



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

ALESSANDRE CARMO CRISPIM

**OS EFEITOS DA LUZ NO METABOLOMA DA CULTURA
IN VITRO DO MICÉLIO DE *Lasiodiplodia theobromae***

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**

ALESSANDRE CARMO CRISPIM

**OS EFEITOS DA LUZ NO METABOLOMA DA CULTURA
IN VITRO DO MICÉLIO DE *Lasiodiplodia theobromae***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano

Maceió

2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

C932e Crispim, Alexandre Carmo.

Os efeitos da luz no metaboloma da cultura *in vitro* do micélio de
Lasiodiplodia theobromae / Alexandre Carmo Crispim. – 2020.
121 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'ana.

Co-orientador: Luiz Carlos Caetano.

Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em
Química e Biotecnologia. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 68-76.

Apêndices: f. 77-121.

1. Fungos - Cultura e meios de cultura. 2. *Lasiodiplodia theobromae*. 3.
Fungos - Metabolismo. 4. Estresse oxidativo. I. Título.

CDU: 582.28



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **ALESSANDRE CARMO CRISPIM** intitulada: “OS EFEITOS DA LUZ NO METABOLOMA DA CULTURA *IN VITRO* DO MICÉLIO DE *LASIODIPLODIA THEOBROMAE*”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 9 de julho de 2020, às 14h, por meio de videoconferência realizada através da ferramenta *Google Drive* pelo link

meet.google.com/axh-kcbh-uam

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano
Orientador (IQB/UFAL)

Prof. Dr. Edson de Souza Bento
(IQB/UFAL)

Prof. Dr. Roberto Ramos Sobrinho
(Postdoctoral Research Associate I - School
of Plant Sciences/The University of Arizona)

Prof. Dr. Alberdan Silva Santos (Faculdade de
Química-UFPA)

Prof. Dr. Francis Soares Gomes
(IQB/UFAL)

Profa. Dra. Ruth Rufino do Nascimento
(PPGQB/IQB/UFAL)

Dedico todas as minhas vitórias primeiramente a DEUS, que sempre atendeu minhas preces, depois aos meus pais, Geliete e Edivar Crispim, aos irmãos João Emerson e Felipe que da forma que puderam sempre tentaram fazer o melhor para me ajudar, dedico também a minha esposa Shirley Melo por estar sempre ao meu lado, e a minhas filhas Alexia e Melissa

por toda alegria que me trazem e por serem minha maior fonte de força para batalhar e seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os meus amigos e amigas de laboratório: Mariel Matias, Lucas Fernando, Jéssica Barros, Jeferson Santana e Nanda Kivia por todas as ajudas e alegrias que tivemos juntos já há alguns anos. A Raquel Ferreira por ter me iniciado no laboratório e por todos seus conselhos. A minha eterna co-orientadora, Prazeres Menezes, por todo conhecimento passado e conselhos. Ao Adilson que tanto me ajudou com meus experimentos e análises. A Stephanie Cordova, Isah Ferreira, Dona Rosilda e Douglas Rozendo por toda companhia que me proporcionaram.

Agradeço a Jéssica Rocha pelo conhecimento compartilhado durante meu mestrado que trago até hoje.

Aos meus orientadores Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, Luiz Carlos Caetano e Edson de Souza Bento, inicialmente por terem aceitado me orientar durante essa fase da minha vida, o qual foi muito proveitosa, e por todo conhecimento que continuo adquirindo, algo que dinheiro nenhum pode pagar.

Agradeço a CAPES por ter garantido os 4 anos de bolsa, para que eu pudesse me manter na universidade e realizar esse projeto.

E agradeço a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram em minha formação.

“Pessoas vencedoras não são aquelas que nunca falham. São aquelas que nunca desistem...”

.....

“Tente, porque o não você já tem, o pior que pode acontecer é ficar como está.”

Edson de Souza Bento

RESUMO

Os fungos constituem um grupo de microrganismos de grande interesse industrial e científico. Algumas linhagens de diversas espécies de fungos são utilizadas na produção de alimentos, pigmentos, bebidas e medicamentos. *Lasiodiplodia* é um gênero membro da família *Botryosphaeriaceae*, e classe dos *Dothideomycetes*. Esta família contém inúmeras espécies que ocorrem como saprófitas, parasitas ou endófitas em uma grande variedade de plantas hospedeiras, sendo considerada uma espécie cosmopolita. Com o objetivo de identificar e monitorar os metabólitos presentes na cultura do fungo endofítico *Lasiodiplodia theobromae*, o fungo foi cultivado em meio BD (Batata-Dextrose) durante quatro semanas, sob agitação contínua (160 rpm), com presença e ausência de radiação luminosa. Culturas miceliais foram coletadas a cada sete dias, liofilizadas e maceradas em uma solução tampão (fosfato de sódio) pH 6,0 e com 10% de D₂O. As soluções tampão contendo os metabólitos extraídos foram transferidas para tubos de RMN de 5mm e analisadas por RMN-1H (Bruker 400 MHz). Os dados obtidos foram pré-processados no software TopSpin[®], e a região contendo o sinal da água foi suprimida utilizando-se do experimento NOESY1D (sequência de pulso *noesypr1d*). Para identificação dos metabólitos, foram utilizados bancos de dados da literatura. O fungo identificado morfológicamente como *L. theobromae*, teve os metabólitos isoleucina, leucina, valina, etanol, lactato, alanina, lisina, acetato, N⁶-acetilisina, N-Acetilornitina, metionina, acetona, glutamato, succinato, piruvato, glutamina, aspartato, metilguanidina, betaina, metanol, guanidoacetato, glicose-6-fosfato, glicose, UDP-glicose, uracila, guanosina, fumarato, tirosina e histidina identificados a partir das culturas de *L. theobromae* crescidas em ambas condições de presença e ausência de radiação luminosa. A matriz de dados com os valores alinhados e normalizados foi obtida com o software AMIX[®] e as análises multivariadas foram realizadas com software SIMCA[®] e a plataforma online www.metaboanalyst.ca. A análise estatística multivariada mostrou que apesar da diferença na produção de pigmento e biomassa, o metabolismo das culturas são qualitativamente semelhantes, porém quantitativamente diferentes, com maior concentração dos metabólitos glicerol, colina, fosfocolina, betaína, acetoacetato, acetona e β -hidroxibutirato nas culturas expostas a luz, e uma maior concentração dos metabólitos tirosina, fenilacetato, valina e leucina nas culturas não expostas a luz, revelando que as culturas expostas ao fotoperíodo tiveram seu metabolismo oxidativo intensificados. Por fim, revelou-se uma maior oxidação tirosina induzida pela luz, sugerindo que as culturas de *L. theobromae* produzem DOPA-melanina em vez de DHN-melanina.

Palavras chaves: Fungo, *Lasiodiplodia theobromae*, metabolismo, estresse oxidativo

ABSTRACT

Fungi defined a group of microorganisms of great industrial and scientific interest. Some strains of species of fungi are used in the production of food, pigments, drinks and medicines. *Lasiodiplodia* is a genus of the *Botryosphaeriaceae* family, and a class of *Dothideomycetes*. This family contains species that occur as saprophytes, parasites or endophytes in a wide variety of host plants, being considered a cosmopolitan species. In order to identify and monitor the metabolites present in the culture of the endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae*, the fungus was grown in PD medium (Potato-Dextrose) for four weeks, under continuous observation (160 rpm), with the presence and absence of light radiation. Mycelial cultures were collected every seven days, lyophilized and macerated in a buffer solution (sodium phosphate) pH 6.0 and with 10% D₂O. As buffer solutions containing extracted metabolites, they were transferred to 5mm NMR tubes and analyzed by ¹H-NMR (Bruker 400 MHz). The data obtained were pre-processed using the TopSpin® software, and the region containing the water signal was suppressed using the NOESY1D experiment (pulse sequence noesypr1d). To identify the metabolites, the literature databases were used. The fungus morphologically identified as *L. theobromae*, had the metabolites isoleucine, leucine, valine, ethanol, lactate, alanine, lysine, acetate, N⁶-acetylisine, N-Acetylmethionine, methionine, acetone, glutamate, succinate, pyruvate, glutamine, aspartate, methylguanidine, betaine, methanol, guanidoacetate, glucose-6-phosphate, glucose, UDP-glucose, uracil, guanosine, fumarate, tyrosine and histidine emerged from *L. theobromae* cultures grown under both conditions of presence and absence of light. The data matrix with the appropriate and normalized values was obtained with the AMIX® software and the multivariate analyzes were performed with the SIMCA® software and an online platform www.metaboanalyst.ca. A multivariate statistical analysis revealed that despite the difference in pigment and biomass production, the metabolism of cultures is qualitatively similar, but quantitatively different, with the highest concentration of the metabolites glycerol, choline, phosphocholine, betaine, acetoacetate, acetone and β-hydroxybutyrate in cultures exposed to light, and a higher concentration of the metabolites tyrosine, phenylacetate, valine, leucine and isoleucine in cultures not exposed to light, revealing that as an exported culture, the photoperiod had its oxidative metabolism intensified, ultimately revealed a greater induced tyrosine oxidation by light, suggesting that *L. theobromae* cultures perform DOPA-melanin instead of DHN-melanin.

Key words: Fungus, *Lasiodiplodia theobromae*, metabolism, oxidative stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais malefícios causados por fungos	17
Figura 2. Potencial de interação e utilização dos fungos	18
Figura 3. Representação de diferentes hifas (b) Representação de diferentes micélios	19
Figura 4. Três tipos de vias não lineares.....	22
Figura 5. Espectros de RMN- ¹ H a esquerda com a linha de base não corrigida e a direita com a correção da linha de base	28
Figura 6. Espectro de RMN a) antes do alinhamento b) após o alinhamento.	29
Figura 7. Representação do aumento da resolução do espectro de RMN- ¹ H, para o mesmo composto, quando se utiliza equipamento de RMN com campos maiores.	33
Figura 8. Espectro bidimensional de RMN (HSQC) mostrando qual sinal de hidrogênio está interagindo com qual sinal de carbono a 1 ligação.	33
Figura 9. (a) Tetrametil-silano (TMS) e (b) Trimetilsilil propionato de sódio (TSP)	35
Figura 10. a) Espectro de RMN 2D J-resolvido ¹ H, em b) do composto que possui seu espectro de RMN- ¹ H.....	36
Figura 11. a) Cultura com 1 semana; b) Cultura com 4 semanas.....	42
Figura 12. a) Espectro de RMN- ¹ H sem supressão do sinal ressonância da água; b) Espectro de RMN- ¹ H com supressão do sinal ressonância da água.	43
Figura 13. Espectro de RMN- ¹ H, para cultura com 12h de fotoperíodo, sendo: a) 1 ^a semana, b) 2 ^a semana, c) 3 ^a semana, d) 4 ^a semana e e) CQ	44
Figura 14. Espectro de RMN- ¹ H, para cultura com 0h de fotoperíodo, sendo: a) 1 ^a semana, b) 2 ^a semana, c) 3 ^a semana, d) 4 ^a semana e e) CQ	44
Figura 15. (a) Espectro de RMN- ¹ H da amostra CQ com 12 h de luz, (b) Espectro de J-Resolvido da amostra CQ com 12 h de luz.....	46
Figura 16. (a) Espectro de RMN- ¹ H da amostra CQ com 0 h de luz, (b) Espectro de J-Resolvido da amostra CQ com 0 h de luz.	47
Figura 17. Sobreposição de 49 espectros de RMN- ¹ H.....	50
Figura 18. Sobreposição de 49 espectros de RMN- ¹ H, alinhados, cortados e normalizados.	50
Figura 19. Valor individual dos cinco primeiros componentes principais (azul), e o valor acumulado dos cinco primeiros componentes principais (verde).....	52
Figura 20. a) Gráfico de scores das amostras obtido por PCA, relacionando as semanas e condição de crescimento do fungo (L = recebeu 12h de luz por dia, D = não foi exposto a luz). b) Gráfico do loadings para o PCA relacionando os pesos das duas primeiras PCs, c) <i>Dendrograma obtido para as 4 PCs com o método de Ward de agrupamento</i>	53
Figura 21. Dendrograma associado ao mapa de calor (heatmap) para os 27 metabólitos mais importante e sua variação temporal ao longo das 4 semanas. A cor está correlacionada positivamente com intensidade da variação dos metabólitos com vermelho indicando alta-intensidade e azul indicando baixa-intensidade.	54
Figura 22. Rota metabólica da reserva de carboidrato em fungos.	55
Figura 23. a) Score do OPLS-DA, b) S-LINE do OPLS-DA.	56
Figura 24. Box-plot dos metabólitos com maiores índices de discriminância (p<0,05), segundo o S-LINE do OPLS-DA e o loading do PCA, onde D = dark, L = fotoperíodo (recebeu 12h de luz por dia).	60
Figura 25. Rota metabólica dos compostos discriminantes, tendo em azul os discriminantes quando não há luz, e em vermelho o discriminante quando há luz.	61

Figura 26.....	77
Figura 27. Estrutura dos metabólitos identificados.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Necessidades básicas nutricionais de Fungos (Kavanagh, 2005)	20
Tabela 2. Massas secas de <i>L. theobromae</i> micelial obtidas durante o ciclo de crescimento sob diferentes condições de cultivo.	42
Tabela 3. Valores de deslocamento químico, multiplicidade e constante de acoplamento dos metabólitos identificados, para as duas condições de cultivo.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AQ → Tempo de Aquisição
- ATP → Adenosina Trifosfato
- BCAA → Ácidos de Cadeias Ramificadas
- BD → Batata-Dextrose
- BDA → Batata-Dextrose-Ágar
- CQ → Controle Qualitativo
- CV → Validação-Cruzada
- DMSO → Dimetilsulfóxido
- D1 → Tempo de Relaxação
- D₂O → Oxido de Deutério
- DHN → 1,8-di-hidroxi-naftaleno
- DOPA → L-di-hidroxi-fenilalina
- FADH₂ → Dinucleotídeo de Flavina e Adenina
- FID → Decaimento da Energia Livre
- g → gramas
- HCA → Análise Hierárquica de Agrupamento
- HSQC → Correlação Heteronuclear Single Quantum
- L → Litros
- L. theobromae* → *Lasiodiplodia theobromae*
- M → mol/L
- MHz → Mega Hertz
- mL → Mililitros
- mm → Milímetro
- mM → Milimolar
- MVA → Via do Ácido Mevalônico
- NADH → Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

NADPH → Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

NS → Número de Experimentos

OIP →

OMS → Organização Mundial da Saúde

OPLS-DA → Análise Discriminante Ortogonal por Mínimo Quadrado Parciais

PCA → Análise de Componente Principais

pH → Potencial hidrogeniônico

PLS → Mínimo Quadrado Parciais

PLS-DA → Análise Discriminante por Mínimo Quadrado Parciais

ppm → Parte Por Milhão

RMN → Ressonância Magnética Nuclear

RMN-¹H → Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

rpm → Rotação Por Minuto

SW → Largura da Janela

TD → Número de Pontos do Espectro

TMS → Tetrametil-silano

TSP → Trimetilsilil Propionato de Sódio

UDP → Uridina difosfato

μL → Microlitros

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	FUNGOS.....	17
3.1.1	Nutrição.....	19
3.1.2	Metabolismo	21
3.2	FUNGOS ENDOFÍTICOS	23
3.3	EFEITO DA LUZ (FOTOTROPISMO)	25
3.4	LASIODIPLODIA.....	25
3.5	METABOLÔMICA	26
3.6	PRE-TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS MULTIVARIADOS	27
3.6.1	Pre-tratamento.....	28
3.6.2	Análise dos Dados.....	30
3.7	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	32
3.7.1	Obtendo o Espectro de RMN- ¹ H.....	34
3.7.2	Deslocamento Químico	34
3.7.3	Integração.....	35
3.7.4	Acoplamento	35
3.7.5	J-Resolvido.....	36
4.	METODOLOGIA.....	37
4.1	ESTERILIZAÇÃO	37
4.2	MEIOS DE CULTURA.....	37
4.2.1	MEIO BATATA-DEXTROSE-ÁGAR (BDA).....	37
4.2.2	MEIO BATATA-DEXTROSE (BD)	37
4.3	CONDIÇÕES DE CULTIVO	37
4.4	TAMPÃO FOSTATO	38
4.5	EXTRAÇÕES.....	38
4.6	METABOLÔMICA	39
4.6.1	Experimentos de RMN.....	39
4.6.2	Análise	40

4.7	4.6.3 Análise estatística e quimiometria.....	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	INFLUÊNCIA DA LUZ NA BIOMASSA E NA PRODUÇÃO DO PIGMENTO.	41
5.2	IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS.....	43
5.3	ANÁLISE MULTIVARIADA.....	49
5.3.1	PCA e HCA.....	51
5.3.2	OPLS-DA.....	55
6.	CONCLUSÃO	62
7.	REFERÊNCIAS.....	63
	APÊNDICE A.....	72
	APÊNDICE B.....	77
	APÊNDICE C.....	78
	APÊNDICE D.....	80
	APÊNDICE E	85

1. INTRODUÇÃO

A natureza tem sido, por milhares de anos, uma fonte de agentes terapêuticos, sendo muitos fármacos existentes derivam de fontes naturais (SARKER et al., 2006).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 75% das pessoas ainda recorrem primeiramente a produtos à base de plantas para tratar problemas de saúde (SARKER et al., 2006).

Fungos são organismos metabolicamente ativos que são explorados comercialmente como fábricas celulares para a produção de enzimas e uma grande variedade de metabólitos. São conhecidas diversas fontes de compostos bioativos de fungos e a pesquisa para o isolamento de novos metabólitos a partir de fungos, que teve início há muitos anos, ainda continua muito ativa (ARCHER *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2010). Embora haja várias aplicações tanto à natureza como a biodegradação de materiais orgânico (Dashtban, 2010), e o controle da proliferação de outros microrganismos (Verma, 2007), o ser humano também faz uso de seu potencial desde a indústria alimentícios (Valduga, 2009) à produção de medicamentos (Barros, 2011; Butler, 2004). Produtos naturais de fungos tem sido fármacos revolucionários contra diversas doenças, e tem servido como inspiração para fármacos inovadores (JIANG e AN, 2000).

Uma habilidade importante dos fungos é sua capacidade de se adaptarem à diversos ambientes, para garantir sua sobrevivência e seu desenvolvimento, liberando enzimas extracelulares que irão degradar moléculas orgânicas complexas em moléculas simples assimiláveis, uma vez que nem todas as moléculas tem livre passagem para atravessar a membrana celular, dando início ao processo de desenvolvimento do fungo (GROW; GADD, 1995; Maggi, 2013; Selbmann, 2013).

Pelos estudos até agora realizados a ausência de luz pode levar ao aumento da concentração de alguns metabólitos, pois dependendo da época do ano e da geolocalização, o fungo pode receber mais ou menos luz solar, o que pode influenciar seu desenvolvimento e conseqüentemente a produção de metabólitos secundários (VELMURUGAN *et al.*, 2010; KIM; SON; LEE, 2013; TISCH; SCHMOLL, 2010).

