adicionados 5 µL da suspensão bacteriana na concentração de  $5 \times 10^4$  UFC/mL por poço e incubadas a 45 °C por 24 horas. O índice FIC das soluções A (EB) e B (nisina) foram calculados por meio da fórmula  $FIC = FIC_A + FIC_B$ , onde o  $FIC_A = CIM_A$  combinado dividido pelo  $CIM_A$  sozinho e o  $FIC_B = CIM_B$  combinado dividido pelo  $CIM_B$  sozinho. Com estes resultados, foram possíveis avaliar os efeitos combinados dos agentes antibacterianos, sendo eles: ação sinérgica ( $FIC_{total} \leq 0.5$ ), ação aditiva ( $0.5 \leq FIC_{total} \leq 1$ ), ação indiferente ( $1 < FIC_{total} \leq 4$ ) ou ação antagônica ( $FIC > 4$ ) (Gutierrez et al., 2008). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

**Ensaio no suco de laranja reconstituído:** A avaliação da ação antibacteriana do EB endofítico combinado com a nisina foi realizado em placas de 24 poços (TPP® – Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) contendo 1 mL da solução (suco de laranja reconstituído mais o EB e a nisina). A concentração avaliada foi baseada no CIM da forma vegetativa de *A. acidoterrestris*. Para as formas vegetativas as concentrações avaliadas foram de 0,25xCIM, 0,5xCIM, 1xCIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM e para os esporos as concentrações avaliadas foram de 1xCIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM. Em seguida, foi adicionado o inóculo bacteriano (célula vegetativa/esporos) na concentração de  $5 \times 10^4$  UFC/mL. A placa foi incubada a 45 °C por 24 horas. No entanto, para os esporos, após período de incubação, foi dado choque térmico em banho de água na temperatura de 80 °C por 10 min. para sua ativação. Logo após, foi realizado um subcultivo de 20 µL em triplicata em placas de ágar

BAT e incubados a 45 °C por 24 horas para a avaliação da redução bacteriana comparado ao controle (suco sem adição do EB). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 2.9. Ensaio de citotoxicidade

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Mosmann (1983) pelo método MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) que avalia a intensidade do formazan produzido por células vivas metabolicamente ativas determinada pela leitura de absorbância. Foram utilizadas as células tumorais de hepatócitos humanos HepG2/C3A, que foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro e cultivada em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium-GibcoR<sup>®</sup>), alta glicose, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco Invitrogen Corporation, NY, EUA) e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

Foi preparada uma suspensão de 10<sup>4</sup> células HepG2/C3A cultivada em 100µL de meio de cultura com soro por poço, em placas de 96 poços, por 24 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida as células foram tratadas com o EB do fungo endofítico nas concentrações de 31,25-1.000 µg/mL. Foi realizado um controle contendo apenas o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. Finalmente o experimento foi incubado por 48 horas em 3 repetições biológicas. Em seguida, foi descartado o meio de cultura e adicionado em cada poço, meio de cultura sem soro com MTT (0,15 mg/mL) e as células foram incubadas por mais 4 horas. Posteriormente, o meio foi retirado e adicionado 100µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi obtida por meio da leitura das placas em leitor Elisa (Bio-Tek Power Wave XS Microplate Fluorescence Reader) a 550nm, e os dados foram expressos em absorbância.

Os valores de CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica na qual 50% das células são mortas) da linhagem celular HepG2/C3A de hepatócitos humanos foram calculados como a concentração capaz de reduzir em 50% a absorbância quando comparadas com as células não tratadas. A partir do valor do CIM e do valor de CC<sub>50</sub> obtido em nossos ensaios, foi calculado o índice de seletividade (IS) por meio da equação:  $IS = CC_{50} / CIM$ . O valor resultante neste ensaio expressa a segurança do EB avaliado, sendo esta uma razão entre a toxicidade celular *in vitro* e a atividade antibacteriana, expressando uma margem de segurança entre a concentração

capaz de inibir o crescimento bacteriano e a concentração tóxica para as células dos hepatócitos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

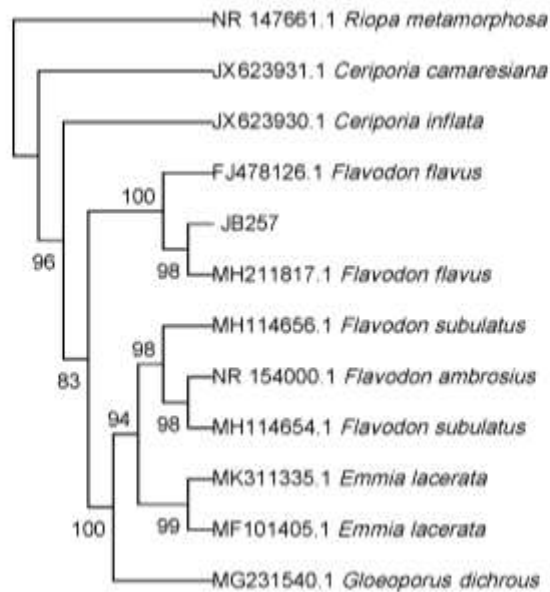
### 2.10. Microscopia Eletrônica de Varredura

Por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi possível avaliar a morfologia externa de *A. acidoterrestis*. As células vegetativas foram tratadas com o EB endofítico na concentração de 1xCIM, e para os esporos foi aplicado tratamento de 500 µg/mL. As células bacterianas foram ativadas em 1 mL de caldo BAT contendo o tratamento desejado e incubados a 45 °C por 24 horas. Após período de incubação, as amostras foram fixadas em glutaraldeído (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 2,5% em tampão cacodilato de sódio (SEM, Hatfield, PA) 0,1 M. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão cacodilato 0,1M e colocadas em uma lamínula chip contendo Poly-L-lisina. Posteriormente, elas passaram por um processo de desidratação em etanol (Synth, Diadema, São Paulo, Brazil) a 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100% (15 minutos em cada álcool). Em seguida, foi realizado o ponto crítico em CO<sub>2</sub> sob alta pressão e metalizada em ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura QUANTA 250 (FEI Comany) (Endo et al., 2010). A morfologia das células tratadas foi comparada a morfologia das células controle (sem tratamento).