A metabolômica é uma técnica usada para detectar e/ou quantificar todos parte dos metabólitos produzidos por um metaboloma, destacando-se por permitir o estudo provocado por um estresse seja ele biótico ou abiótico. Ao analisar um metaboloma, será detectado tanto

os metabólitos primários quanto os secundários (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2007). No caso dos microrganismos, o metabolismo pode tanto ocorrer dentro da célula como fora dela através da secreção de enzimas extracelulares (KASTURE *et al.*,2012).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito da luz no metabolismo da cultura micelial do fungo endofítico *L. theobromae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar, semanalmente, os metabólitos presentes nas culturas do fungo *L. theobromae*, durante um período de cultivo de quatro semanas, utilizando-se da técnica de RMN-¹H, avaliando o cultivo com e sem luminosidade;
- Avaliar o efeito da luminosidade no perfil metabolômico do endofítico *L. theobromae*;
- Identificar os metabólitos discriminantes através de técnica multivariadas como PCA e OPLS-DA.
- Obter quantificação relativa dos metabólitos identificados na cultura do fungo *L. theobromae*, mostrando a evolução metabólica ao longo de quatro semanas de cultivo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A medicina e os produtos naturais estão intimamente ligados através da utilização de medicamentos populares (BUTLER, 2004). Os produtos naturais têm sido a fonte de maior sucesso de droga em potencial. No entanto, os recentes esforços na implementação de descoberta e desenvolvimento de drogas sintéticas têm demonstrado um declínio no interesse de produtos naturais. Entretanto, os produtos naturais continuam a fornecer uma diversidade estrutural única em comparação com a química combinatória padrão, que apresenta oportunidades para descobrir novos compostos, principalmente de baixo peso molecular. Uma vez que menos de 10% da biodiversidade do mundo foi avaliada, muitos compostos naturais podem ser descobertos, com o desafio sendo acessar essa diversidade química natural (MISHRA; TIWARI, 2011; REY-LADINO *et al.*, 2011; CRAGG; NEWMAN, 2005; HAEFNER, 2003; BUTLER, 2004), que se apresenta além das plantas, em fungos, animais marinhos, entre outros.

3.1 FUNGOS

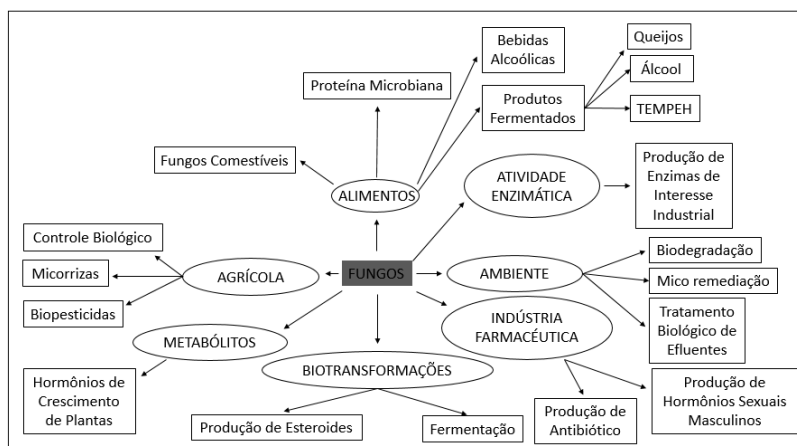
Normalmente os fungos são lembrados como bolores, mofo e cogumelos estando relacionados apenas a coisas ruins (figura 1). No entanto, o ser humano é mais dependente dos fungos do que se pode imaginar, seja de forma direta como na produção de pães, combustíveis, entre vários outros produtos, seja de forma indireta como na degradação do lixo produzido pelo ser humano (figura 2).

Figura 1. Principais malefícios causados por fungos



Fonte: PUTZKE e PUTZKE 2002

Figura 2. Potencial de interação e utilização dos fungos



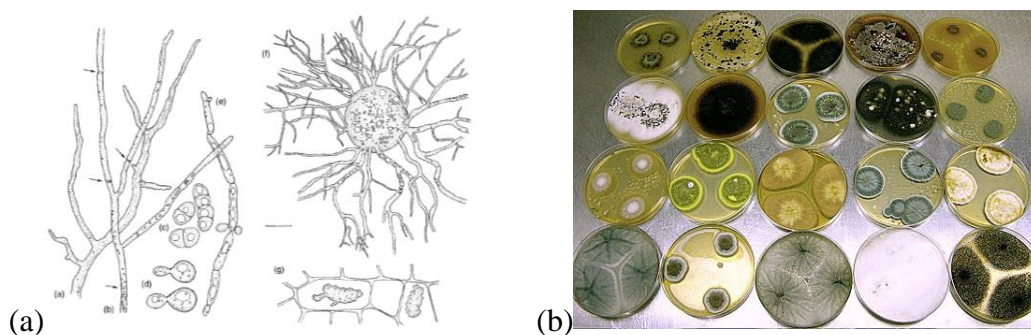
Obs. TEMPEH → Produto tradicional da Indonésio, feito de soja fermentada.

Fontes: ESPOSITO, 2010 apud ALEXOPOULOS, 1996.

Os fungos formam um dos grupos de organismos mais numerosos sobre a terra, com novas espécies sendo continuamente descritas. HAWKSWORTH (2001) publicou que eram estimados a existência de 1,5 milhões de espécies diferentes, sendo que apenas 69 mil tinham sido descritas (menos de 5%), a partir dos mais variados locais (solo, água, ar, plantas, animais e insetos). Recentemente, um trabalho publicado por HAWKSWORTH e LÜCKING (2017), descreve uma estimativa de 3,8 milhões de espécies diferentes, tendo sido descritas cerca de 120 mil espécies (pouco mais de 3%).

Os fungos são seres eucariontes, desprovidos de clorofila, e heterotróficos. Morfologicamente, são formados por um emaranhado de filamentos de células, denominadas **hifas**, as quais variam em diâmetro, espessura (Figura 3.a) e cor, e facilitam a colonização das fontes de alimentos, e sua reprodução. O tamanho das hifas pode variar de 1 a 30 mm, ou mais, dependendo da espécie e das condições de crescimento. O conjunto de hifas é denominado **micélio** (Figura 3.b), o qual pode ser de três tipos bem distintos: os cogumelos, constituídos de um tecido de biomassa bem compacto; os filamentos com uma rede micelial mais maleável; as leveduras que possuem estruturas unicelulares. (PELCZAR *et al.* 1997, PUTZKE; PUTZKE, 2004; TORTURA *et al.*, 2006; WEBSTER; WEBER, 2007; KAVANAGH, 2005).

Figura 3. Representação de diferentes hifas (b) Representação de diferentes micélios



Fontes: (a) WEBSTER; WEBER, 2007, (b) < <http://cienciahoje.uol.com.br/revista-ch/2011/286/quando-os-microrganismos-salvam-vidas>> acessado em: 08/06/2015

3.1.1 Nutrição

O crescimento dos fungos depende de vários fatores tais como pH (Gunasekaran; Poorniammal, 2008), temperatura (Poorniammal *et al.*, 2012), tempo, taxa de agitação, aeração (Unagul *et al.*, 2005), luminosidade (Velmurugan, 2010), e nutrientes (Cho *et al.*, 2002; Pradeep e Pradeep, 2013) (Tabela 1), permitindo manter uma produção contínua e quase que ilimitada (Mapari *et al.* 2009). A escolha correta das condições de crescimento pode intensificar a produção de seus metabólitos secundários ou de um metabólito específico.

De todos os fatores que influenciam o crescimento dos microrganismos, pode-se dizer que os nutrientes são os mais importantes, pois a ausência de um ou vários nutrientes, pode impedir a produção e/ou ação de alguma proteína, que possa ser fundamental para o desenvolvimento do microrganismo (ESPOSITO, 2010; PUTZKE; PUTZKE, 2002; NELSON; COX, 2014)

Os fungos são seres **heterótrofos**, ou seja, são incapazes de produzirem seu próprio alimento, sendo necessário parasitar outros ambientes ou organismos para conseguirem obtê-los, tendo sua necessidade nutricional dividida em duas classes, os macronutrientes (exigindo em quantidades por volta de 10^{-3} M) e os micronutrientes (requeridos em quantidades por volta de 10^{-6} M), tendo como macronutrientes carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, potássio, nitrogênio, enxofre e magnésio e como micronutrientes ferro, cobre, manganês, zinco e molibdênio. Para alguns fungos também são necessários como micronutrientes escândio, gálio, vanádio e cobalto (PUTZKE; PUTZKE, 2002 apud RUIZ-HERRERA *et al.*

1990, SERANO; RODRIGUEZ-DE-VALE, 1990, FRIES, 1965). A tabela 1 descreve a finalidade de alguns nutrientes.

Tabela 1. Necessidades básicas nutricionais de Fungos (Kavanagh, 2005)

Elemento	Fontes Comuns	Função na Célula
Carbono	Açúcar	Estrutura elementar das células do fungo em combinação com hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Fonte de energia
Hidrogênio	Prótons de ambientes ácidos	pH ácido intracelular (em torno de 5-6) necessária para o metabolismo dos fungos
Oxigênio	Ar, O ₂	Substrato para respiratório e outras enzimas oxidativas de função mista. Essencial para a síntese de ergosterol e ácido oleicos insaturados
Nitrogênio	Sais de NH ₄ ⁺ , ureia, amino ácidos	Estruturalmente e funcionalmente como nitrogênio amínico orgânico em proteínas e enzimas
Fósforo	Fosfatos	Transformação de energia, ácido nucleico e estrutura da membrana
Potássio	Sais de K ⁺	Balanco iônico, atividade enzimática
Magnésio	Sais de Mg ²⁺	Atividade enzimática, células e estrutura de organelas
Enxofre	Sulfetos, Metionina	Aminoácidos e vitaminas sulfídrico
Cálcio	Sais de Ca ²⁺	Possível mensageiro secundário na transdução de sinal
Cobre	Sais de cobre	Pigmento redox
Ferro	Sais de ferro: Fe ³⁺ é quelatado e lançado como Fe ²⁺ dentro da célula	Proteínas heme, citocromos
Magnésio	Sais de Mn ²⁺	Cofator enzimático
Zinco	Sais de Zn ²⁺	Cofator enzimático
Níquel	Sais de Ni ²⁺	Cofator enzimático
Molibdênio	Na ₂ MoO ₄	Metabolismo de nitratos, vitamina B ₁₂

3.1.2 Metabolismo

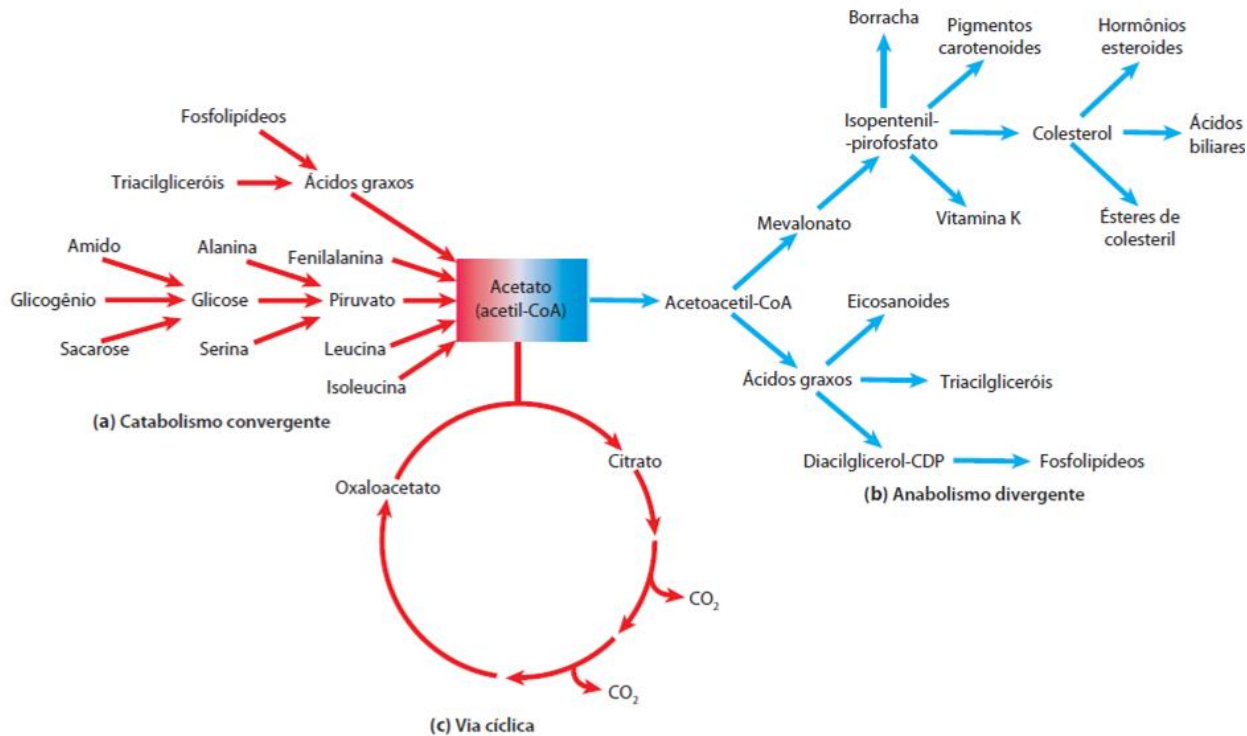
Metabolismo corresponde a uma série de transformações químicas ligadas que se inicia com uma molécula em particular e a transforma em outra ou em outras. Junto com essas transformações também ocorre o armazenamento e consumo de energia para atividades biológicas (BERG *et al.* 2010; PUTZKE; PUTZKE, 2002), compreendendo em uma série de reações químicas divididas em catabolismo e anabolismo.

“O **catabolismo** é a fase de degradação do metabolismo, na qual moléculas nutrientes orgânicas (carboidratos, gorduras e proteínas) são convertidas em produtos finais menores e mais simples (como ácido láctico, CO₂ e NH₃). As vias catabólicas liberam energia, e parte dessa energia é conservada na forma de ATP e de transportadores de elétrons reduzidos (NADH, NADPH e FADH₂); o restante é perdido como calor. O **anabolismo**, também chamado de biossíntese, precursores pequenos e simples formam moléculas maiores e mais complexas, incluindo lipídeos, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. As reações anabólicas necessitam de fornecimento de energia, geralmente na forma de potencial de transferência do grupo fosforil do ATP e do poder redutor de NADH, NADPH e FADH₂.” (NELSON; COX, 2014)

NELSON e COX (2014) também descrevem que: “algumas vias metabólicas são lineares e algumas são ramificadas, gerando múltiplos produtos finais úteis a partir de um único precursor ou convertendo vários precursores em um único produto. Em geral, as vias catabólicas são *convergentes* e as vias anabólicas são *divergentes*. Algumas vias são cíclicas: um composto inicial da via é regenerado em uma série de reações que converte outro componente inicial em um produto” (Figura 4).

O metabolismo dos microrganismos inicia-se, se necessário, na adaptação do meio o qual será parasitado, liberando enzimas extracelulares que degradará moléculas orgânicas complexas em moléculas simples assimiláveis, uma vez que nem todas as moléculas tem livre entrada na célula, como é o exemplo da sacarose, que necessita ser degradada a frutose e glicose, para que possam atravessar a membrana celular e só então ser metabolizada internamente (ESPOSITO, 2010; GROW; GADD, 1995).

Figura 4. Três tipos de vias não lineares



Fonte: NELSON; COX, 2014

O metabolismo dos fungos geralmente está dividido visando a produção de dois tipos de metabólitos:

1- Metabólitos primários

Metabólitos primários estão envolvidos no crescimento, desenvolvimento e reprodução do organismo. O metabólito principal é tipicamente um componente-chave na manutenção de processos fisiológicos normais; assim, é muitas vezes referido como um metabólito central. Metabólitos primários são tipicamente formados durante a fase de crescimento, como resultado do metabolismo energético, e são consideradas essenciais para o crescimento adequado (Boudless, 2018). São usados em indústrias alimentícias e de ração incluindo álcoois (etanol), aminoácidos (glutamato monossódico, lisina, treonina, fenilalanina, triptofano), nucleotídeos flavorizantes (ácido 5-guanílico, ácido 5-inosínico), ácidos orgânicos (acético, propiônico, fumárico, láctico), polióis (glicerol, manitol, xilitol), polissacarídeos (xantona), açúcares (frutose, ribose) e vitaminas (riboflaxina, cianocobalamina, biotina) (DEMAIN, 2000; RAJASEKARAN *et al.*, 2008).

2- Metabólitos secundários

Em contraste aos metabólitos primários, os metabólitos secundários não são essenciais ao crescimento e de fato pode ter pouca ou nenhuma função primária dentro do organismo. Os metabólitos secundários são produzidos quando o organismo entra na fase estacionária. Os metabólitos produzidos nesta fase são muitas vezes associados com a diferenciação e a esporulação e podem ter importantes atividades biológicas, as quais, em alguns casos, têm sido exploradas economicamente (KAVANAGH, 2005).

Na natureza, metabólitos secundários são importantes para os organismos que os produzem, funcionando como (i) hormônios sexuais, (ii) ionóforos, (iii) “armas” competitivas contra bactérias, fungos, amebas, insetos e plantas, (iv) atividades desconhecidas (DEMAIN; ADRIO, 2008). Metabólitos secundários são usualmente separados em cinco grupos: derivados de aminoácidos, peptídeos não ribossomais, policetídeos, derivados de ácidos graxos e híbridos de policetídeos-peptídeos (KEMPKEN; ROHLFS, 2010; ROZE *et al.*, 2011).

Através do metabolismo da glicose são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. Esta é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias diferentes. Na primeira, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico para formar todos os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis). Na segunda, o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA). A combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados destes, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavanóides e dos taninos condensados (Figura 4) (SANTOS, 2004).

3.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

A palavra ‘endofítico’ etimologicamente significa ‘dentro da planta’ (endon: dentro, phyton: planta). Inicialmente, o termo endofítico foi introduzido por de Bary (1886) se referindo a qualquer organismo que colonizasse o interior de uma planta, mas foi Wilson em 1995 quem restringiu o termo unicamente para microrganismo, referindo-se somente a fungos e bactérias que não provocam danos aparentes a planta hospedeira, sendo os fungos os microrganismos que se tem isolado com maior frequência como endofítico (KUSARI *et*

al., 2012, RODRÍGUEZ *et al.*, 2009, SCHULZ; BOYLE, 2005, STROBEL *et al.*, 2004, TAN, 2001).

Os fungos vivem em mutualismo, comensalismo ou antagonismos com uma ampla faixa de organismo (KRIEL *et al.*, 2000). Os fungos não produzem clorofila, então, em alguns casos, sua sobrevivência depende do sucesso da sua associação com outros seres vivos, especialmente as plantas (ZOBERI, 1972).

O endofitismo se refere a uma associação de custo-benefício não obstrutiva, e sim assintomática e transitória, definida por localização, e que se estabelece dentro do tecido vivo da planta hospedeira (KURASI; HERTWECK; SPITELLER, 2012, RODRÍGUEZ *et al.*, 2009, SCHULZ; BOYLY, 2005, STROBEL *et al.*, 2004, TAN, 2001), o fungo passa a receber nutrição e abrigo da planta, aumentando sua sobrevivência. A planta, por sua vez, aumenta sua capacidade competitiva e sua resistência contra fatores bióticos (CLAY; SCHARDL, 2002) e abióticos (SAIKKONEN *et al.*, 1998; SCHARDL *et al.*, 2004). O mecanismo pelo qual o fungo beneficia e aumenta o desempenho do seu hospedeiro é através da secreção de metabólitos (SCHULZ *et al.*, 1995), beneficiando por meio de três mecanismos:

1. Direto: por meio de enzimas e/ou metabólitos secundários com atividade anti-patógeno, produzidos diretamente pelo fungo endofítico;
2. Indireto: consiste na indução ou aumento da expressão do mecanismo de defesa química ou fisiológica intrínsecos a sua planta hospedeira;
3. Ecológico: são realizadas por ocupar nichos ecológicos, hiper-parasitismo e predação (HERRE *et al.*, 2007, GAO *et al.*, 2010).

Os microrganismo endofíticos podem estar presentes em todos os órgãos de uma planta (PETRINI *et al.* 1992), possuindo as exoenzimas necessárias para colonizar seus hospedeiros (SCHULZ *et al.*, 2002), mas, usualmente, habitam as partes superiores de plantas como folhas, galhos, cascas, pecíolos e estruturas reprodutivas (FAETH; FAGAN, 2002). Estes micro-organismos foram descobertos em todas as plantas examinadas até o momento (ARNOLD *et al.*, 2000), sendo capazes de colonizar uma ampla faixa de hospedeiros, alguns mostrando especificidade à certas plantas (KRIEL *et al.*, 2000).

Os micro-organismos endofíticos constituem uma fonte potencial de produtos naturais pouco explorada, quando comparada às plantas e organismo marinhos. A maioria

das pesquisas com endofíticos têm sido realizadas em países do hemisfério norte e Nova Zelândia, os resultados de regiões tropicais são menos numerosos, mas têm mostrado que as plantas tropicais apresentam grande diversidade de micro-organismos endofíticos, muitos deles ainda não classificados e que podem pertencer a novos gêneros e espécies (AZEVEDO et al, 2000; STROBEL, 2002). Uma grande diversidade de metabólitos pode ser encontrada estudando fungos obtidos a partir de uma única espécie vegetal, pois se estima que cerca de $1,3 \times 10^6$ endofíticos habitem as 270.000 plantas vasculares conhecidas (BRADY; CLARDY, 2000).

3.3 EFEITO DA LUZ (FOTOTROPISMO)

Apesar dos fungos não serem seres fotossintéticos, eles são influenciados pela luz, usando a luz como fonte de informação e não como fonte de energia. O papel mais significativo que a luz desempenha para os fungos é nas respostas fototrópicas das estruturas reprodutivas e na sua formação. O fototropismo consiste em uma resposta do crescimento a presença de luz que causa uma inclinação para perto ou para longe da luz (TISCH; SCHMOLL, 2010, CHANG; MILES, 2004).

É bastante descrito a influência da luz na produção de biomassa, pigmentos, metabólitos secundários, reprodução etc., mas não se estuda detalhadamente como a luz afeta o metabolismo de fungos (VELMURUGAN *et al.*, 2010; KIM; SON; LEE, 2013; TISCH; SCHMOLL, 2010).

3.4 LASIODIPLODIA

Lasiodiplodia é um gênero membro da *Botryosphaeriaceae*, uma família nos *Dothideomycetes*. Esta família contém inúmeras espécies de fungos que ocorrem como saprófitas, parasitas ou endófitas em uma grande variedade de plantas hospedeiras, sendo considerada uma espécie cosmopolita. A família *Botryosphaeriaceae* acomoda numerosos gêneros de fungos, sendo as mais conhecidos *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum*, *Dothiorella* e *Sphaeropsis* (NETTO *et al.*, 2017; CROUS *et al.*, 2006).

3.5 METABOLÔMICA

O Metaboloma é a composição de todas as pequenas moléculas produzidas em um organismo. A tecnologia voltada para o fornecimento de uma visão geral compreensiva qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes em um organismo é denominada Metabolômica, sendo assim, é definida com base em critérios analíticos com base em comportamento biológico, referindo-se à soma total de metabólitos mensuráveis dentro de uma célula ou tipo de tecido (HALL, 2006; RICHAEDS, 2010).

Metabolômica é um termo recente, introduzido nos anos 2000 por Dr. Oliver Fiehn e colaboradores (FIEHN et al., 2000), e que vem sendo muito utilizado nesta era “OMICS”, de genômica, transcriptômica, proteômica, dentre outras. Os experimentos de metabolômica fornecem resultados únicos para melhorar a compreensão das informações biológicas relacionadas ao metaboloma e mais comumente à genômica funcional. O tamanho do metaboloma varia muito, pois depende do organismo estudado. *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, contém aproximadamente 600 metabólitos identificados até o momento, enquanto o reino das plantas tem aproximadamente 200.000 metabólitos primários e secundários (DUNN; ELLIS, 2005).

A maior limitação da metabolômica é a incapacidade de incluir todos os metabólitos em apenas uma análise, obtendo assim um perfil do metaboloma. Esta incapacidade está diretamente relacionada com a complexidade química do metaboloma, a variação biológica inerente (natural) nos organismos vivos, e a limitações no acesso instrumental (SUMMER *et al.*, 2003). Devido esta limitação, o estudo da metaboloma deve ser feito com técnicas analíticas que permitam tanto identificar como quantificar o maior número de moléculas em uma única análise (Kaddurah-Daouk, 2008). A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (seja só ou acoplada a um cromatógrafo ou eletroforese capilar) são as técnicas mais poderosas e amplamente utilizadas para o perfil metabólico não segmentado e direcionado, que é a análise composicional de espécies de baixo peso molecular em amostras biológicas complexas (RICHAEDS, 2010). A espectrometria de RMN tem a vantagem da alta facilidade para se realizar a análise, onde pode-se realizar uma extração direta, com solvente apropriado, e imediatamente se analisa o extrato, no entanto tem a desvantagem da baixa sensibilidade da análise; já a espectrometria acoplada a outra técnica, tem a vantagem de ser altamente sensível e seletivo, no entanto,

deve ser realizado um tratamento prévio na amostra para se poder analisar a amostra (ALIFERIS; JABAJI, 2010; CEVALLOS-CEVALLOS *et al.*, 2009; MUSHTAQ, 2013).

De acordo com KASTURE *et al.* (2012) o estudo da metabolômica se divide em três categorias:

- Perfil metabólico (do inglês ‘Metabolic profiling’)

Análise quantitativa do conjunto de metabolitos em uma via bioquímica selecionada ou uma classe específica de compostos. Isto inclui a análise do alvo, a análise de um número muito limitado de metabolitos, isto é, analitos únicos como precursores ou produtos de reações bioquímicas.

- Impressão digital metabólica (do inglês ‘Metabolic fingerprinting’)

Abordagem de avaliação global sem viabilidade para classificar amostras com base em padrões de metabolitos ou "impressões digitais" que mudam em resposta a doenças, perturbações ambientais ou genéticas com o objetivo final de identificar metabolitos discriminatórios.

- Metabolic foot printing (sem tradução do inglês)

Análise de impressão digital de metabolitos extracelulares no meio de cultura celular como reflexo da secreção ou absorção de metabolitos pelas células.

3.6 PRE-TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS MULTIVARIADOS

A geração de muitos dados que podem ser coletados a partir do uso das técnicas analíticas modernas, em estudos metabolômicos exige, necessariamente, a associação de técnicas e de abordagens estatísticas (VERPOORTE *et al.* 2007, HEYDEN, 2008). A partir do pré-tratamento dos dados, sejam aqueles obtidos por técnicas de separação e/ou espectroscópicas, técnicas quimiométricas capazes de selecionar informações relevantes poderão ser usadas para diferentes propósitos. Por exemplo, comparações de amostras para efeito de acesso de identidade podem ser feitas por meio de coeficientes de correlação ou calculando-se o grau de similaridade entre uma amostra e aquela de referência (HEYDEN, 2008). Já para estudos taxonômicos e de quimiosistemática, ou para correlacionar um perfil metabólico a uma determinada atividade biológica, a aplicação de técnicas quimiométricas de análise multivariada é recomendada (VERPOORTE *et al.*, 2007, HEYDEN, 2008). Elas permitem a classificação ou a formação de conglomerados de dados ou *clusters*, por meio da

análise de componentes principais (PCA) ou de análise hierárquica de agrupamentos (HCA), *mínimos quadrados parciais (PLS)*, análises discriminantes, análises de correlações, etc (VERPOORTE *et al.*, 2007, FUNARI *et al.*, 2012, HEYDEN, 2008).

3.6.1 Pre-tratamento

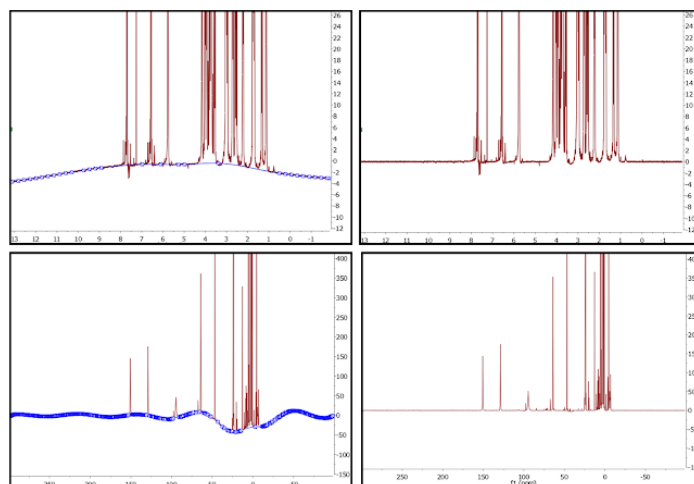
Entre os pré-tratamentos utilizados destacam-se os:

3.6.1.1 Correção da linha de base

Geralmente, o primeiro passo do pré-processamento de dados é a correção da linha de base. As distorções basais afetam não apenas a análise estatística, mas também a quantificação dos metabolitos. Essas distorções podem ser corrigidas de muitas maneiras diferentes; geralmente é aplicada uma correção de linha de base automatizada. (SMOLIŃSKA, 2012)

Na figura 5 pode-se verificar a diferença entre um espectro de RMN antes e após a correção da linha de base.

Figura 5. Espectros de RMN-¹H a esquerda com a linha de base não corrigida e a direita com a correção da linha de base



Fonte: <http://nmr-analysis.blogspot.com.br/2013/12/nmr-baseline-correction-new-method-in.html>, acessado em 18/02/2018

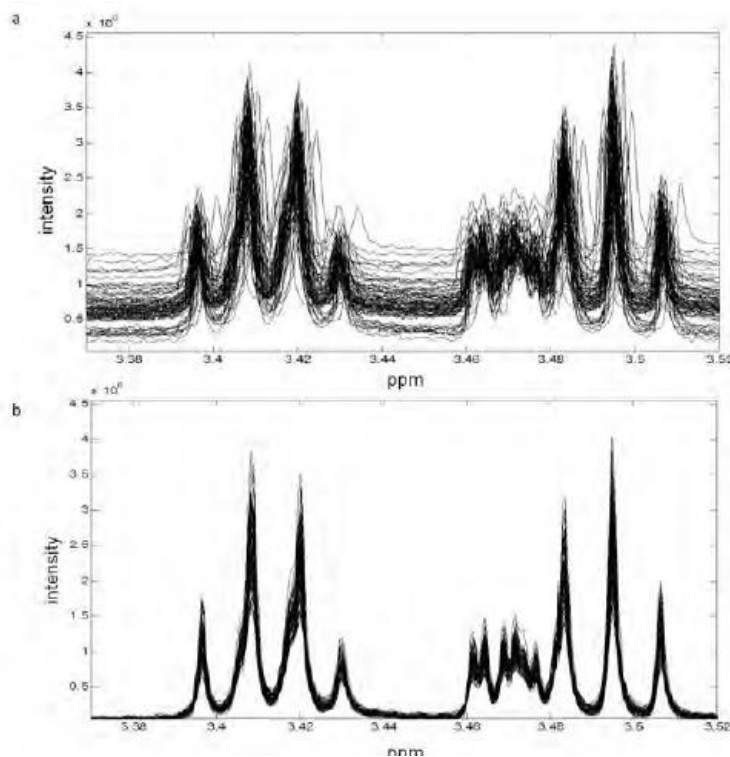
3.6.1.2 Alinhamento

Um dos problemas mais frustrantes com perfis de RMN, de um ponto de vista de análise de dados multivariada, é a presença de mudanças de posição dos picos entre diferentes

espectros. Essas variações obscurecem a descoberta de padrões no espectro. Os deslocamentos podem ser devidos a fatores instrumentais, mudanças de pH e temperatura, mudanças de concentração de sal e concentração relativa de íons específicos. Todos esses parâmetros influenciam os deslocamentos dos picos, embora nem todos os picos sejam afetados na mesma extensão. (SMOLIŃSKA, 2012)

Na figura 6 pode-se verificar a diferença entre um espectro de RMN antes e após o alinhamento.

Figura 6. Espectro de RMN a) antes do alinhamento b) após o alinhamento.



Fonte: SMOLIŃSKA, 2012

3.6.1.3 Normalização

Este passo de pré-processamento tenta explicar as variações das concentrações globais das amostras. O objetivo principal é fazer com que todas as amostras sejam comparáveis entre si, por exemplo removendo ou minimizando a quantidade total de material por amostra ou a diluição do metabólito. Nesta transformação, os valores de cada uma das variáveis de uma dada amostra são divididos por um fator de normalização, como por

exemplo, pela normal dessa amostra. Assim, todas as amostras estarão em uma escala predeterminada (SMOLIŃSKA, 2012; FERREIRA, 2015).

3.6.2 Análise dos Dados

3.6.2.1 Análise do Componente Principal (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês, Principal Component Analysis) é uma formulação matemática usada na redução da dimensão de dados (HAYKIN, 1999; JOLLIFFE, 1989), que foi introduzida por Karl Person em 1901, no entanto, só décadas mais tarde foi propriamente introduzida em trabalhos científicos, graças ao avanço de tecnologias capazes de realizarem os cálculos (FERREIRA, 2015).

O PCA é um método utilizado para projetar os dados multivariados em um espaço de dimensão menor, assim reduzindo a dimensionalidade do espaço regional do conjunto de dados, sem que as relações entre as amostras sejam afetadas. Os componentes principais apresentam propriedades importantes: cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados. Consequentemente, as informações relevantes serão separadas e ampliadas pelo “microscópio” de dados, tornando-se mais evidentes à inspeção visual. Utilizando essa metodologia é possível descobrir, visualizar e interpretar as diferenças existentes entre as variações e examinar as relações que podem existir entre as amostras. Essa análise também permite detectar amostras que apresentam um comportamento distinto, pois, com a projeção dos dados, elas tendem a se tornar evidentes. (FERREIRA, 2015; JOHNSON; WICHERN, 1998; HONGYU, 2015)

O PCA pode ser aplicado para se verificar diferenças e variações dos mais variados materiais de pesquisas como:

ALIFERIS e JABAJI (2010) mostraram que é possível visualizar pelo PCA, que há diferença nos espectros e cromatogramas dos estágios de desenvolvimento de esclerotia de *Rhizoctonia solani*, com 8, 16 e 24 dias, mesmo sendo imperceptível, visualmente, a suas diferenças pelos espectros e cromatogramas.

DUPORTET *et al.* (2012) analisaram quatro diferentes formas de extração em quatro diferentes microrganismos, e conseguiram verificar pelo PCA que havia diferença no padrão

dos extratos produzidos, e que em três dos microrganismos utilizados houve similaridade entre 2 dos métodos utilizados, enquanto no quarto microrganismo houve similaridade entre 2 outros métodos.

ZĄBEK *et al.* (2017) mostram que o PCA foi eficiente para diferenciar espécies de fungos, do mesmo gênero, através da análise, de uma simples extração, dos metabólitos produzido pelos fungos.

3.6.2.2 Análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA)

OPLS-DA é um método de análise multivariada que foi introduzido como uma melhoria do método PLS-DA para discriminar dois grupos (classes) ou mais (BYLESJO *et al.*, 2006; TRYGG E WOLD 2002). No OPLS-DA, um modelo de regressão é calculado entre os dados multivariados e uma variável de resposta que contém apenas informações de classe. A vantagem do OPLS-DA em relação ao PLS-DA é que um único componente é usado como preditor para a classe, enquanto os outros componentes descrevem a variação ortogonal ao primeiro componente preditivo. WIKLUND *et al.* (2008) usaram o termo *variação entre tratamento* (do inglês, *between treatment variation*) para descrever o efeito médio do tratamento, e, dentro da variação do tratamento, para descrever a variação do restante sistemático que não está relacionada ao tratamento. O efeito do tratamento é considerado igual para todos os assuntos, embora a magnitude seja permitida ser diferente para cada assunto. Os efeitos do tratamento que diferem do efeito médio do tratamento são referidos como dentro da variação do tratamento. Em outras, palavras, o modelo OPLS tenta encontrar uma relação linear entre uma matriz preditora X (por exemplo, dados espectrométricos de amostras biológicas) e uma matriz de resposta Y (por exemplo, resultados clínicos, tratamento, etc). Na metabolômica, a matriz de preditores X frequentemente tem mais colunas (variáveis preditoras) do que as linhas (indivíduos). Devido a esta propriedade dos dados de metabolômica, os modelos PLS e OPLS podem ser facilmente superados e sua previsibilidade superestimada.