## 3. Resultados e discussão

### 3.1. Análise filogenética do fungo endofítico

De acordo com a análise no BLASTn, o isolado endofítico apresentou 99-100% de identidade com a espécie *Flavodon flavus* (FJ478126.1 e MH211817.1). O dendograma resultante da análise filogenética utilizando *Maximum Likelihood* está apresentado na Figura 1. De acordo com o mesmo, o endófito JB257 agrupou-se no clado com as espécies de *F. flavus* com 100% de similaridade, sendo identificado em nível taxonômico de espécie como *F. flavus* (BLASTn 100%; 98% de *bootstrap*).



**Figura 1** - Dendrograma resultante da análise filogenética baseado no método *Maximum Likelihood* empregando o modelo de Jukes-Cantor. *Riopa metamorphosa* (NR 147661.1) foi utilizada como grupo externo. Os números na árvore indicam a porcentagem de agrupamento durante a análise (bootstrap com 10.000 repetições).

### 3.2. Caracterização do Extrato Bruto dos Fungos Endofíticos

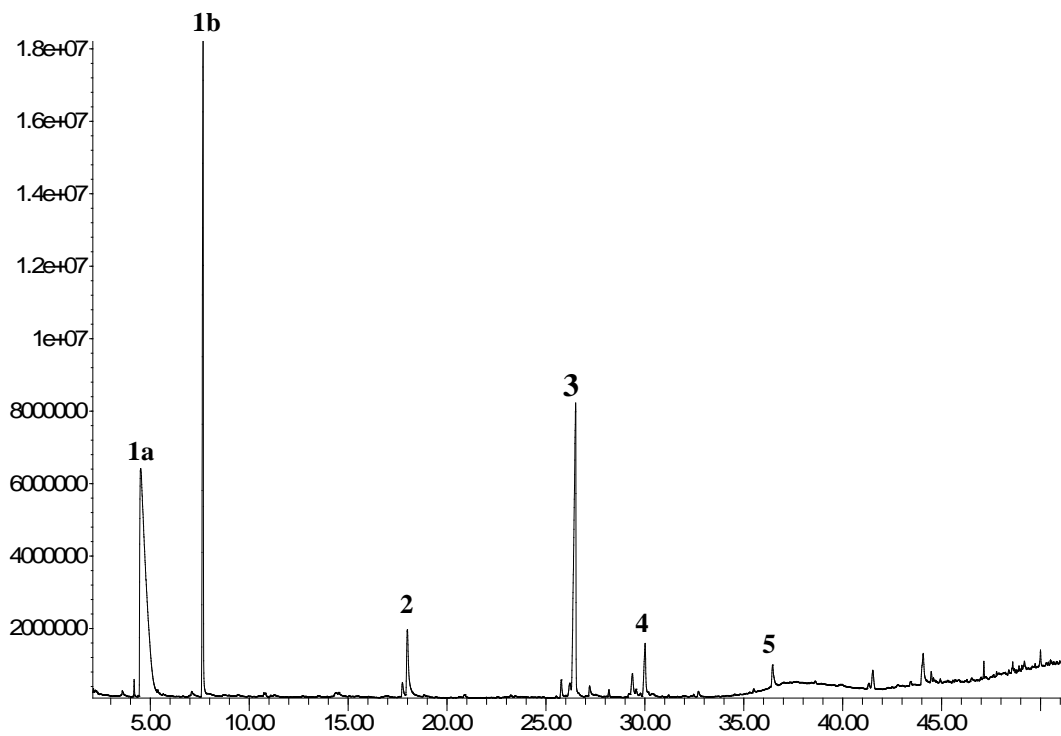
Os componentes voláteis identificados do extrato bruto (EB) da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) foram determinados por análises de GC-MS (Fig. 2). Na Tabela 1 estão representados os componentes identificados por GC-MS, sendo que o composto álcool feniletílico (**1a**, **1b**) é relativamente o principal composto identificado por esta metodologia neste extrato (52,9%), sendo ele reconhecido como um agente antibacteriano (Corre et al., 1990; Lingappa et al., 1969; Russell, 1969). O álcool feniletílico pode ser o responsável pela ação bacteriostática e bactericida presente no EB avaliado e pode atuar como inibidor da síntese de DNA e mRNA em células bacterianas. No entanto, pode também existir uma interação sinérgica ou aditiva entre os diversos compostos químicos presente no extrato bruto (Atiphasaworn et al., 2017), o que potencializa a ação destes compostos. Os principais componentes do EB da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) atribuídos por CG-EM são mostrados no cromatograma de íons totais apresentado na Figura 2.

**Tabela 1** - Metabólitos identificados no extrato bruto da linhagem endofítica *F. flavus* (JB257) por GC-MS. Os valores são expressos como uma porcentagem da corrente total de íons (% , TIC).

Número	Composto	*TR	** %	***M <sup>+</sup>
1a	Álcool feniletílico	4.53	15.1	122,1
1b	Acetato do álcool feniletílico	7.63	37.8	164,0
2	<i>N</i> -acetil-tyramina	18.0	5.3	179,0
3	ácido 4-isopropil-4-cicloexene-1,2-dicarboxílico	26.5	18.9	212,0
4	1-phenil-hexahidro-3-(2-methypropil)-pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona	30.0	12.0	210,0
5	19-hidroxi-17-oxoandrost-5-en-3-il acetato	36.4	3.5	

Legenda: \*TR: Tempo de Retenção (min); \*\*%: Porcentagem da Corrente Total de Íons observados; \*\*\* M<sup>+</sup>: Massa Protonada.

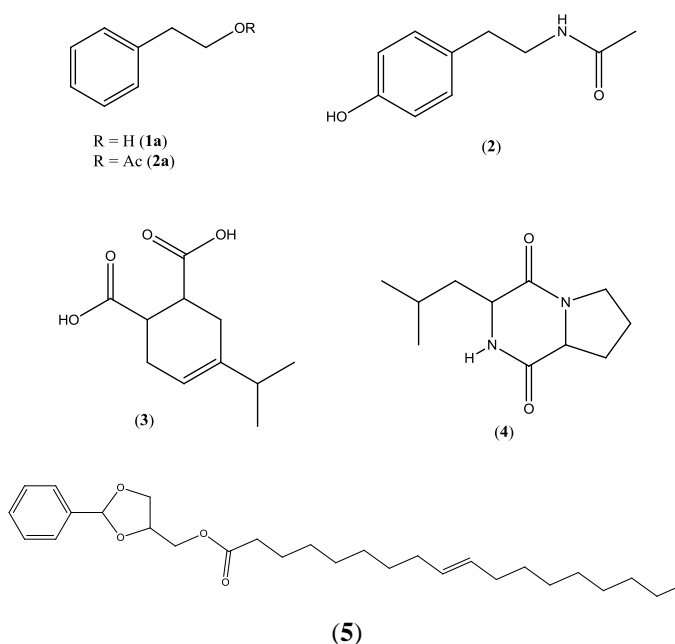
Abundance



Time->

**Figura 2** - Cromatograma da corrente iônica total do extrato bruto de *F. flavus* por CG-EM: álcool feniletílico (**1a**, **1b**); *N*-acetil-tyramina (**2**); ácido 4-isopropil-4-cicloexene-1,2-dicarboxílico (**3**); 1-phenil-hexahidro-3-(2-methypropil)-pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona (**4**); 19-hidroxi-17-oxoandrost-5-en-3-il acetato (**5**)