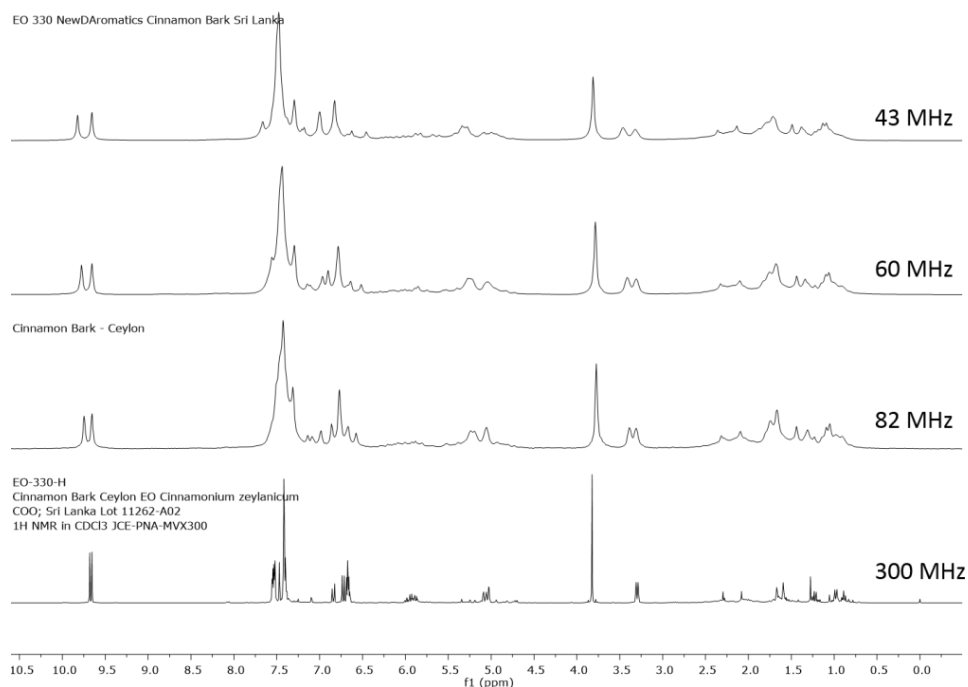
O método de análise OPLS-DA como todos os outros métodos de regressão é sensível à complexidade do modelo. Portanto, a validação-cruzada (CV) foi usada para estimar o número relevante de componentes nos modelos OPLS.

TRIBA *et al.* (2015) descrevem que a validação-cruzada padrão do SIMCA (software utilizado neste trabalho) é a chamada validação-cruzada K-fold. Os resultados do procedimento de validação-cruzada são resumidos pelo valor de diferentes parâmetros de qualidade. O mais frequentemente mencionado na literatura de metabolômica são os parâmetros R^2 e Q^2 (também chamado de R^2 validado por cruzamento). R^2 mede a afinidade de ajustes enquanto o Q^2 mede a capacidade preditiva do modelo. $R^2 = 1$ indica uma descrição perfeita dos dados pelo modelo, enquanto que $Q^2 = 1$ indica previsibilidade perfeita. R^2 aumenta monotonicamente com o número de componentes (NC) e se aproximará automaticamente de 1 se o número de componentes se aproximar do grau da matriz X. O Q^2 não chegará necessariamente a 1. Com um certo valor de número de componentes, Q^2 atinge um patamar e, geralmente, diminuirá finalmente com a adição de mais componentes. Isso indica que, em um certo grau de complexidade, a capacidade preditiva do modelo diminui. Nessa fase, é muito provável que o modelo esteja tentando ajustar características do conjunto de dados que não são mais representativas da população estudada. Uma grande discrepância entre R^2 e Q^2 indica uma sobreposição do modelo através do uso de muitas componentes. De acordo com o próprio SIMCA, $Q^2 = 0,5$ é admitido para uma boa previsibilidade. Foi demonstrado que, na prática, é difícil dar um limite geral que corresponda a uma boa previsibilidade uma vez que isso depende fortemente das propriedades do conjunto de dados.

3.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

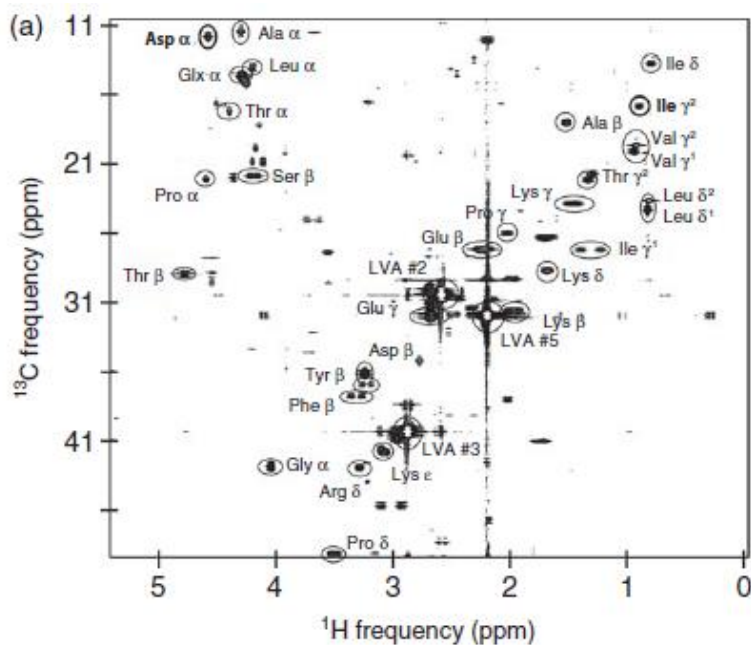
Com o desenvolvimento dos equipamentos de RMN, com magnetos supercondutores refrigerados com hélio líquido, os então chamados criomagnéticos, foi possível a obtenção de espectros com maior resolução (Figura 7), e o surgimento de novas técnicas de análise (Figura 8), possibilitando, cada vez mais, o uso da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear em trabalhos como elucidação de estruturas, estudo de fármacos e metabolômica, entre outros. (DUDDECK; DIETRICH, 1992; HOLZGRABE; DIEHL; WAWER, 2008; CARVALHO, *et al.* 2017)

Figura 7. Representação do aumento da resolução do espectro de RMN-1H, para o mesmo composto, quando se utiliza equipamento de RMN com campos maiores.



Fonte: <http://www.process-nmr.com/WordPress/?p=488>, visitado em 22/02/2018

Figura 8. Espectro bidimensional de RMN (HSQC) mostrando qual sinal de hidrogênio está interagindo com qual sinal de carbono a 1 ligação.



Fonte: HOLZGRABE; DIEHL; WAWER, 2008

3.7.1 Obtendo o Espectro de RMN-¹H

Uma vez que a amostra é inserida no espectrômetro de RMN, os núcleos sofrem o efeito de um campo magnético denominado B_0 , que alinha o núcleo de todos os átomos paralelamente a este campo magnético. Uma vez que todos os núcleos estão alinhados, são aplicados pulsos de radiofrequência, denominados B_1 , perpendicular ao campo B_0 . Por convenção, considera-se que o sentido do campo B_0 está paralelo ao eixo z, enquanto que o campo B_1 alinha-se ao eixo x. A energia transferida do campo B_1 para os núcleos, faz com que ocorra a magnetização nos núcleos no plano x-y. Ao cessar o pulso de radiofrequência, os núcleos perdem gradativamente a energia absorvida pelo pulso de radiofrequência, retornando ao seu alinhamento com o campo B_0 , processo este chamado de relaxação. A energia liberada no processo de relaxação é detectada e registrada em um diagrama de decaimento da energia livre (FID, do inglês, *Free Induction Decay*) em função do tempo, que através de uma operação matemática, conhecida como Transformada de Fourier, é convertido em um espectro de intensidade em função da frequência. (CLARIDGE, 2009; PAVIA et al., 2012; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

3.7.2 Deslocamento Químico

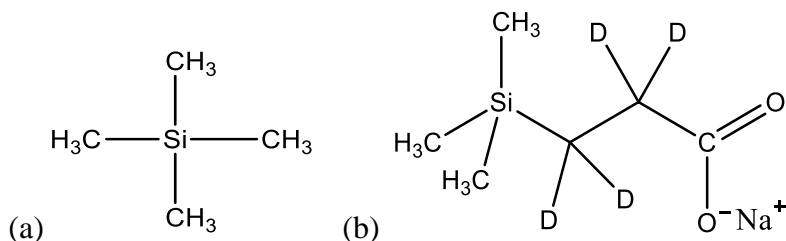
O espectro de RMN deveria apresentar um único sinal, no entanto, não é isso o que ocorre, fato este decorrente da presença dos elétrons, que geram um campo magnético adicional ao campo B_0 , fazendo com que os núcleos quando em ressonância com a frequência do campo B_0 , sofram influência deste campo, resultando em diferentes posições dos sinais ao longo do espectro de RMN (BECKER, 2000; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

O descolamento químico do pico no espectro de RMN é diretamente proporcional ao efeito que o núcleo sente da ação do campo magnético gerado pelos elétrons, efeito este denominado de blindagem do núcleo. Quanto mais intenso é o efeito da ação do campo magnético gerado pelos elétrons, mais blindados estarão os núcleos, levando ao aparecimento de sinais mais próximos de 0 (zero) no espectro gerado, enquanto que, quanto menos intenso é o efeito do campo magnético gerado pelos elétrons, menos blindados estarão estes núcleos,

fazendo com que os sinais produzidos aparecerão com deslocamento químico mais alto no espectro de RMN (BECKER, 2000; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Os compostos TMS e TSP, Figura 9, são utilizados como compostos de referência pelo fato de possuírem seus prótons bastante blindados, tendo sido a eles atribuídos, por convenção, como deslocamento químico, valor igual a 0 (zero) ppm. No entanto, o TSP é utilizado como composto de referência de deslocamento químico quando o solvente utilizado é a água e o DMSO, e o TMS para os demais solventes menos polares.

Figura 9. (a) Tetrametil-silano (TMS) e (b) Trimetilsilil propionato de sódio (TSP)



Fonte: (a) Próprio autor

3.7.3 Integração

Uma das vantagens da técnica de RMN-¹H, é que a área abaixo de cada pico é proporcional a quantidade de núcleos de hidrogênio responsáveis pelo aparecimento do pico (PAVIA *et al.*, 2012). No entanto, a quantidade determinada é relativa e não absoluta.

3.7.4 Acoplamento

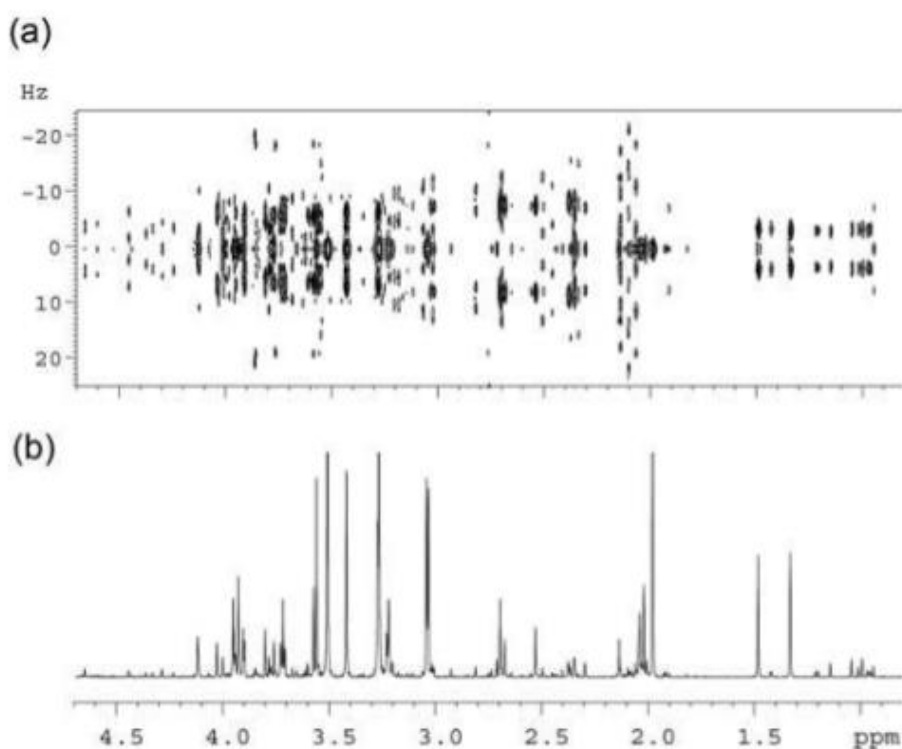
Ao se analisar um espectro de RMN, pode-se observar que os sinais originados das absorções nem sempre se apresentam como picos únicos ou singletos, podendo aparecer desdobrados como dupletos, tripletos, quartetos etc., devido a interações denominadas acoplamento spin-spin (NASCIMENTO, JR., 2001).

O acoplamento spin-spin é resultado da influência que o campo magnético gerado por um núcleo exerce sobre um outro núcleo, fazendo com que o pico se desdobre proporcionalmente ao número de núcleos vizinhos, seguindo a regra $2In+1$, sendo “I” o spin do núcleo e n o número de núcleos vizinhos (BECKER, 2000).

3.7.5 J-Resolvido

Um dos grandes problemas de se trabalhar com amostras de RMN- ^1H complexas é a sobreposição dos sinais, dificultando a observação da multiplicidade dos picos. Para se resolver este problema utiliza-se do experimento de RMN 2D J-resolvido ^1H . O experimento J-resolvido é um experimento que tem em uma das dimensões o deslocamento químico, e na outra dimensão o desdobramento dos sinais (Figura 10), permitindo assim, não só confirmar a multiplicidade do sinal, mas medir com maior precisão sua constante de acoplamento (HUANG, *et al.*, 2015; LUDWING, 2010).

Figura 10. a) Espectro de RMN 2D J-resolvido ^1H , em b) do composto que possui seu espectro de RMN- ^1H



Fonte: LUDWING, 2010

4. METODOLOGIA

Este trabalho utilizou o fungo *Lasiodiplodia theobromae*, isolado como endofítico de sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida como aroeira, e identificado por métodos moleculares.

4.1 ESTERILIZAÇÃO

Todo material utilizado para o cultivo do fungo foi previamente esterilizado em autoclave a 121 °C e 1,03 KgF/cm², por 20 minutos.

4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 MEIO BATATA-DEXTROSE-ÁGAR (BDA)

Para cada 1L de meio de cultura foram utilizados 200 g de batata inglesa previamente descascadas. As batatas foram cozidas por 30 minutos em 500 mL de água destilada, filtrou-se a mistura, ainda quente, com papel de filtro. Ao filtrado, foram adicionados 20 g de dextrose (VETEC, QUÍMICA FINA), 20 g de ágar (VETEC, QUÍMICA FINA) e o volume final foi ajustado para 1L com água destilada. Após dissolver completamente a mistura, o meio de cultivo foi esterilizado por 15 minutos a 1,03 KgF/cm² e 121°C.

4.2.2 MEIO BATATA-DEXTROSE (BD)

Para o meio BD, foi utilizado o mesmo procedimento para o meio BDA, só não foi adicionado o ágar. O meio de cultivo (100mL) foi distribuído em frascos do tipo Erlenmeyer e esterilizado por 15 minutos a 1,03 KgF/cm² e 121°C.

4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Em trabalhos anteriores, o microrganismo endofítico *L. theobromae* foi isolado de sementes de *S. terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae), comumente conhecida como pimenta brasileira ou aroeira-da-praia. Os frutos recém-colhidos foram superficialmente esterilizados, cortados em pequenos fragmentos, depositados em placas de Petri contendo batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidos em temperatura ambiente e fotoperíodo de 12h até o crescimento de

fungos. As pontas hifais originárias de fragmentos de frutos foram transferidas para novo meio BDA e mantidas à temperatura ambiente nas condições descritas acima por 30 dias. A espécie fúngica foi identificada pela genética molecular e a ausência de corpos de frutificação foi confirmada pelo exame morfológicos de culturas sob o microscópio óptico.

A cultura de fungos foi preparada adicionando 30 mL de água ultrapura esterilizada a uma colônia de *L. theobromae* com 7 dias de cultivo e transferindo alíquotas de 50 µL da suspensão de pedaços de hifal para 64 tubos de vidro, cada um contendo 100 mL de meio de batata-dextrose (BD). A cultura foi incubada à temperatura ambiente em um agitador orbital a 160 rpm. Os tubos foram divididos em dois grupos iguais (n = 32), sendo um grupo mantido em condições de escuro e o outro submetido a um fotoperíodo de 12 horas de luz natural. As biomassas de oito repetições de cada tratamento (fotoperíodo de 12h e escuro) foram colhidas por filtração ao final da primeira, segunda, terceira e quarta semana de crescimento, correspondendo a diferentes estágios de desenvolvimento micelial. As massas miceliais correspondentes foram lavadas com água ultrapura esterilizada, congeladas em nitrogênio líquido, pulverizadas em almofariz e pistilo de cerâmica, liofilizadas, pesadas e armazenadas a -80 °C até serem necessárias para análise. A biomassa seca total de micélios produzida a cada semana, e sob diferentes condições de cultura, foi calculada a partir das massas médias determinadas em oito tubos replicados.

4.4 TAMPÃO FOSTATO

Em um balão volumétrico de 100 mL adicionou-se 0,31 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 1,09 g de Na_2HPO_4 (anidro), 0,1 mM (0,0172 g) de TSP (3-(trimetilsilil)propionato de sódio; Cambridge Isotope Laboratories)) e 10 mL de D_2O (99% purity; Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA), o volume foi completado com água ultrapura. O pH da solução adquirida foi de 6,0. O tampão foi conservado a 4 °C.

4.5 EXTRAÇÕES

Os metabólitos intracelulares presentes nos micélios liofilizados foram extraídos adicionando 800 µl de solução salina tamponada com fosfato a 20 mg de biomassa fúngica e sonicação por 20 min. Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 14000 rpm (Hettich zentrifugen, ROTANTA 460R) por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi

transferido para um novo tubo, submetido a centrifugação adicional nas condições descrito acima e uma alíquota do extrato final transferida para um tubo de 5 mm RMN.

4.6 METABOLÔMICA

Para análise das células, utilizou-se de 550 μ L das amostras.

Para identificar inequivocamente os metabólitos intracelulares produzidos pelos micélios durante o período de quatro semanas em cada condição de cultura, foram preparadas amostras de controle qualitativo (CQ), compreendendo alíquotas de 20 μ L de cada um dos 32 extratos metabólitos obtidos de culturas crescidas em condições de escuras ou alíquotas de 20 μ L de cada um dos 32 extratos obtidos de culturas mantidas sob fotoperíodo.

4.6.1 Experimentos de RMN

Todos os experimentos de RMN foram realizado em espectrômetro Bruker (Billerica, MA, USA) dotado de magneto supercondutor, operando para H^1 a 400 MHz, equipado com sonda de banda-larga de 5 mm PABBO a 300K. Todos os espectros de RMN- 1H unidimensionais foram realizados utilizando-se da sequência de pulsos *noesypr1d* para supressão do sinal de ressonância da água por pré-saturação.

Para todos os experimentos foram utilizados os seguintes parâmetros

NS: 128 (número de experimentos)

D1: 4,00 s (tempo de relaxação)

TD: 64K (número de pontos do espectro)

SW: 16,0143 ppm (largura da janela)

O1P: 4,69 ppm (posição onde aparece o sinal referente a água e, portanto, é irradiada)

AQ: 5,11 s (tempo de aquisição)

Para identificação e confirmação de todos os metabólitos na amostra CQ, foram utilizados além do experimento unidimensional RMN- 1H (neste caso com NS = 256) o experimento bidimensional J-resolvido

4.6.2 Análise

Os dados brutos gerados foram processados com o emprego do software TopSpin[®] 3.5, onde sofreram a transformada de Fourier para converter o FID (espectro de decaimento da energia em função do tempo) em um espectro de intensidade em função da frequência, também realizou-se a correção de fase e linha de base, por fim o deslocamento químico dos sinais foram corrigidos com referência no sinal do TSP (0.00 ppm). Para identificação dos metabólitos, foram utilizados o software Chenomx[®], o banco de dados disponível na plataforma on-line HMDB (www.hmdb.ca), e dados da literatura.