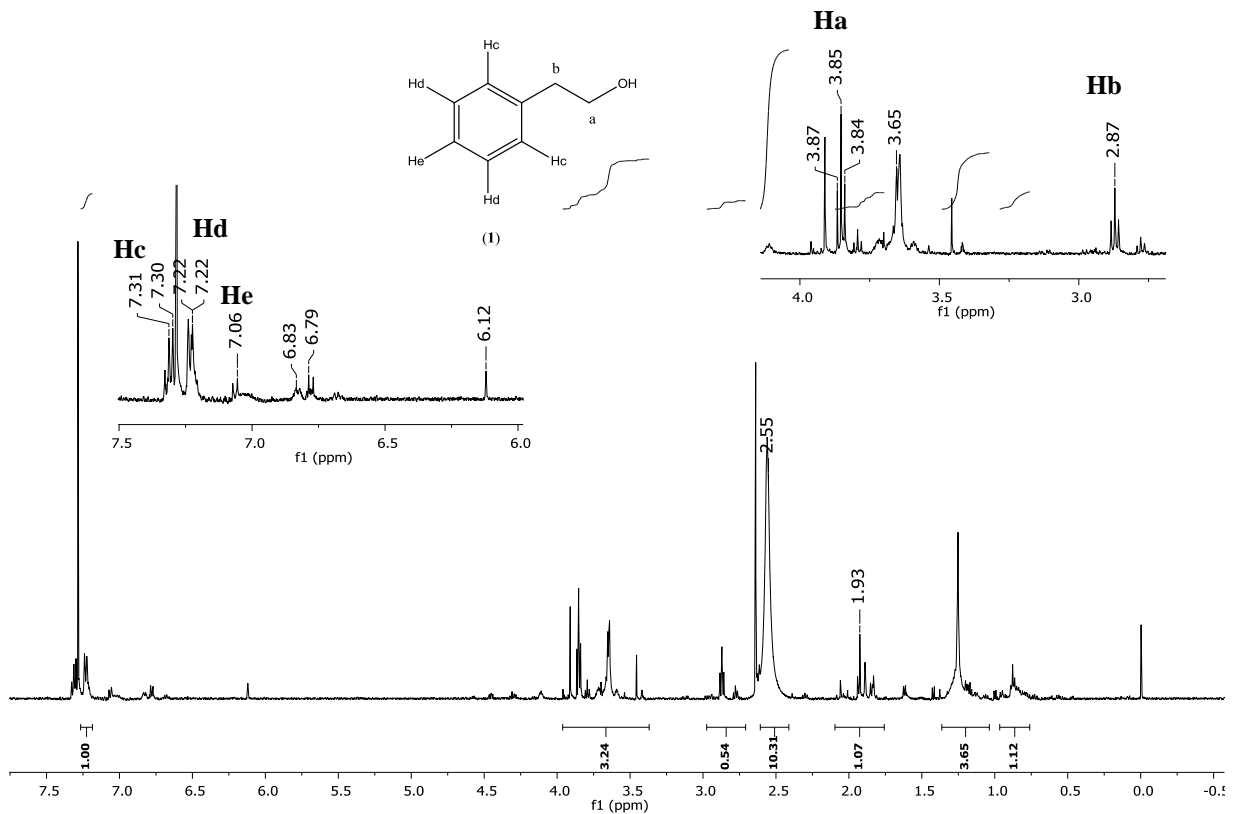
Os resultados foram confirmados por análise de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR (Fig. 3), onde pode-se observar a presença de sinais característicos correspondentes ao álcool feniletílico, conforme mostrado nas Figuras 4 e 5. A tabela 2 apresenta os deslocamentos químicos do álcool feniletílico da literatura e compara-os com os dados obtidos da análise do extrato de acetato de etila. Todos estes dados concordam com resultados obtidos por GC-MS.



**Figura 3** - Estrutura química dos metabólitos majoritários detectados por GC-MS do extrato bruto do isolado endofítico *Flavodon flavus*.

A análise de RMN de  $^1\text{H}$  do EB, Figura 4, mostrou os sinais característicos do composto isolado mostrado na análise por CG-EM o phenylethyl alcohol (1a, 1b), onde pode-se observar os sinais dos hidrogênios da cadeia etílica ligada ao anel aromático a  $\delta_{\text{H}}$  3,77(t, J = 10 Hz, Ha) e 2,84 (t, J = 10 Hz, Hb), Figura 4, e os sinais referentes ao anel aromático entre  $\delta_{\text{H}}$  7,15-7,30 e o sinal referente ao hidrogênio do grupo hidroxila a  $\delta_{\text{H}}$  2,90.

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  corroboram com os dados de atribuição do phenylethyl alcohol, discutidos baseados no RMN de  $^1\text{H}$ , que também revelou a presença dos grupos metilênicos da cadeia alifática a  $\delta_{\text{C}}$  63,5 (Ca) e 39,2 (Cb) e os carbonos referentes ao anel aromático de  $\delta_{\text{C}}$  126-138, Figura 5.



**Figura 4** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos em  $\text{CDCl}_3$  e o TMS como padrão interno, do extrato bruto do isolado endofítico *Flavodon flavus*, espectro total e ampliações.

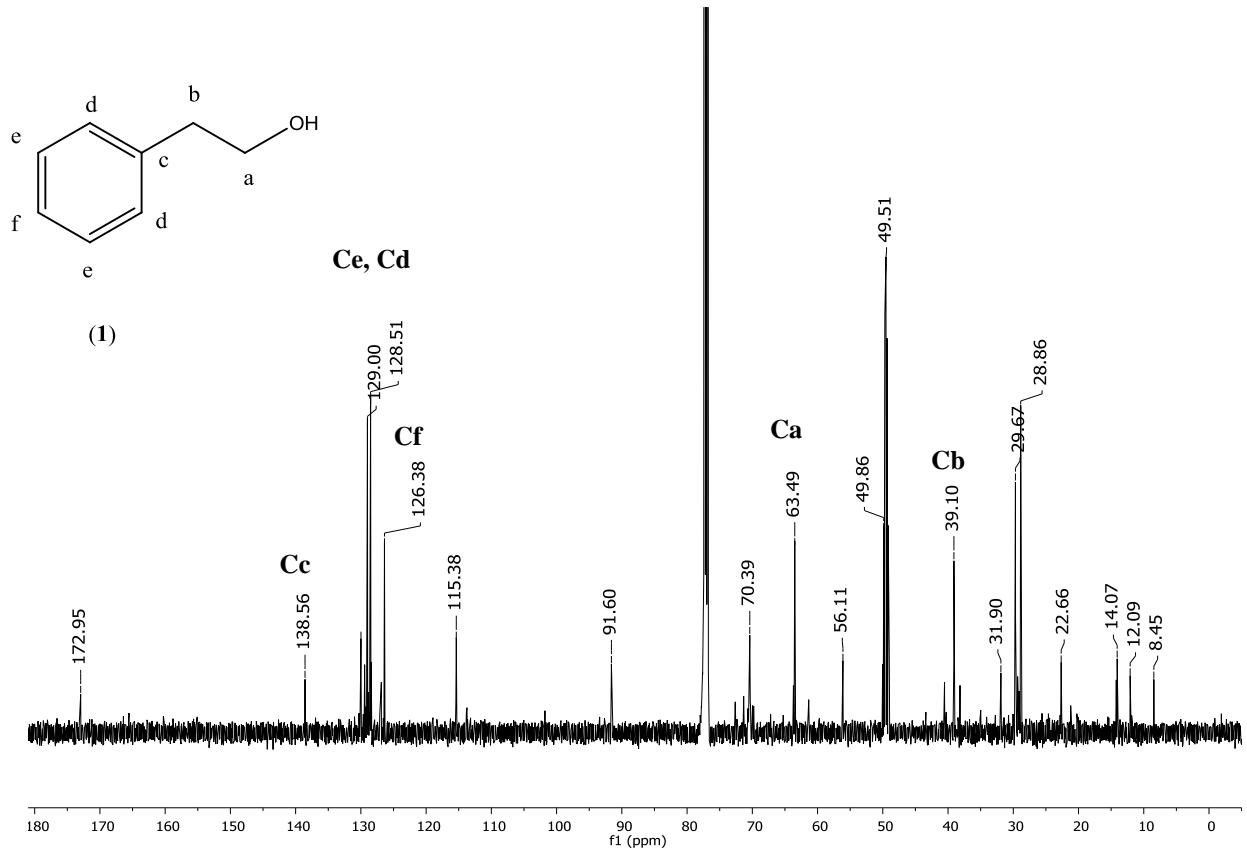
**Tabela 2** - Atribuição deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR do álcool feniletílico.

$\delta$ (ppm)	Álcool feniletílico Literatura	álcool feniletílico (1)
<u>Hidrogênio</u>		
Ha	3.77* (t)	3.82 (t)
Hb	2.81* (t)	2.84 (t)
Hc	7.41* (d)	7.28 (d)
Hd	7.34* (dd)	7.21 (dd)
He	7.07* (dd)	7.19 (dd)
<u>Carbono</u>		
Ca	63.0**	63.5
Cb	39.2**	39.2
Cc	138.0**	138.6
Cd	129.0**	129.0
Ce	128.0**	128.5
Cf	1256.0**	126.4



\*[https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN\\_60-12-8\\_1HNMR.htm](https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_60-12-8_1HNMR.htm)

\*\* [https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN\\_60-12-8\\_13CNMR.htm](https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_60-12-8_13CNMR.htm)



**Figura 5** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtidos em  $\text{CDCl}_3$  e o TMS como padrão interno do extrato bruto do isolado endofítico *Flavodon flavus*.

### 3.3. Determinação da Atividade antibacteriana in vitro dos extratos bruto e da nisina

*A. acidoterrestis* é um deteriorante de sucos de frutas e bebidas ácidas, por este motivo é um micro-organismo muito pesquisado como indicativo no controle de qualidade do produto. Existem muitos trabalhos que mostram o potencial dos antimicrobianos naturais com aplicação na conservação de suco de frutas (Anjos et al., 2016; Bevilacqua et al, 2013; Pascoli et al., 2018; Piskernik et al, 2016). No entanto não foi encontrado pesquisas nesta área aplicando EB de fungos endofíticos. Os extratos endofíticos apresentam atividades biológicas que pode ser aplicados em diversas áreas, entre estas atividades podem ser destacado seu potencial como agente antibacteriano (Savi et al., 2019). Esta característica pode estar

relacionada aos agrupamentos químicos presente nesta substância, assim como a presença de compostos fenólicos presente no extrato.

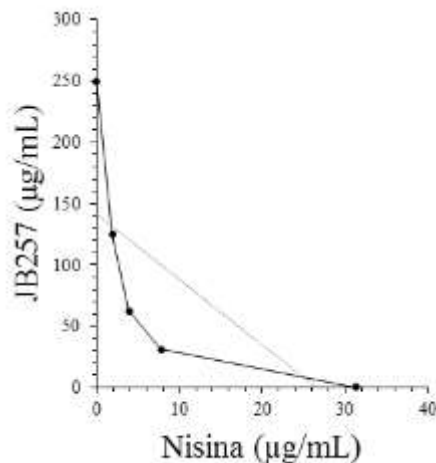
De acordo com os resultados obtidos em nossos ensaios *in vitro*, o extrato bruto da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) apresentou atividade antibacteriana tanto contra as formas vegetativas como contra os esporos de *A. acidoterrestris*. A CIM do extrato bruto contra as formas vegetativas de *A. acidoterrestris* foi de 250 µg/mL. Nesta concentração foi possível reduzir 3,22 Log UFC/mL e, a redução microbiana foi de aproximadamente 44%. A CBM foi de 1.000 µg/mL sendo esta a concentração capaz de inibir 100% do crescimento bacteriano. Quando aplicado o tratamento utilizando a bacteriocina nisina a CIM foi de 31,5 µg/mL e a CBM foi de 62,5 µg/mL.