4.7 4.6.3 Análise estatística e quimiometria

As massas secas (g) dos micélios colhidos em cada estágio de crescimento foram expressas como valores médios \pm desvio padrão ($n = 8$) e comparadas usando teste de Tukey com o nível de significância estatística estabelecido em 5%. Os dados de RMN-¹H foram pré-processados usando o software Bruker AMIX[™] versão 2018, pelo qual os espectros foram alinhados, normalizados e a região correspondente a D₂O e do TSP removidas. Uma matriz de dados compreendendo 49 observações e 24971 variáveis cada, foi gerada e exportada na forma de um arquivo de texto para o software SIMCA[™] versão 14 (Umetrics, Umeå, Suécia) e da plataforma on-line MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Os dados foram submetidos à escala de Pareto para minimizar os efeitos indesejáveis do ruído e submetidos à análise multivariada.

A análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA; método de ligação de Ward) foram realizadas com o objetivo de classificar as amostras de acordo com o estágio de desenvolvimento da cultura. Análise ortogonal de mínimos quadrados parciais - discriminantes (OPLS-DA) foi realizada para examinar os efeitos diferenciais da luz e escuro no perfil metabolômico de *L. theobromae*. Um resumo das principais vias metabólicas operativas em *L. theobromae* foi construído com o auxílio dos mapas de vias da Enciclopédia de Quioto de Genes e Genomas (KEGG) de Kyoto (<https://www.genome.jp/kegg/>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O microrganismo utilizado na pesquisa corresponde ao *Lasiodiplodia theobromae*, identificado molecularmente (Apêndice A e B).

5.1 INFLUÊNCIA DA LUZ NA BIOMASSA E NA PRODUÇÃO DO PIGMENTO.

Devido à baixa quantidade de células adicionada, considerou-se inicialmente a biomassa micelial do fungo *L. theobromae* sendo zero. As quantidades de micélios secos produzidos semanalmente por culturas de *L. theobromae* crescidas no escuro foram significativamente menores ($p < 0,001$), durante o período de quatro semanas, quando comparadas às culturas de fungos incubadas no fotoperíodo (Tabela 2). O surgimento de uma coloração rosa claro foi observado em culturas com uma semana de idade mantidas sob o fotoperíodo, enquanto as cultivadas em condições escuras eram essencialmente incolores (Fig. 11a). A produção de pigmentos extracelulares por culturas de quatro semanas foi confirmada pela coloração cinza para preto e vermelho exibida pelos micélios e meios de cultura, respectivamente, independentemente do regime claro/escuro aplicado, mas a mudança de cor foi mais intensa nas culturas cultivadas sob o fotoperíodo em comparação com os mantidos no escuro (Fig. 11b).

Não é algo recente a publicação de trabalhos que mostra a influência da luz no crescimento de fungos, YUSEF e ALLAN (1967) mostrou que o crescimento de certas espécies de fungo diminuía à medida que se aumentava a exposição de luz, e que o contrário também ocorria com outras espécies, não é o trabalho mais antigo, pois os mesmos citam trabalhos da segunda metade da década de 20.

Recentemente, vários estudos têm sido feitos visando analisar a influência da luz em fungo, como por exemplo, BATITHA *et al.* (2008), VELMURUGAN *et. al* (2010), FANELLI *et al.* (2012) e CHEONG (2016) que mostraram em seus trabalhos que luzes de diferentes comprimentos de onda, não só influenciam no crescimento micelial, como também na produção de pigmento, tanto inter- como extracelular e de metabólitos secundários.

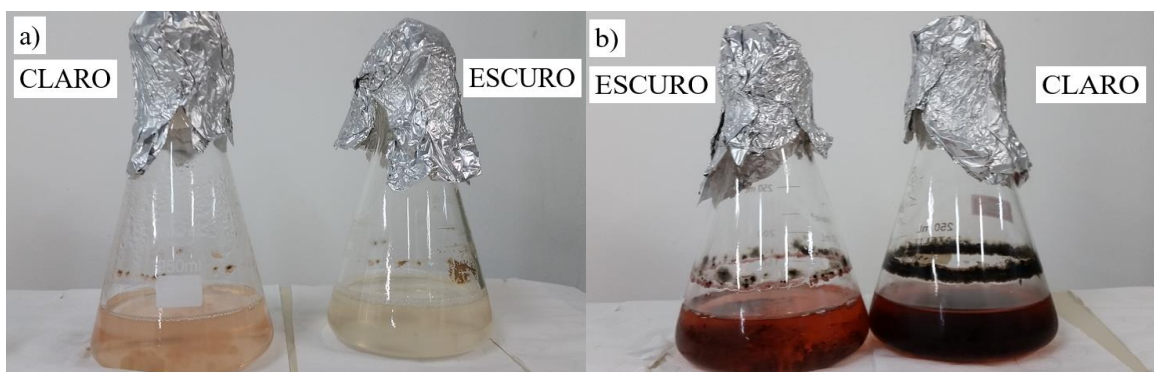
Tabela 2. Massas secas de *L. theobromae* micelial obtidas durante o ciclo de crescimento sob diferentes condições de cultivo.

Condição	Tempo	Biomassa seca (g)*
12h fotoperíodo	Semana 1	0,0882 ± 0,0214
	Semana 2	0,1951 ± 0,0101
	Semana 3	0,3284 ± 0,0106
	Semana 4	0,4143 ± 0,0229
0h	Semana 1	0,0433 ± 0,0164
	Semana 2	0,1218 ± 0,0121
	Semana 3	0,2178 ± 0,0167
	Semana 4	0,3406 ± 0,0299

* Média dos valores ± desvio padrão ($n = 8$)

Fonte: Próprio Autor.

Figura 11. a) Cultura com 1 semana; b) Cultura com 4 semanas.



Fonte: Próprio Autor

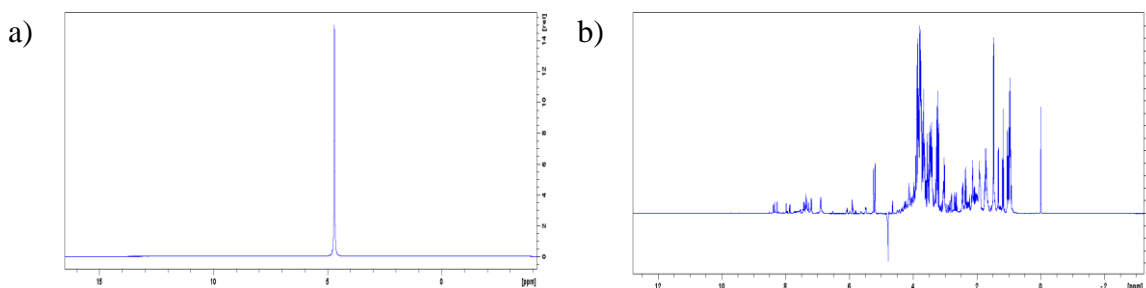
SHUMACHER (2017) comenta que os fungos ao longo de sua evolução se adaptaram aos seus nichos ecológicos, sendo a produção de pigmento uma forma de proteção à radiação a qual o fungo está sendo submetida. Em fungos, os carotenoides e outros pigmentos são acumulados em estruturas lipídicas e são formados pela via do ácido mevalônico (MVA) (MURPHY e VANCE, 1999). A não acumulação do pigmento dentro da célula do fungo *L. theobromae* deve-se a não presença dessas estruturas lipídicas, onde sua ausência pode ser justificada pelo acúmulo de fosfocolina na célula.

Os vários tipos de melanina produzidos por fungos são gerados por polimerização oxidativa de intermediários fenólicos ou indólicos e podem se acumular nas paredes celulares ou ser liberados no ambiente extracelular. No filo Ascomycota, a melanina é tipicamente sintetizada pela via do pentacetídeo, na qual o precursor imediato, 1,8-di-hidroxi-naftaleno (DHN), é polimerizado em DHN-melanina por uma lacase. No entanto, algumas espécies de fungos produzem melanina a partir da tirosina, que é convertida em L-di-hidroxi-fenilalina (DOPA) pela ação da tirosina 3-mono-oxigenase e subsequentemente oxidada em dopaquinona. Esse intermediário sofre várias reações de oxidação, hidroxilação e descarboxilação para produzir di-hidroxi-indóis, que sofrem polimerização espontânea para formar DOPA-melanina (POMBEIRO-SPONCHIADO et al. 2017).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS

A grande quantidade de água presente nas amostras, dificulta a visualização dos sinais no espectro de RMN-¹H, por causa disto fez-se uso da técnica de RMN-¹H com supressão do sinal de ressonância da água (*noesypr1d*), para poder visualizar os metabólitos presentes nos espectros das amostras (Figura 12).

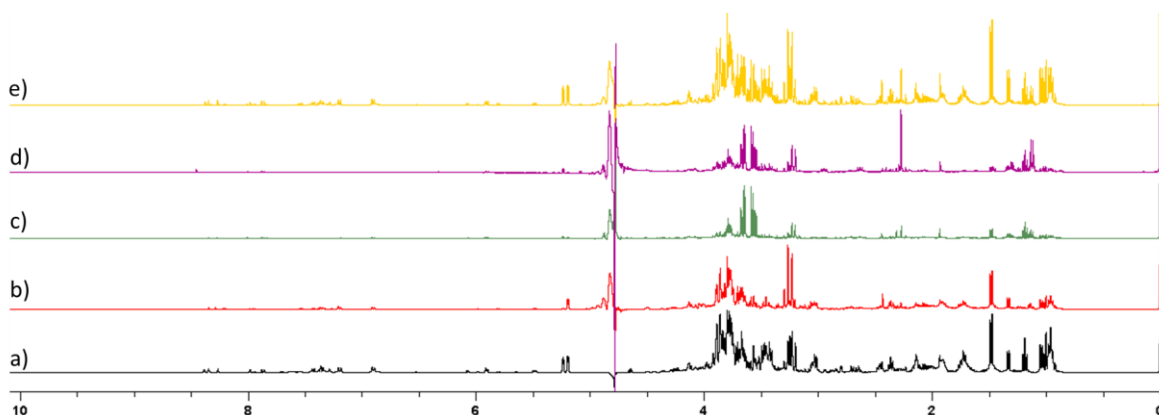
Figura 12. a) Espectro de RMN-¹H sem supressão do sinal ressonância da água; b) Espectro de RMN-¹H com supressão do sinal ressonância da água.



Fonte: Próprio Autor

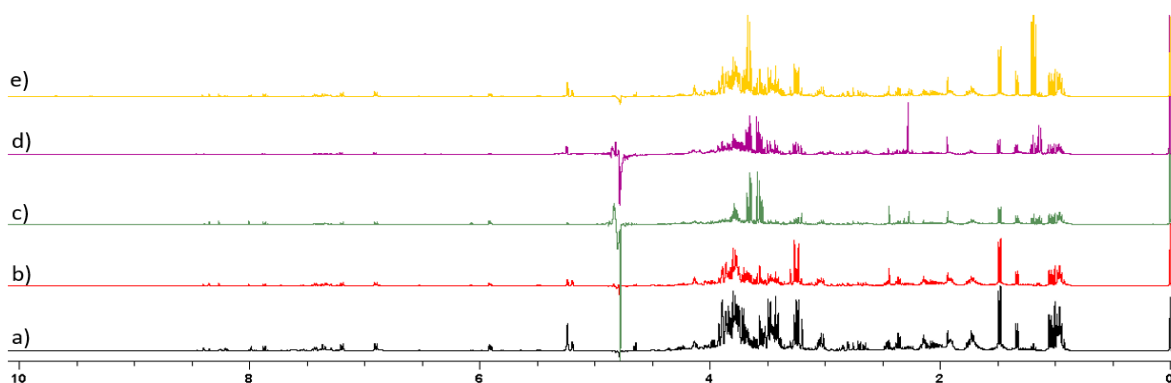
Devido ao número de amostras presente no estudo, 32 para cada condição de cultivo, optou-se pela produção de uma amostra, constituída de uma pequena alíquota de cada amostra, para cada condição de cultivo, produzindo duas amostras denominadas *Controle Qualitativo* (CQ), contendo todos os metabólitos presente em todas as amostras, como pode ser visualizado nas figuras 13 e 14.

Figura 13. Espectro de RMN-¹H, para cultura com 12h de fotoperíodo, sendo: a) 1^a semana, b) 2^a semana, c) 3^a semana, d) 4^a semana e e) CQ



Fonte: Próprio Autor

Figura 14. Espectro de RMN-¹H, para cultura com 0h de fotoperíodo, sendo: a) 1^a semana, b) 2^a semana, c) 3^a semana, d) 4^a semana e e) CQ



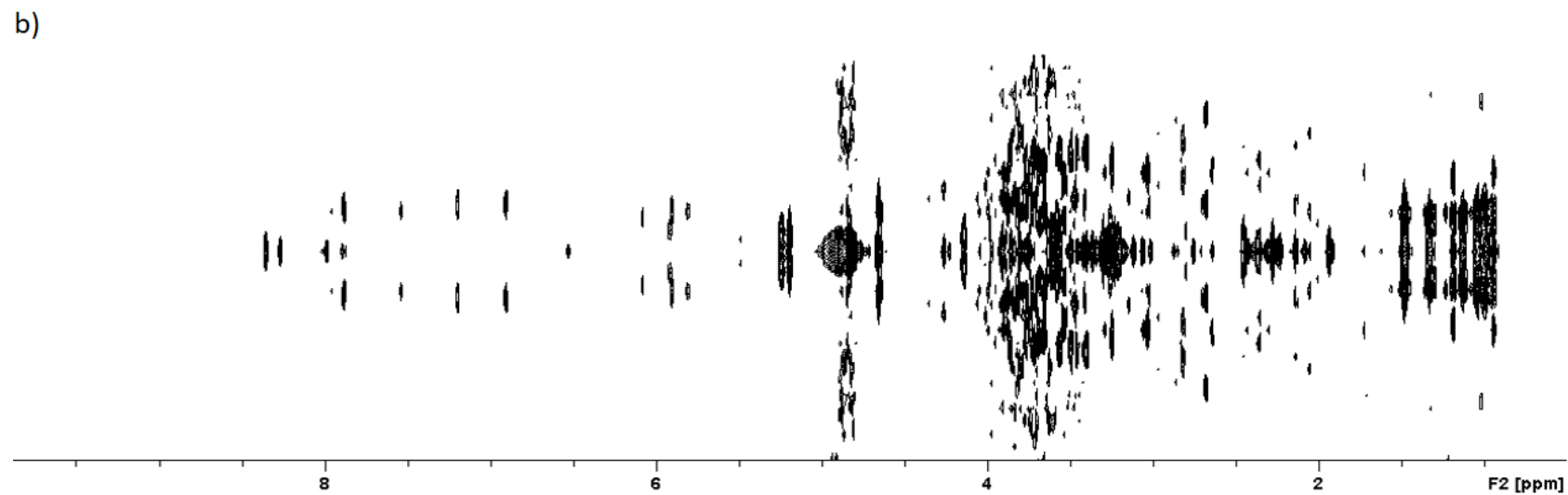
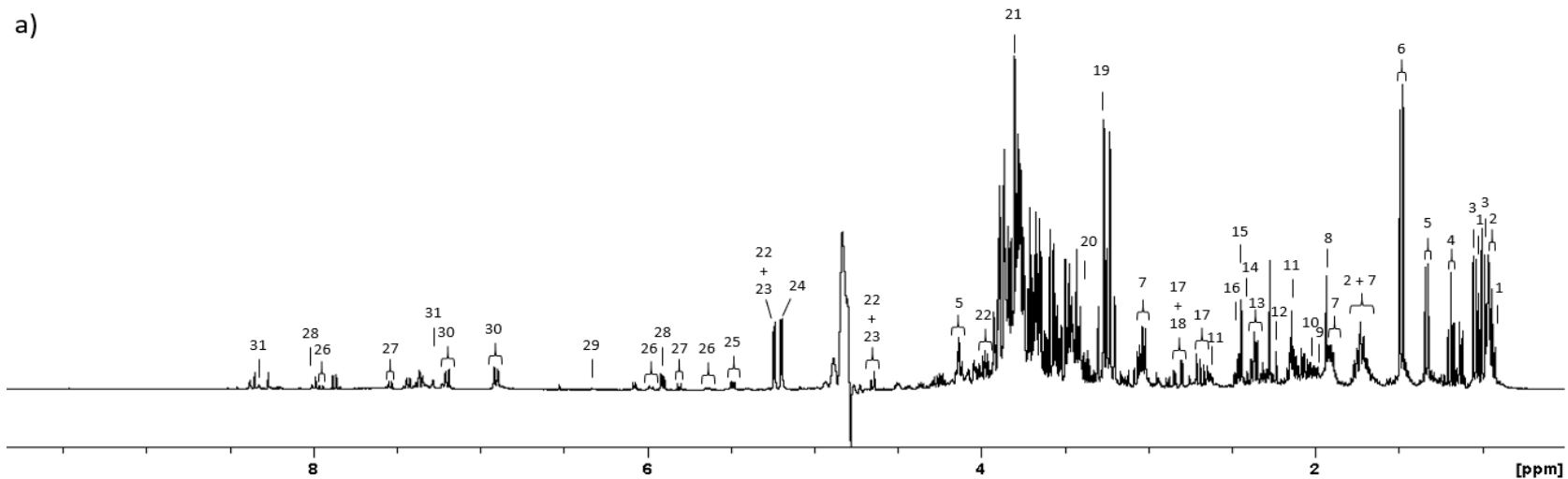
Fonte: Próprio Autor

Fazendo-se uso do software Chenomix[®], da plataforma online HMDB, e da literatura (ALIFERIS, 2010; BHARTI *et al.* 2012; CHENG, 2013, ZĄBEK, 2017), foi possível identificar os metabólitos presentes nos espectros de RMN-¹H das amostras do CQ (Fig. 15a para a cultura com fotoperíodo de 12h e Fig. 16a para a cultura sem iluminação). Para confirmação dos metabólitos, utilizou-se o espectro de RMN J-resolvido, possibilitando a visualização do desdobramento dos picos, permitindo desta forma confirmar se o referido pico tinha a multiplicidade característica para aquele composto sugerido (Fig. 15b para a cultura com fotoperíodo de 12h e Fig. 16b para a cultura sem iluminação). A tabela 3 lista os metabólitos identificados, em comum aos dois grupos, de acordo sua posição no espectro de

RMN-¹H, com seus referidos deslocamentos químicos e com suas constantes de acoplamento medidas pelo espectro de RMN J-resolvido. As estruturas dos metabólitos identificados encontram-se no apêndice.

A análise dos espectros QC, revelou que independente da condição de cultivo não houve diferença qualitativa entre as duas condições, durante o período de 4 semanas, porém houve diferenças nas intensidades dos picos, indicando diferença quantitativa na concentração dos metabólitos. Com base nos espectros semanais foi aplicado a análise estatística multivariada.