Para os esporos de *A. acidoterrestris* foi possível reduzir 3,66 log UFC/mL com tratamento do EB na concentração de 500 µg/mL, no qual reduziu aproximadamente 47% da carga bacteriana. Ao aplicar um tratamento de 1,000 µg/mL, ocorreu uma redução de 58% da carga de esporos. A CEM para a nisina foi de 62,5 µg/mL com redução de 100% no crescimento dos esporos no meio de cultura BAT após período de incubação.

#### 3.4. Método Checkerboard

A figura 6 mostra o isoblograma das interações ocorridas entre a combinação do EB da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) com a bacteriocina nisina contra as células vegetativas de *A. acidoterrestris*. O isoblograma apresenta uma interação sinérgica entre os dois compostos antibacterianos com índice FIC de 0,18.

A nisina é uma bacteriocina muito utilizada como conservante de alimentos, no entanto apresenta alto custo financeiro e por este motivo não é muito utilizada. Seu uso combinado a outros antibacterianos é viável pois pode reduzir gastos, aumentar o tempo de prateleira e garantir a qualidade do produto até que ele chegue ao consumidor final. Muitos trabalhos mostram a interação da nisina com outros compostos antibacterianos naturais (Pascoli et al., 2018; Solomakos et al., 2008), no qual este tipo de tratamento apresenta resultados satisfatórios. Portanto, esta interação existente entre os extratos bruto dos fungos endofíticos com a nisina é uma característica promissora, apresentando potencial para aplicação nas indústrias de sucos cítricos industrializados e bebidas acidificadas.



**Figura 6** - Isobolograma mostrando a interação sinérgica entre o extrato bruto da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) combinado com a nisina (FIC=0,18). As linhas resultam em curvas altamente côncavas caracterizando sinergismo entre os compostos (índice FIC <0,5).

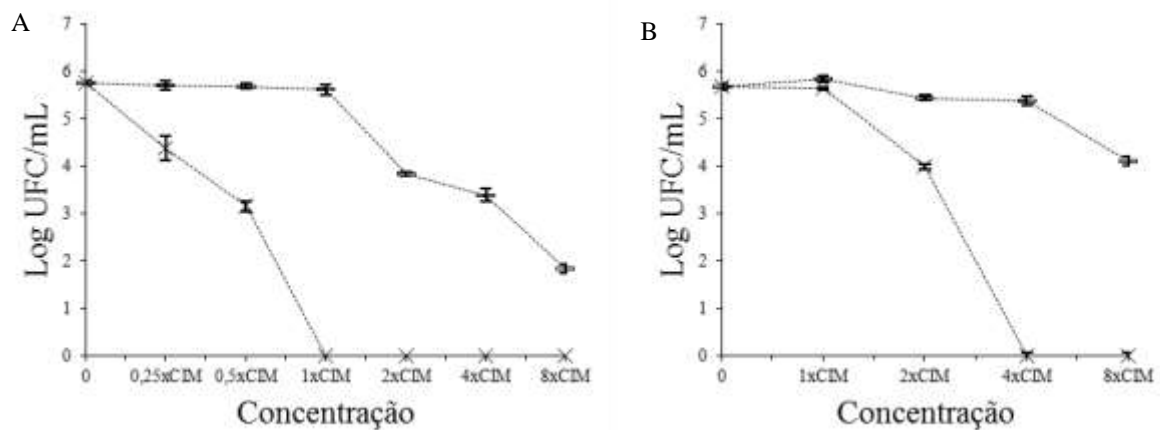
### 3.5. Aplicação do Extrato Bruto e da Nisina e suas combinações no Suco de laranja reconstituído

A figura 7 mostra a ação antibacteriana do extrato bruto (EB) da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) sozinho e combinado com a bacteriocina nisina aplicado ao suco de laranja reconstituído a 11 °Brix contra as células vegetativas e esporos de *A. acidoterrestris*.

Na figura 7A é possível verificar que ao utilizar o EB na concentração de 8xCIM (2.000 µg/mL) ocorreu uma redução de 3,92 log UFC/mL das células vegetativas de *A. acidoterrestris*. Ao combinar o EB com a nisina na concentração de 1xCIM (250 µg/mL do EB com 31,25 µg/mL da nisina) ocorreu redução total da carga bacteriana.

Na figura 7B foi possível observar a ação dos compostos antibacterianos contra os esporos de *A. acidoterrestris* presente no suco de laranja reconstituído. Com o tratamento com o EB na concentração de 8xCIM (2.000 µg/mL) foi possível reduzir 1,57 log UFC/mL. Ao combinar o EB com a nisina foi possível determinar a concentração esporocida, sendo esta uma concentração equivalente a 4xCIM (1000 µg/mL do EB com 125 µg/mL de nisina).

Com estes ensaios podemos verificar que a combinação dos extratos brutos com a nisina melhora consideravelmente a redução de *A. acidoterrestris* presente no suco de laranja reconstituído, sendo esta característica muito relevante para o setor industrial.

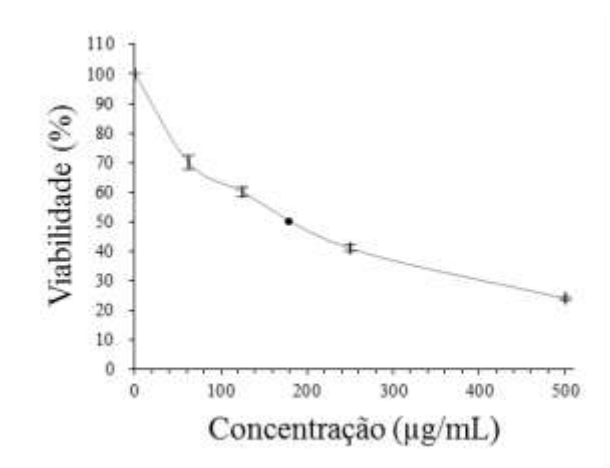


**Figura 7** - Atividade antibacteriana do extrato bruto (EB) da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) sozinho e combinado com a bacteriocina nisina contra células vegetativas e esporos de *A. acidoterrestris* em suco de laranja reconstituído a 11 °Brix (CIM do EB = 250 µg/mL; CIM nisina = 31,25 µg/mL) com período de incubação de 24 horas a 45 °C. (A) Tratamento aplicado contra as células vegetativas e (B) contra os esporos de *A. acidoterrestris*: (-)JB257 e (x) JB257 + nisina.