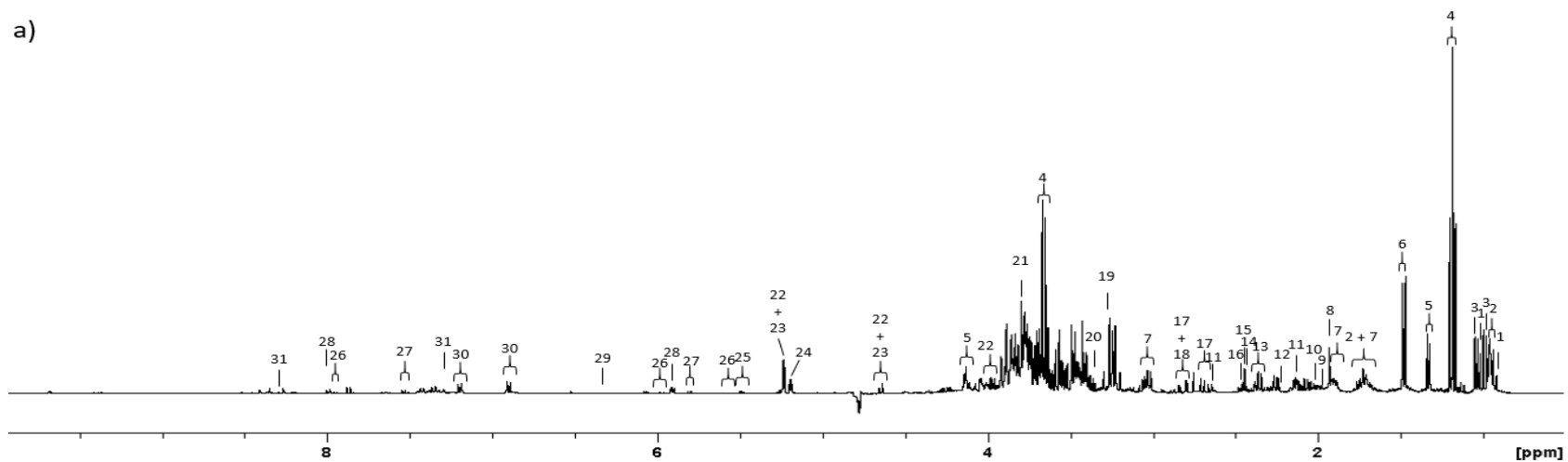
Figura 15. (a) Espectro de RMN-1H da amostra CQ com 12 h de luz, (b) Espectro de J-Resolvido da amostra CQ com 12 h de luz.



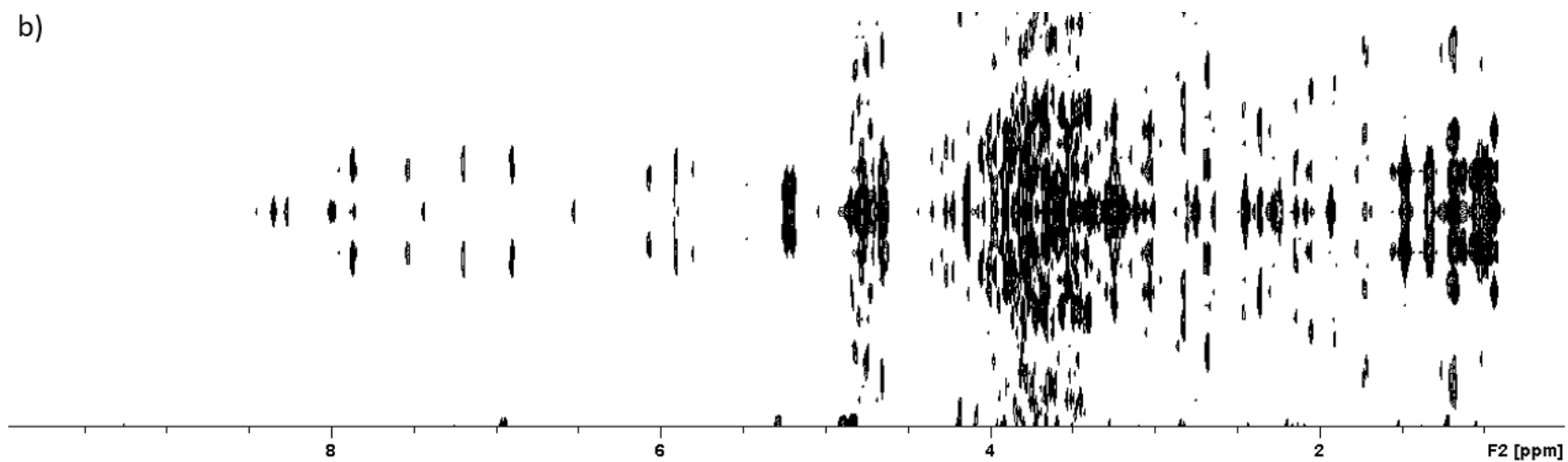
Fonte: Próprio Autor

Figura 16. (a) Espectro de RMN-1H da amostra CQ com 0 h de luz, (b) Espectro de J-Resolvido da amostra CQ com 0 h de luz.

a)



b)



Fonte: Próprio Autor

Tabela 3. Valores de deslocamento químico, multiplicidade e constante de acoplamento dos metabólitos identificados, para as duas condições de cultivo.

Número	Metabólito	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
1	Isoleucina	0.940	t	7.452
		1.011	d	7.452
		0.991	d	4.493
2	Leucina	1.011	d	4.493
		1.729	m	---
3	Valina	0.991	d	7.049
		1.043	d	7.049
4	Etanol	1.187	t	7.051
5	Lactato	1.332	d	6.652
		4.133	q	?
6	Alanina	1.482	d	7.273
		1.729	quinteto	7.501; 7.750
7	Lisina	1.913	m	---
		3.033	t	7.501
8	Acetato	1.933	s	---
9	N6-Acetilisina	1.985	s	---
10	N-Acetilornitina	2.046	s	---
11	Metionina	2.141	s	---
		2.647	t	7.437
12	Acetona	2.235	s	---
13	Glutamato	2.313	m	---
14	Succinato	2.425	s	---
15	Piruvato	2.441	s	---
16	Glutamina	2.470	m	---
		2.677	dd	8.787; 17.574
17	Aspartato	2.822	dd	3.845; 17.574
		2.831	s	---
18	Metilguanidina	2.831	s	---
19	Betaina	3.265	s	---

20	Metanol	3.365	s	---
21	Guanidoacetato	3.799	s	---
		3.975	m	---
22	Glicose-6-fosfato	4.649	d	7.280
		5.238	d	3.748
23	Glicose	4.649	d	7.280
		5.238	d	3.748
24	Trealose	5.196	d	3.796
25	Glicose-1-fosfato	5.486	dd	3.490; 7.099
		5.640	dd	?
26	UDP-glicose	5.985	m	---
		7.951	d	8.040
27	Uracila	5.808	d	7.753
		7.538	d	7.655
28	Guanosina	5.902	d	5.134
		8.006	s	---
29	Fumarato	6.332	s	---
30	Tirosina	6.903	dt	2.140; 2.851; 8.560
		7.187	dt	2.046; 3.108; 8.560
31	Histidina	7.283	s	---
		8.324	s	---

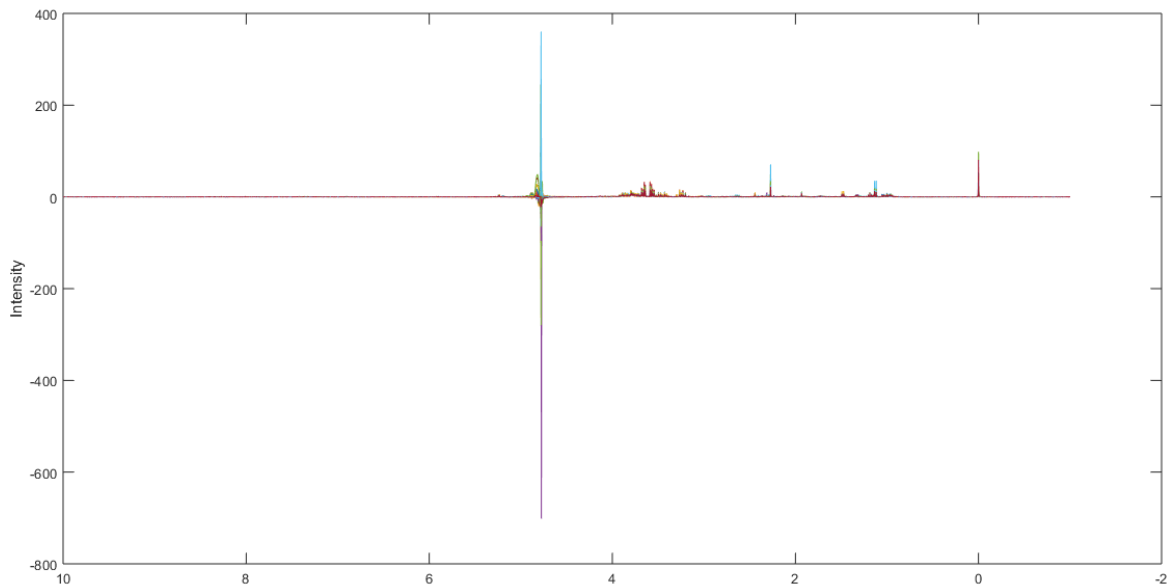
Fonte: Próprio Autor.

5.3 ANÁLISE MULTIVARIADA

A preparação da matriz de dados (amostras x variáveis) para as análise multivariada constou de 49 espectros de RMN-¹H (27 para o grupo que recebeu 12h de luminosidade e 22 para o grupo que não recebeu luminosidade), os quais foram sobrepostos (Fig. 17) gerando um total de 32697 variáveis, onde cada variável, corresponde a 0.0003364 ppm de cada espectro. Após a sobreposição dos espectros realizou-se o alinhamento e os cortes de regiões dos espectros como do sinal residual da supressão da água, do TSP e de regiões que não continham sinais (Fig. 18), resultando em uma

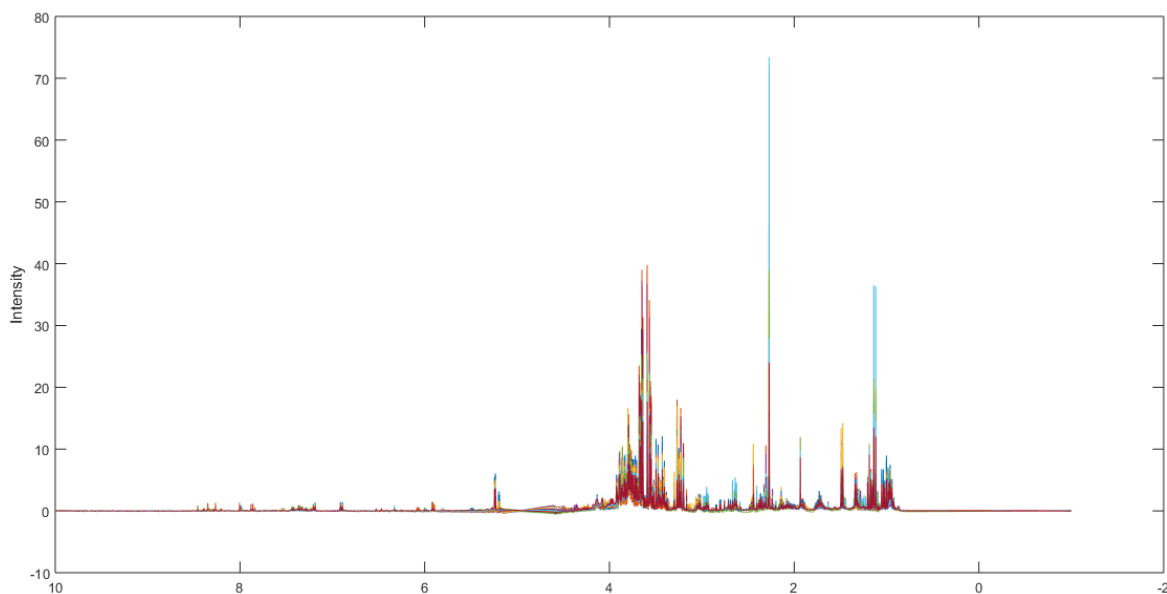
matriz de dados com 24971 variáveis, para cada um dos 49 espectros. Por fim os dados foram normalizados, corrigindo erros sistemáticos.

Figura 17. Sobreposição de 49 espectros de RMN-1H



Fonte: Próprio Autor.

Figura 18. Sobreposição de 49 espectros de RMN-1H, alinhados, cortados e normalizados.



Fonte: Próprio Autor

5.3.1 PCA e HCA

Antes da análise multivariada, as variáveis foram dimensionadas de acordo com o método de Pareto para reduzir a importância de valores altos e preservar parcialmente a estrutura dos dados (WORLEY E POWERS 2013). A análise por PCA aumentou a interpretabilidade do grande número de variáveis registradas, reduzindo a dimensionalidade do conjunto de dados com perda mínima de informações. Os seis primeiros componentes principais (PC1 a PC6) foram calculados com base na variação dos metabólitos fúngicos intracelulares ao longo de quatro semanas de cultura (Fig. 19). O modelo apresentou coeficientes de variação observada ($R^2 = 0,78$) e variação prevista ($Q^2 = 0,66$) que estavam dentro dos limites ($R^2 \geq 0,7$ e $Q^2 \geq 0,4$) considerados aceitáveis para a qualidade de tendência em sistemas biológicos (JIMÉNEZ-CONTRERAS et al. 2009).

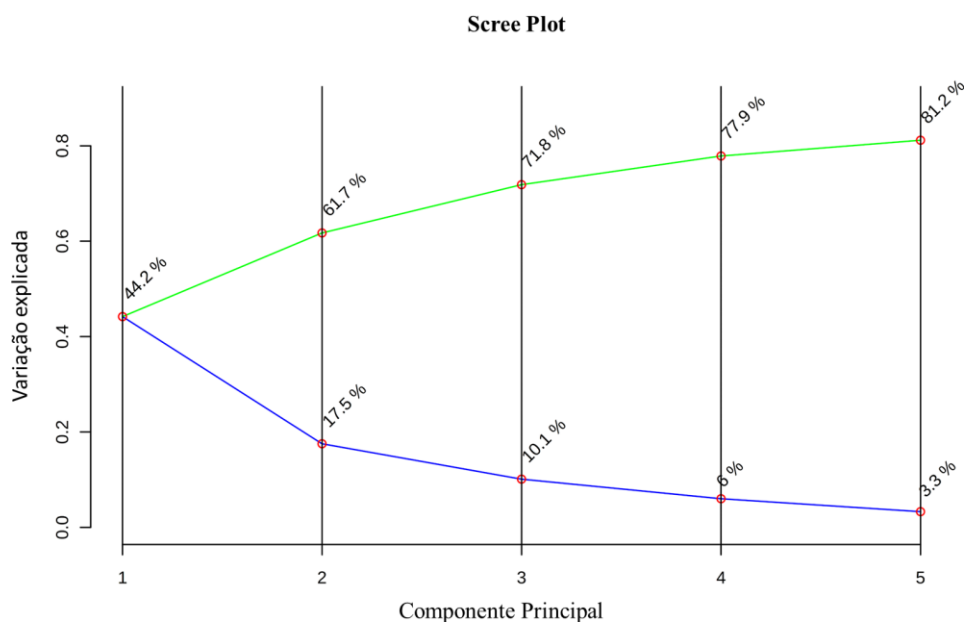
Os PC1 e PC2 representaram 44,2 e 17,5%, respectivamente, da variabilidade do conjunto de dados e juntos representaram 61,7% da variabilidade total. O gráfico bidimensional de pontuação PC1 vs. PC2 (Fig. 20a) revelou que os pontos de dados relativos aos micélios coletados no mesmo estágio de desenvolvimento se agrupavam em quadrantes distintos, independentemente do regime claro / escuro aplicado. Os pontos agrupados indicam que os metabolomas das amostras foram semelhantes, enquanto os pontos dispersos implicam diferenças nos metabolomas. No gráfico de cargas PC1 vs. PC2 (Fig. 20b), os pontos de dados foram separados de acordo com a ponderação das variáveis (metabólitos). Variáveis correlacionadas positivamente têm aproximadamente o mesmo valor de ponderação e, portanto, aparecem próximas umas das outras, enquanto variáveis correlacionadas negativamente aparecem diagonalmente opostas uma à outra. O dendrograma HCA produzido pelo método Ward (Fig. 20c) complementou os resultados obtidos pela PCA e confirmou a formação de quatro grupos de amostras, mas dividiu esses grupos em dois subgrupos, mostrando que as culturas crescidas sob o fotoperíodo diferiam em seu metabolismo daquelas mantidas no escuro.

Para melhor visualizar a variação dos metabólitos ao longo das semanas, construiu-se o mapa de calor (Fig. 21), onde é possível detectar a presença de 6 grupos de metabólitos, que se dividem entre metabólitos de vias catabólicas (Fig. 21 d-f) e vias anabólicas (Fig. 21 a-c).

O aumento da quantidade da glicose observado da terceira para quarta semana (Fig. 21d e Fig. 24m) está relacionada ao consumo de trealose e glicogênio que são as principais reservas de carboidratos nos fungos, onde o glicogênio é um polissacarídeo ramificado de alta massa molecular de cadeias lineares formada a partir de unidades de glicose unidas por ligações $\alpha(1,4)$ -glicosídica

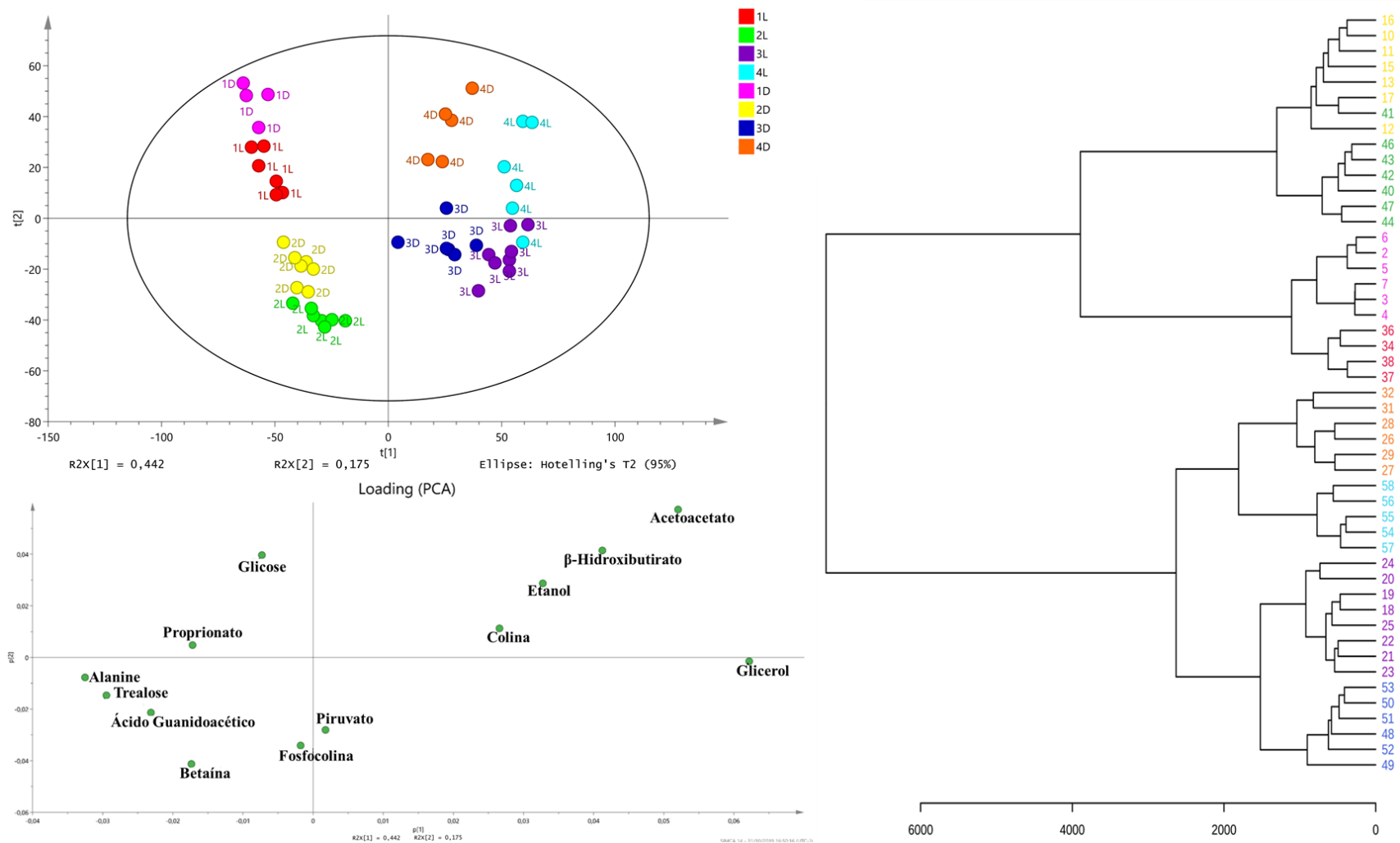
com ligações $\alpha(1,6)$ entre as ramificações, que se formam a cada 6 a 8 resíduos de glicose, já a trealose é um dissacarídeo não redutor composto por duas moléculas de glicose com ligação $\alpha(1,1)$, essas duas moléculas são vistas como mais ou menos intercambiáveis, ou seja, uma pode ser convertida na outra (Fig 22). Em geral, o glicogênio é sintetizado durante períodos de crescimento ativo, especialmente quando há uma alta relação C/N e é decomposto durante a fase estacionária ou durante a produção de estruturas reprodutivas. A trealose e o glicogênio provavelmente também pertencem à resposta metabólica precoce, pois quando as células em seu estágio de desenvolvimento são sujeitas a algum tipo de estresse, como a altas temperaturas, cloreto de sódio, peróxido de hidrogênio, sulfato de cobre, alta concentração de etanol (7%) ou ácidos orgânicos fracos (sorbato, benzoato), as células desenvolvem respostas genéticas e metabólicas que eventualmente levam à aquisição de um estado de 'resistência ao estresse', entre várias respostas, a literatura descreve um rápido aumento de um ou de ambos os carboidratos (GROW; GADD, 1995; LOEWUS; TANNER, 1982; FRANÇOIS; PARROU, 2001).

Figura 19. Valor individual dos cinco primeiros componentes principais (azul), e o valor acumulado dos cinco primeiros componentes principais (verde).



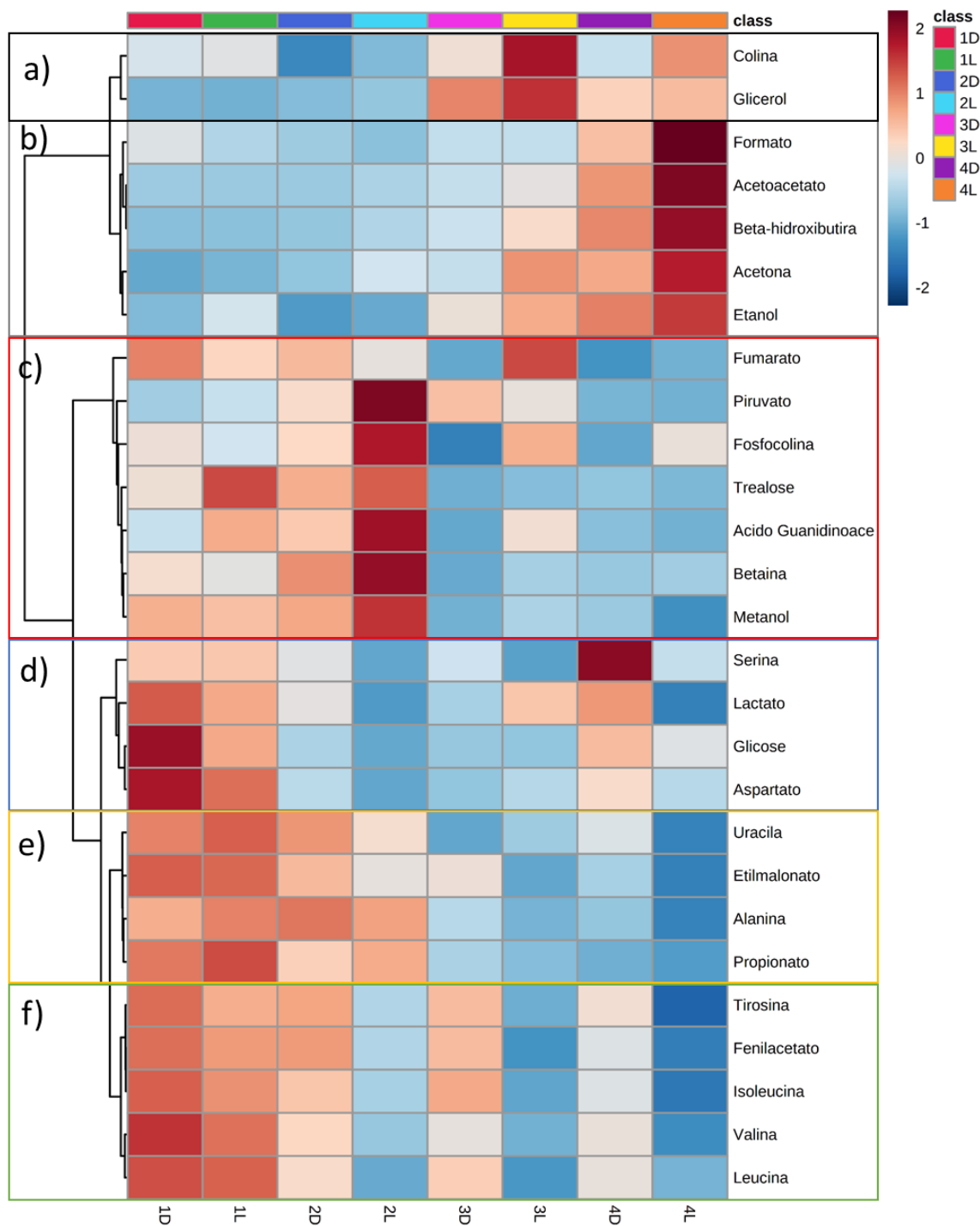
Fonte: Próprio Autor

Figura 20. a) Gráfico de scores das amostras obtido por PCA, relacionando as semanas e condição de crescimento do fungo (L = recebeu 12h de luz por dia, D = não foi exposto a luz). b) Gráfico do loadings para o PCA relacionando os pesos das duas primeiras PCs, c) Dendrograma obtido para as 4 PCs com o método de Ward de agrupamento.



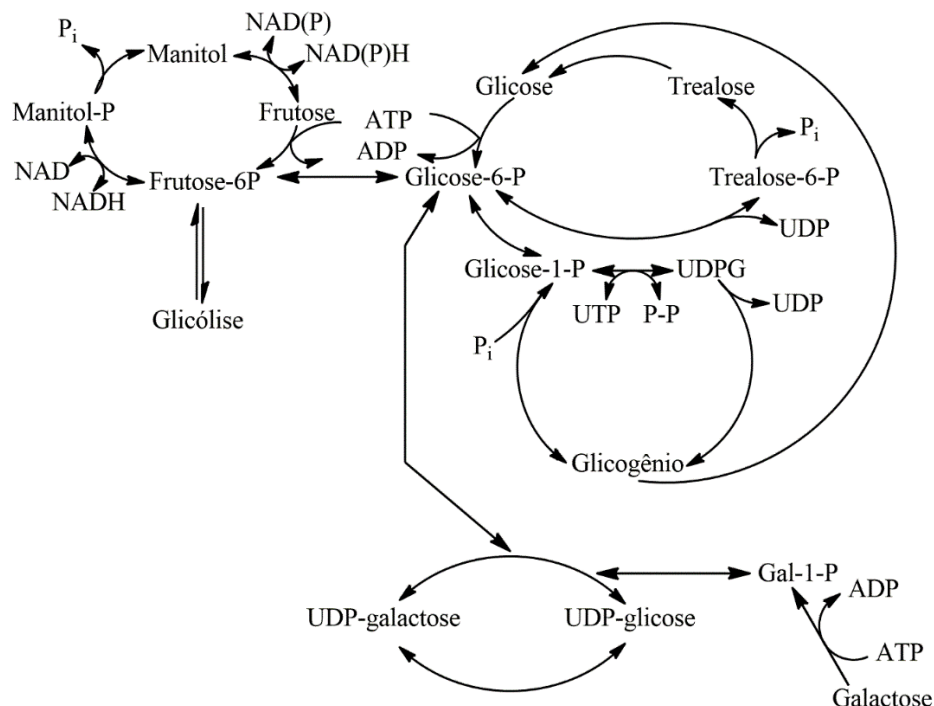
Fonte: Próprio Autor.

Figura 21. Dendrograma associado ao mapa de calor (heatmap) para os 27 metabólitos mais importante e sua variação temporal ao longo das 4 semanas. A cor está correlacionada positivamente com intensidade da variação dos metabólitos com vermelho indicando alta-intensidade e azul indicando baixa-intensidade.



Fonte: Próprio Autor

Figura 22. Rota metabólica da reserva de carboidrato em fungos.



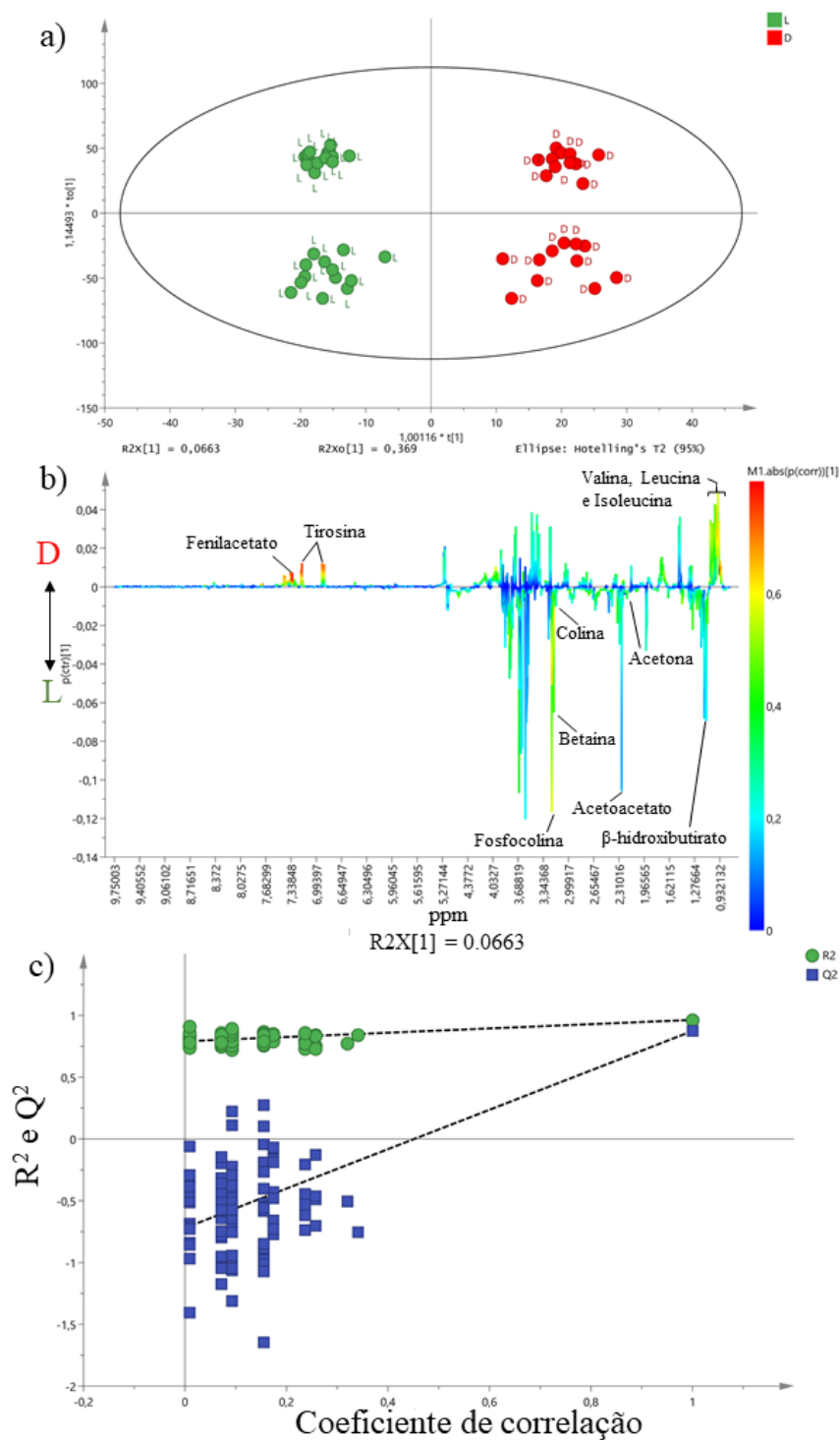
Fonte: Adaptado de GOW e GADD (1995)

5.3.2 OPLS-DA

Enquanto o PCA revelou a variação dos metabólitos entre os grupos de amostras, o modelo de análise supervisionado do OPLS-DA capturou a variação dentro dos grupos e separou as variáveis (metabólitos) que foram significativamente e positivamente associadas à luz ou à escuridão, conforme mostrado no gráfico de escores (Fig. 23a). De acordo com o gráfico S-line (Fig. 23b), os metabólitos intracelulares β -hidroxibutirato, acetoacetato, acetona, betaína, colina, glicerol e fosfocolina foram correlacionados positivamente com a luz, enquanto fenilacetato, leucina, isoleucina, valina e tirosina foram positivamente correlacionados com condições de escuro. O modelo OPLS-DA foi verificado pelo método de validação cruzada leave-one-out, que forneceu os valores $R^2 = 0,788$ e $Q^2 = 0,734$. No caso geral, a qualidade preditiva de um modelo é considerada aceitável quando $R^2 > Q^2$ e a diferença entre os dois coeficientes é menor que 0,3. Diferenças maiores entre R^2 e Q^2 indicariam que o modelo sofreu manipulação (HAWKINS et al. 2002; VEERASAMY et al. 2011), mas uma diferença $<0,06$ foi observada no presente estudo. Além disso, embora Q^2 tenha sido maior que 0,5, testes de permutação foram realizados usando o

software SIMCA para garantir que o valor Q2 do modelo fosse significativo, como mostrado pela permutação aleatória das linhas no conjunto de dados (Fig. 23)

Figura 23. a) Score do OPLS-DA, b) S-LINE do OPLS-DA.



Fonte: Próprio Autor.

Variações nos níveis dos principais metabólitos intracelulares durante o ciclo de crescimento (Fig. 24) forneceram muitas informações sobre os efeitos da luz no metaboloma de *L. theobromae*. Por exemplo, as concentrações dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) valina, leucina e isoleucina foram mais baixas em culturas expostas à luz em comparação com suas contrapartes mantidas em condições de escuro (Fig. 24a-c). Semelhante às plantas, os fungos são capazes de sintetizar BCAAs, mas neste estudo os BCAAs também estavam disponíveis no meio BDA (ROESSNER et al. 2000; GUEDES et al. 2011). A explicação para a diferença observada nos níveis de BCAAs é que a luz estimulou a oxidação completa dos BCAAs nas mitocôndrias com geração de grandes quantidades de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP) via fosforilação oxidativa, e com a liberação de corpos cetônicos (β -hidroxibutirato, acetoacetato, acetona). O primeiro passo na degradação do BCAA é a formação de 2-oxoácidos de cadeia ramificada, que sofrem descarboxilação oxidativa irreversível em acil-CoA e, finalmente, acetil-CoA, propionil-CoA, acetoacetil-CoA e acetoacetato (Binder 2010; Schertl et al. 2017). As concentrações dos corpos cetônicos, β -hidroxibutirato e acetoacetato (Figs. 24j e 24k) foram correlacionadas positivamente e aumentadas ao longo do período de crescimento, independentemente das condições da cultura, mas principalmente em culturas cultivadas sob condições de luz. Aparentemente, ambos os metabólitos ocorreram em proporções análogas, uma vez que o β -hidroxibutirato é formado pela redução do acetoacetato. A acetona é o produto de decomposição do acetoacetato, portanto sua concentração também aumentou durante o período de crescimento (Fig. 24l). O declínio nos níveis de BCAAs, juntamente com os da alanina (Fig. 24n), ocorreu concomitantemente com o aumento da glicose (Fig. 24m), indicando que a depleção dos estoques de glicose durante o crescimento acelerado induzido pela luz desencadeou a produção endógena de glicose (gliconeogênese).

A exposição a luz mostrou-se um estimulante à biossíntese de colina (Fig. 24g), que é um metabólito vital para a síntese de fosfocolina em eucariotos (Fig. 24i). Este último é um precursor e também um produto de degradação da fosfatidilcolina (lecitina), um componente principal dos fosfolipídios nas membranas eucarióticas. Além disso, a fosfocolina pode se ligar covalentemente a proteínas e glicolipídios em um amplo espectro de organismos, e essas macromoléculas modificadas desempenham funções importantes, incluindo defesa e virulência do patógeno (RICHTER et al. 2016). Portanto, a maior biomassa micelial produzida por culturas expostas à luz (Tabela 2) pode ser explicada em termos de intensificação da biossíntese de fosfolipídios e

montagem de bicamadas lipídicas nas células fúngicas. A colina também é o precursor da betaína (N, N, N-trimetilglicina; Fig. 24h), um aminoácido modificado com fortes propriedades osmoprotetoras que confere tolerância à salinidade, seca e outras tensões (LAMBOU et al. 2013).