### 3.6. Citotoxicidade e viabilidade celular

Neste ensaio foi possível verificar o nível da citotoxicidade *in vitro* do EB obtido da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) contra as células tumorais de hepatócitos humanos HepG2/C3A. A figura 8 mostra a curva da viabilidade celular, sendo a concentração citotóxica para 50% do tapete celular ( $CC_{50}$ ) com valor equivalente a 180 µg/mL.

A citotoxicidade do EB em células dos hepatócitos humanos foi comparada com o CIM das células vegetativas de *A. acidoterrestris* utilizando o índice de seletividade (IS) por meio da equação IS:  $CC_{50} / CIM$ . Um valor superior a 1.0 é considerado como mais seletivo contra a bactéria. Baseado nos resultados obtidos neste ensaio, foi possível observar que o EB foi mais tóxico contra as células dos hepatócitos humanos com IS de 0,72.



**Figura 8** - Efeito citotóxico do extrato bruto da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) isolado das folhas de *J. brandegeana* contra células tumorais de hepatócitos humanos HepG2/C3A cultivadas *in vitro* e avaliadas pelo método MTT. A Concentração citotóxica para 50% do tapete celular (•=CC<sub>50</sub>) foi de 180 µg/mL.

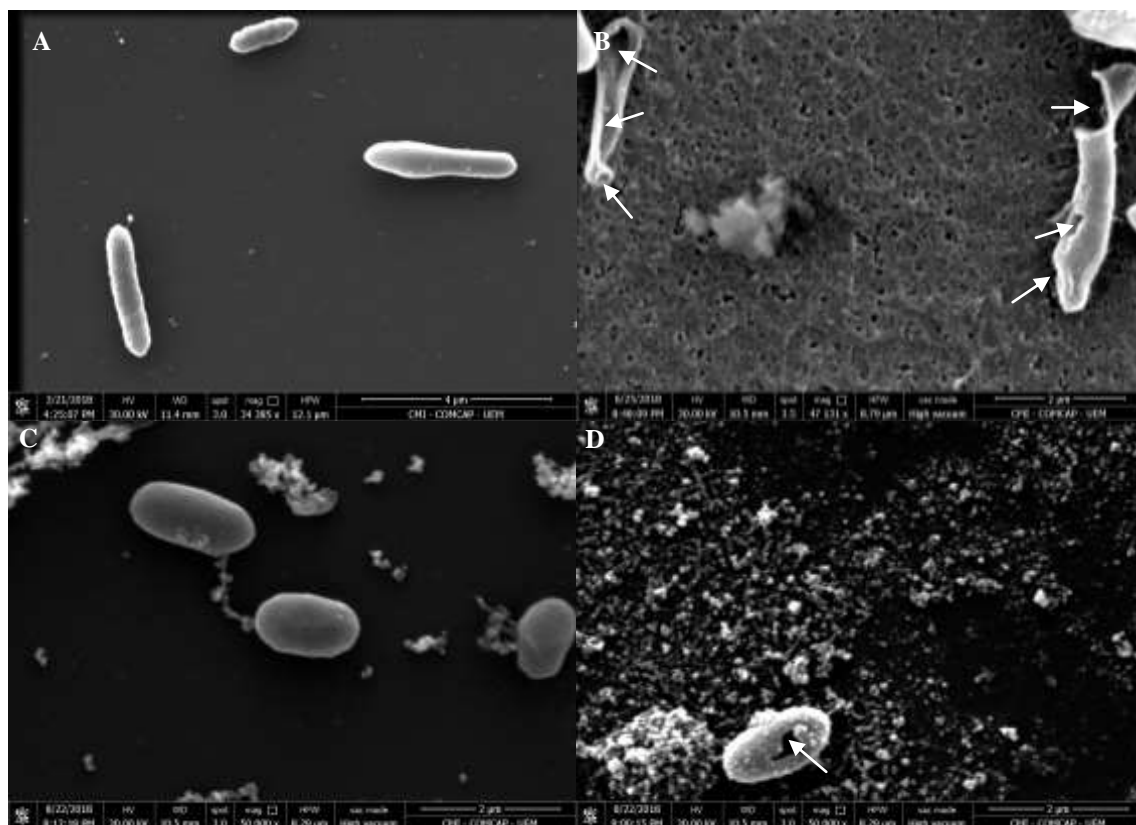
Apesar de o EB apresentar toxicidade maior contra as células dos hepatócitos humanos, pode ser realizado um tratamento combinado com a nisina. Nos ensaios *in vitro*, a CIM das combinações antibacterianas foi de 0,25 vezes o valor do CIM (CIM do EB = 62,5 µg/mL e CIM da nisina= 3,9 µg/mL). Sendo assim, o IS para o EB seria de 2,88, apresentando maior seletividade contra as células de *A. acidoterrestris*. Quando aplicado ao suco de laranja reconstituído, a concentração de 0,25xCIM combinado (EB e nisina) resultou em uma redução de 1,38 log UFC/mL da concentração bacteriana. Esta avaliação reforça a eficiência do tratamento aplicado por meio da combinação do EB com a nisina, tendo como resultado a potencialização da atividade antibacteriana e a redução da toxicidade celular contra os hepatócitos humanos.

### 3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura

Na figura 9 foi possível observar as alterações morfológicas ocorridas após o tratamento das células vegetativas e dos esporos de *A. acidoterrestris* tratadas com o EB da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) quando comparados às amostras controle (sem tratamento).

Nas células controle de *A. acidoterrestris* podemos observar que sua superfície apresentam-se intactas e sem deformações (figura 9A e 9C). Na figura 9B e 9D, as células

bacterianas (vegetativas e esporos) tratadas com o EB apresentaram nítidas modificações na morfologia da membrana celular, ocorrendo presença de poros e quebra na membrana externa, com consequente extravasamento do líquido intracelular, fato que pode ter ocorrido devido ao rompimento da membrana celular.



**Figura 9** - Microscopia Eletrônica de Varredura das células vegetativas e esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* após tratamento com o extrato bruto (EB) da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) com período de incubação de 24 horas a 45 °C em meio BAT: (A) controle - célula vegetativa; (B) célula vegetativa tratada com EB na concentração de 250 µg/mL; (C) controle - esporo; (D) esporo tratado com EB na concentração de 500 µg/mL. As setas (→) indicam os locais que ocorreram alterações na membrana celular bacteriana.

As alterações na membrana celular bacteriana podem interferir na viabilidade celular, tendo como consequência as reduções logarítmicas na contagem de colônias, que podem ser observados nos experimentos antibacterianos. De acordo com Corre et al. (1990), o álcool feniletílico, composto majoritário encontrado no EB do fungo endofítico *Flavodon flavus*

(JB257), apresenta atividade bacteriostática e bactericida de amplo espectro que atua fortemente nas células bacterianas, interferindo em suas estruturas internas e externas assim como em seu metabolismo celular. Nos resultados demonstrados neste estudo, fica evidente a ocorrência de alterações estruturais na membrana celular, o que poderia levar a interferências na morfologia e fisiologia celular.

#### **4. Conclusão**

O extrato bruto da linhagem endofítica *Flavodon flavus* (JB257) apresentou atividade bacteriostática, bactericida e esporicida contra *A. acidoterrestis*, que é um importante micro-organismo deteriorante relacionado aos sucos de frutas cítricas e bebidas acidificadas. A interação sinérgica presente entre o extrato bruto e a nisina é um fator extremamente importante para o setor industrial, pois tal característica possibilita a redução de custos e uma melhoria na qualidade do produto, assim como pode levar a um aumento na vida de prateleira do produto comercial. A aplicação do extrato bruto em suco de laranja reconstituído conseguiu inibir o crescimento de células vegetativas e de esporos de *A. acidoterrestis*. O extrato endofítico pode ser produzido em escala industrial por meio de reatores biológicos facilitando e otimizando sua extração. A aplicação destes compostos bioativos em suco de laranja requer mais estudos quanto sua toxicidade celular e suas características sensoriais, no entanto apresenta um produto com importante potencial biotecnológico na indústria alimentícia, com uma ação antibacteriana.

#### **Declarações de interesse**

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

#### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior da CAPES (Código Financeiro 001) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (307603 / 2017-2) e ao SETI / UGF. .65 / 2018) pelo apoio financeiro. Os autores agradecem também ao Complexo do Centro de Apoio à Pesquisa da Universidade de Maringá - Brasil (COMCAP-UEM).

## REFERÊNCIAS

- Anjos, M.M., Silva, A.A., Pascoli, I.C., Graton-Mikcha, J.M., Machinski Jr, M., Peralta, R.M., Abreu Filho, B.A., 2016. Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus* spp. *International Journal of Food Microbiology*. 216, 121-126. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.007>
- Anjos, M.M., Endo, E.H., Leimann, F.V., Gonçalves, O.H., Dias-Filho, B.P., Abreu-Filho, B. A., 2018. Preservation of the antibacterial activity of enzymes against *Alicyclobacillus* spp. through microencapsulation. *LWT – Food Science and Technology*. 88, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.039>
- Atiphasaworn, P., Monggoot, S., Gentekaki, E., Brooks, S., Pripdeevech, P., 2017. Antibacterial and antioxidante constituents of extracts of endophytic fungi isolated from *Ocimum basilicum* var. *thyrsoflora* Leaves. *Curr. Microbiol.* 74, 1185-1193.
- Balakumaran, M.D., Ramachandran, R., Kalaichelvan, P.T., 2015. Exploitation of endophytic fongs, *Guignardia mangiferae* for extracellular synthesis of silver nanoparticles and their *in vitro* biological activities. *Microbiological Research*. 178, 9-17.
- Bevilacqua, A., Campaniello, D., Speranza, B., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., 2013. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by citrus extracts and a mild heat-treatment. *Food Control*. 31, 553-559. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.014>
- Castellani, A., 1963. The “water cultivation” of pathogenic fungi. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 66, 283-284.
- Chang, S.S., Kang, D.H., 2004. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Crit. Rev. Microbiol.* 30, 55-74.
- Clinical Laboratory Standards Institute/CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 9 th ed. Approved Standard. CLSI Document M7-A9. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA, 2012.
- Corre, J., Lucchini, J.J., Mercier, G.M., Cremieux, A., 1990. Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane alterations. *Res. Microbiol.* 141, 484-497.
- Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., Altan, E., 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Syst. Appl. Microbiol.* 10, 47-53.
- Endo, E.H., Cortez, D.A.G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., 2010. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res. Microbiol.* 161, 534-540.
- Eyberger, A.L., Dondapati, R., Porter, J.R., 2006. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Journal of Natural Products*. 69 (8), 1121-1124.
- Fava Neves, M., Trombin, V.G., 2017. Anuário da Citricultura, 1º Edição. Acessado em: 25 de junho de 2018. Disponível em: [http://www.citrusbr.com/revista/dezembro2017/revista\\_citrus\\_1217.pdf](http://www.citrusbr.com/revista/dezembro2017/revista_citrus_1217.pdf)
- Fernández, P., Gabaldón, J.A., Periago, M.J., 2017. Detection and quantification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by electrical impedance in apple juice. *Food Microbiol.* 68, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.016>
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*. 124 (1), 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028>



- Felber, A.C., Orlandelli, R.C., Rhoden, A.S., Garcia, A., Costa, A.T., Azevedo, J.L., Pamphile J.A., 2015. Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. *Annals of Microbiology*. 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1162-6>.
- Huertas, J.P., Esteban, M.D., Antolinos, V., Palop, A., 2014. Combined effect of natural antimicrobials and thermal treatments on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Food Control*. 35, 73-78. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.051>
- Kusari, S., Lamshoft, M., Zühlke, S., Spiteller, M., 2008. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *Journal of Natural Products*. 71 (2), 26-29.
- Kusari, S., Zühlke, S., Spiteller, M., 2009. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *J. Nat. Prod.* 72, 2-7.
- Kusari, S., Hertweck, C., Spiteller, M., 2012. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*. 19 (7), 792-798.
- Lingappa, B.T., Prasad, M., Lingappa, Y., Hunt, D.F., Biemann, K., 1969. "Phenethyl alcohol and tryptophol: Autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*". *Science*. 163 (3863): 192-4.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65, 55-63.
- Nakano, C., Takahashi, N., Tanaka, N., Okada, S., 2015. *Alicyclobacillus dauci* sp. nov., a slightly thermophilic, acidophilic bacterium isolated from a spoiled mixed vegetable and fruit juice product. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65 (2), 716-722.
- Pascoli, I.C., Anjos, M.M., Silva, A.A., Lorenzetti, F.B., Cortez, D.A.G., Graton Mikcha, J.M., Nakamura, T.U., Nakamura, C.V., Abreu Filho, B.A., 2018. Piperaceae extracts for controlling *Alicyclobacillus acidoterrestris* growth in commercial orange juice. *Industrial Crops & Products*. 116, 224-230.
- Piskernik, S., Klančnik, A., Demšar, L., Možina, S.S., Jeršek, B., 2016. Control of *Alicyclobacillus* spp. Vegetative cells and spores in apple juice with rosemary extracts. *Food Control*. 60, 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.018>
- Polonio, J.C., Ribeiro, M.A.S., Rhoden, S.A., Sarragiotto, M.H., Azevedo, J.L., Pamphile, J.A., 2016. 3-Nitropropionic acid production by the endophytic *Diaporthe citri*: Molecular taxonomy, chemical characterization, and quantification under pH variation. *Fungal Biol.* 120, 1600-1608.
- Russell, A.D., 1969. The mechanism of action of some antibacterial agents. *Prog. Med. Chem.* 6, 135.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Savi, D.C., Aluizio, R., Glienke, C., 2019. Brazilian Plants: An Unexplored Source of Endophytes as Producers of Active Metabolites. *Planta Med.* 85, 619-636 <https://doi.org/10.1055/a-0847-1532>
- Scholz, Z., Molnar, J., Hohmann, J., 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*. 77 (4), 279-85. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.03.013>
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N., 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiol.* 25, 120-127.
- Specian, V., Costa, A.T., Felber, A.C., Polonio, J.C., Azevedo, J.L., Pamphile, J.A., 2016. Molecular phylogeny and biotechnological potential of bacterial endophytes associated with *Malpighia emarginata*. *Genetics and Molecular Research*. 15, 1-19.

- Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., 1993. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. *Science*. 260 (5105), 214-216.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30 (2) 2725-2729.
- Walker, M., Phillips, C.A., 2005. The effect of intermittent shaking, headspace and temperature on the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in stored apple juice. *Int. J. Food Sci. Technol.* 40, 557-62.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego. pp. 315-322.
- Wu, F., Chen, J.J., Ji, X.H., Vlasák, J., Dai, Y.C., 2017. Phylogeny and diversity of the morphologically similar polypore genera *Rigidoporus*, *Physisporinus*, *Oxyporus*, and *Leucophellinus*. *Mycologia*. 109 (5), 749-765.
- Yuan, Y., Tian, J.M., Xiao, J., Shao, Q., Gao, J.M., 2014. Bioactive metabolites isolated from *Penicillium* sp. YY-20, the endophytic fungus from *Ginkgo biloba*. *Natural Product Research*. 28 (4), 278-281.
- Zhang, G., Sun, S., Zhu, T., Lin, Z., Gu, J., Li, D., Gu, Q., 2011. Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry*. 72 (11-12), 1436-1442.

## ANEXO 3

### INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS

An International Journal

#### GUIDE FOR AUTHORS

*Industrial Crops and Products*, an International Journal, publishes papers reporting the results of original research, short communications and critical reviews on all aspects of industrial crops and products (defined as non-food/non-feed uses of plants and plant products). This covers a wide range of aspects of cultivation, crop improvement, crop compounds, processing, and integrated chain control, all focusing on the exploitation of agricultural crops for industrial use.

The scope of the journal covers a vast range of crops and research disciplines. Crops should contain significant renewable resources such as:

- Fibres and fibre compounds
- Carbohydrates
- Oils and fatty acids
- Waxes, resins, gums, rubber, and other polymers
- Proteins
- Essential oils for ink, lubricants, plastics, cosmetics
- Biologically active compounds for pharmaceutical, herbicides and insecticides, and preservatives.

Some examples of industrial (non-food/non-feed uses) crops are agave, cassava, crambe, cuphea, elephant grass, fibre hemp, flax, guar, guayule, jojoba, kenaf, lesquerella, maize, meadowfoam, oil palm, peas, plantago, potato, pyrethrum, rape seed, safflower, soybean, Stokes aster, sugar beet, sunflower, vernonia, and wheat.

Papers within the above indicated frame-work will be accepted if they cover or integrate research on:

- Agronomic production and modelling
- Breeding, genetics, and biotechnology

- Post-harvest treatment and storage
- (Bio)process technology
- (Bio)chemistry
- Product testing, development, and marketing
- Economics, and systems analysis and optimization

### **Types of paper**

1. Original research papers (regular papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Book Reviews

*Original research papers* should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

*Review articles* Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. We welcome reviews but authors should contact the Editors-in-Chief before submission to ensure appropriateness for publication.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 4 printed pages (about 8 manuscript pages, including figures, tables and references).

### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title

page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

### ***Preprints***

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and

by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### ***Article transfer service***

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

### ***Author right***

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

### ***Elsevier supports responsible sharing***

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### ***Funding body agreements and policies***

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

### ***Subscription***



- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

#### ***Gold open access***

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

#### ***Creative Commons Attribution (CC BY)***

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

#### ***Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)***

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 3200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### ***Green open access***

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more. This journal has an embargo period of 24 months.

### ***Elsevier Researcher Academy***

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### ***Submit your article***

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/indcro/>

**Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

***Use of wordprocessing software***

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

**Lines should be double-spaced and every line and page should be numbered.**

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

**Article structure*****Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### ***Material and methods***

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

### ***Results***

Results should be clear and concise.

### ***Discussion***

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### ***Conclusions***

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### ***Appendices***

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### ***Graphical abstract***

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### ***Abbreviations***

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Try not to over-use abbreviations.

### ***Acknowledgements***

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### ***Formatting of funding sources***

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### ***Nomenclature and Units***

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Authors and Editor(s) are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

### ***Math formulae***

Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics. Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text). Subscripts and superscripts should be clear. Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: \*P <0.05, \*\*P <0.01 and \*\*\*P <0.001. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca<sup>2+</sup>, not as Ca<sup>++</sup>. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., <sup>18</sup>O.

### ***Footnotes***

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise,

please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

## **Artwork**

### ***Electronic artwork***

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file

A detailed guide on electronic artwork is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi

**Please do not:**



- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### ***Color artwork***

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

### ***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### **References**

#### ***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### ***Reference links***

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### ***Web references***

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### ***Data references***

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### ***References in a special issue***

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### ***Reference management software***

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation

Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/industrial-crops-and-products>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### ***Reference formatting***

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### ***Reference style***

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
  2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
  3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### ***Journal abbreviations source***

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation

content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

### ***Data linking***

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### ***Mendeley Data***

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

### ***Data in Brief***

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed,

given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

### ***MethodsX***

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article.

### ***Data statement***

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from

the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.