A concentração de fosfocolina foi fortemente, mas negativamente correlacionada com os níveis de seus precursores de BCAA. A produção de fosfocolina atingiu o pico durante a segunda semana (especialmente em culturas crescidas em fotoperíodo), quando o crescimento atingiu sua fase exponencial e a síntese de membranas lipídicas foi máxima, mas diminuiu a partir da terceira semana. No entanto, as quantidades relativas de fosfocolina foram superiores às de todos os outros metabólitos durante todo o período de crescimento, provavelmente devido à degradação dos glicerofosfolípides, como evidenciado pela alta concentração de glicerol (Fig. 24f) nos micélios durante a terceira e quarta semana. De fato, a concentração de glicerol foi forte e positivamente correlacionada com a da fosfocolina.

Os níveis de fenilacetato foram muito mais baixos nas culturas cultivadas sob o fotoperíodo em comparação com as mantidas no escuro (Fig. 24d), principalmente porque os fungos podem empregar esse composto como fonte alternativa de carbono quando os estoques de glicose estão esgotados, situação que ocorre mais rapidamente sob condições de luz com a escalada do crescimento micelial. No entanto, quando a glicose é abundante, a degradação do fenilacetato é reduzida. A oxidação do fenilacetato em fungos geralmente ocorre via 2-hidroxifenilacetato e homogentisato e subsequente conversão em acetoacetato e fumarato. Uma via alternativa para oxidação do fenilacetato é mediada pela fenilacetio-CoA ligase, resultando na conversão em benzilpenicilina, um antibiótico usado por fungos como proteção contra bactérias (MIDDELHOVEN 1993, JAMI et al. 2018).

Embora a luz estimule o crescimento por meio da regulação positiva das vias oxidativas, ela compromete a sobrevivência dos fungos, induzindo a formação e o acúmulo de espécies de oxigênio altamente reativas, incluindo H_2O_2 e O^{2-} , que causam danos oxidativos às biomoléculas. Como proteção contra o estresse oxidativo induzido pela luz, alguns fungos produzem pigmentos como a melanina, que conferem às células uma coloração marrom escura. A radiação ultravioleta estimula a melanogênese desencadeando a degradação oxidativa da tirosina e a consequente polimerização de intermediários indólicos (CALVO et al. 2002; BELTRÁN-GARCÍA et al. 2014; THABET et al. 2014; ZAIDI et al. 2014). Independentemente de suas origens, os pigmentos de melanina têm características estruturais comuns que conferem a capacidade de eliminar os radicais

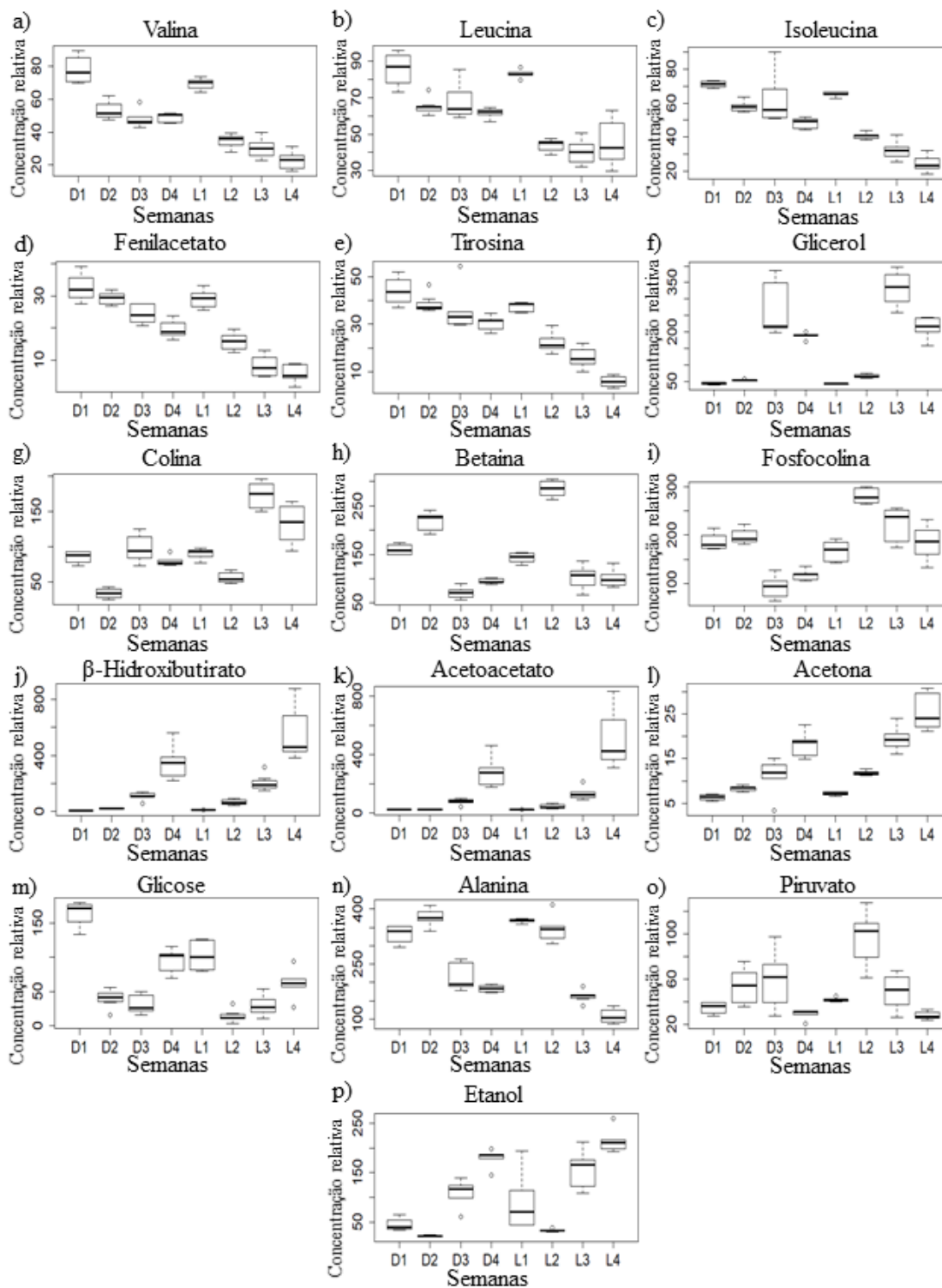
livres e fornecer funções antioxidantes e protetoras naturais sob condições adversas. Há também evidências sugerindo que a melanina é essencial para microrganismos zoopatogênicos e fitopatogênicos em virtude de suas propriedades antioxidantes (POMBEIRO-SPONCHIADO et al. 2017). O exposto acima fornece uma explicação dos níveis mais baixos de tirosina nos micélios cultivados na luz em comparação com os homólogos cultivados no escuro (Fig. 24e) e significa que esse aminoácido deve ser um metabólito discriminatório para condições de escuro.

É interessante notar que os níveis de etanol foram altos no final do ciclo de crescimento, independentemente das condições de cultura (Fig. 24p), isto ocorreu devido o meio de cultivo ter sido mantido em condições semiaberta, provocando uma redução no nível de oxigênio do meio e conseqüentemente levando a uma fermentação no meio de cultura. O etanol é produzido a partir de piruvato (Fig. 24o) em uma reação de duas etapas envolvendo descarboxilação por piruvato descarboxilase com formação de acetaldeído e subsequente redução ao etanol catalisado pela desidrogenase alcoólica dependente de NADH.

A identificação dos principais metabólitos intracelulares por RMN-¹H, e subsequente análise multivariada, revelou as vias mais afetadas nas culturas de *L. theobromae* por alterações nas condições de luz (Fig. 23). A exposição de culturas fúngicas ao fotoperíodo favoreceu principalmente as vias oxidativas, particularmente as que envolvem degradação dos BCAAs, levando ao acúmulo de componentes da membrana fosfolipídica (colina, fosfocolina e betaína) e corpos cetônicos. A síntese endógena de glicose a partir de substratos não carboidratos, como intermediários do ciclo TCA, alanina e glicerol, também foi estimulada pela luz.

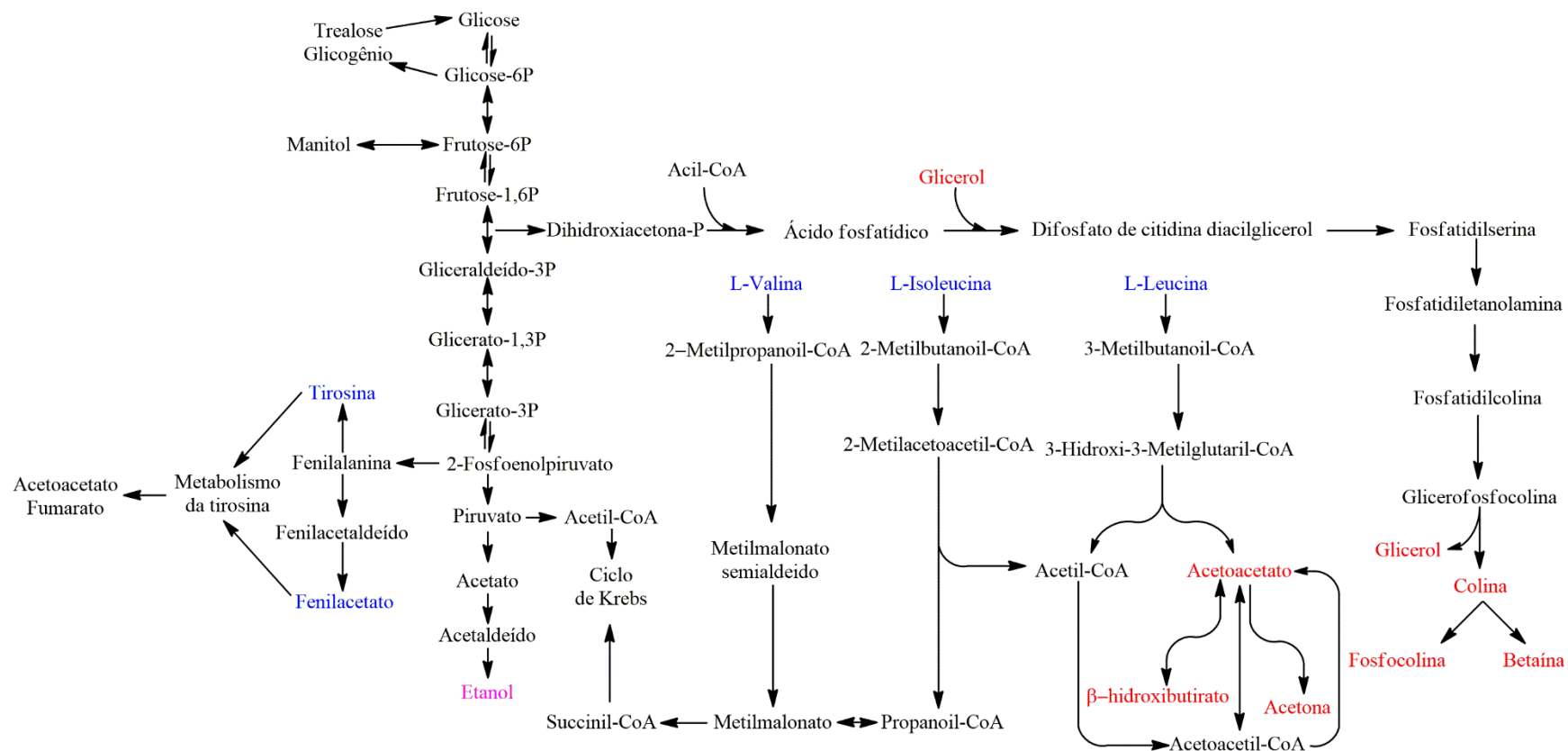
Como a cetogênese e a gliconeogênese foram reguladas positivamente em culturas cultivadas sob condições de luz, essas vias podem ser consideradas discriminatórias. Além disso, a biossíntese de colina e fosfocolina, também pode ser considerada discriminatória, uma vez que os níveis desses metabólitos aumentaram significativamente até a segunda semana em culturas miceliais expostas à luz, declinando logo após esse período, provavelmente devido à síntese de fosfolipídios e auto- montagem de bicamadas lipídicas e vesículas. Curiosamente, a glicólise / fermentação anaeróbica não foi influenciada pela luz, uma vez que os níveis do produto final (etanol) foram semelhantes, independentemente das condições de cultura.

Figura 24. Box-plot dos metabólitos com maiores índices de discriminação ($p < 0,05$), segundo o S-LINE do OPLS-DA e o loading do PCA, onde D = dark, L = fotoperíodo (recebeu 12h de luz por dia).



Fonte: Próprio Autor.

Figura 25. Rota metabólica dos compostos discriminantes, tendo em azul os discriminantes quando não há luz, e em vermelho discriminante quando há luz.



Fonte: Próprio autor.

6. CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados demonstram a importância da luz sobre a biologia de *L. theobromae* e fornecem as bases para futuros estudos sobre esse importante patógeno vegetal. A RMN de ^1H acoplada a PCA e OPLS-DA provou ser uma excelente combinação de ferramentas para detecção de diferenças metabólicas entre culturas de *L. theobromae* cultivadas em condições de luz e escuridão. O gráfico de pontuação PC1 vs PC2 demonstrou a existência de diferenças no metabolismo entre os grupos, enquanto o gráfico de carga destacou os metabólitos que melhor expressaram essas diferenças. As vias de detecção de luz foram interligadas não apenas com relação à sinalização de estresse, como demonstrado pelo aumento da produção de pigmentos que servem como proteção contra o estresse oxidativo, mas também com o desenvolvimento de fungos, conforme verificado pelo aumento da produção de biomassa de micélio sem corpos frutíferos. Além disso, colina, fosfocolina e betaína emergiram como principais metabólitos discriminatórios, e seus acúmulos podem explicar por que esse isolado não é produtor de corpos frutíferos e por que os pigmentos foram liberados no meio. A oxidação induzida da tirosina pela luz é um achado importante, pois sugere que as culturas de *L. theobromae* produzem DOPA-melanina em vez de DHN-melanina. Nesse contexto, as culturas de *L. theobromae* poderiam representar uma boa fonte de pigmentos naturais para as indústrias cosmética, farmacêutica e de processamento de alimentos, uma vez que a produção de pigmentos a partir de microorganismos é considerada mais eficiente e econômica do que a síntese química.

7. REFERÊNCIAS

- ALCADE, F. S. C. **Elucidação do destino metabólico de glicose no fungo filamentoso *Trichoderma reesei* por análise EST (Expressed Sequence Tags) e “microarrays” de cDNA.** 2002. 120 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- ALIFERIS, K. A.; JABAJI, S. ¹H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of *Rhizoctonia solani* sclerotia, **Metabolomic**, 6, 96-108, 2010.
- ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**. v. 3, p. 267-274, 2000.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI-Jr, W.; PEREIRO, J. O.; ARAUJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.3, p. 40-65, 2000.
- BABITHA, S.; CARVAHLO, J. C.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. **World J Microbiol Biotechnol**, 24, 2671–2675, 2008.
- BARROS, B. S.; SILVA, J. DA S.; FERRO, J. N. DE S.; AGRA, I. K. R.; BRITO, F. DE A.; ALBUQUERQUE, É. D.; CAETANO, L. C.; BARRETO, E. Methanol extract from mycelium of endophytic fungus *Rhizoctonia* sp. induces antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice. **J. Nat. Med.**, 65, 526–531, 2011
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6ª ed, Rio de Janeiro, 2010.
- BHARTI, S. K.; JAISWAL, V.; GHOSHAL, U.; CHOSHAL, Y. C.; BAIJAL, S. S.; ROY, R.; KHETRAPAL, C. L. Metabolomic profiling of amoebic and pyogenic liver abscesses: an in vitro NMR study. **Metabolomics**, 8, 540–555, 2012.
- Boundless. Industrial Microbiology. *Boundless Microbiology*. Disponível em: <<https://courses.lumenlearning.com/boundless-microbiology/chapter/industrial-microbiology/>> Acessado em 15 de fevereiro de 2018
- BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**. v.63, p. 1447-1448, 2000.
- BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal Natural Products**. v.67, p. 2141-2153, 2004
- BYLESJÖ, M.; RANTALAINEN, M.; CLOAREC, O.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; TRYGG, J. OPLS discriminant analysis: Combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. **JOURNAL OF CHEMOMETRICS**, 20, 341–351, 2006.

CARVALHO, Y. M. B. G.; MENEZES, P. P.; SOUSA, B. .M. H.; LIMA, B. S.; TRINDADE, I. A. S.; SERAFINI, M .R; PEREIRA, E. W. M.; REZENDE, M. M.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; NAKAMURA, C. V.; SILVA-JÚNIOR, E. F.; CRISPIM, A. C.; AQUINO, T. M.; ARAÚJO, A. A. S. Inclusion complex between b-cyclodextrin and hecogenin acetate produces superior analgesic effect in animal models for orofacial pain. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 93, 754–762, 2017.

CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; REYES-DE-CORCUERA, J. I.; ETXEBERRIA, E.; DANYLUK, M. D. RODRICK, G. E. Metabolomics analysis in food science: a review. **Trends in food Science & Technology**, 20, 557-566, 2009.

CHANG, S.T; MILES, P. G. Mushrooms – cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. Boca Raton: CRC Press, 2nd ed., 2004

CHENG, Y. F.; JIN, W.; MAO, S. Y.; ZHU, W. Production of Citrate by Anaerobic Fungi in the Presence of Co-culture Methanogens as Revealed by ¹H NMR Spectrometry. **Asian Australas. J. Anim. Sci.**, 26, 10, 1416-1423, 2013.

CHEONG, K. H.; STRUB, C; MONTET, D; DURAND, N; ALTER, P.; MEILE, J.; GALINDO, S. S.; FONTANA, F. Effect of different light wavelengths on the growth and ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus westerdijkiae*. **FUNGAL BIOLOGY**, 120, 745-751, 2016.

CHO, Y. J.; HWANG, H. J.; KIM, S. W.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. **Journal of Biotechnology** 95 (2002) 13–23

CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. 2. d. Vol. 27; ELSEVIER, 2009. p. 384.

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophytes symbiosis with grasses. **American Naturalist**, v.160, p. S99-S127, 2002.

CLOAREC, O.; DUMAS, M.; CRAIG, A.; BARTON, R. H.; TRYGG, J.; HUDSON, J.; BLANCHER, C.; GAUGUIER, D.; LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. Statistical Total Correlation Spectroscopy: An Exploratory Approach for Latent Biomarker Identification from Metabolic 1H NMR Data Sets. **ANALYTICAL CHEMISTRY**, 77, 1282-1289, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure Appl. Chem.** v.77, p. 7–24, 2005.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDED, J.; MARASAS, W. F. O.; PHILIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeraceae*. **Studies in Mycology**. 55, 235-253, 2006.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; SYED, T. A.; QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignina. **Int J Biochem Mol Biol**, 1, 1, 36-50, 2010.

DEMAIN, A.L. Small bugs, big business: The economic power of the microbe, **Biotechnology Advances**, v.18, p. 499-514, 2000.

DEMAIN, A.L.; ADRIO, J.L. Contributions of microorganisms to industrial biology, **Molecular Biotechnology**, v.38, p. 45-55, 2008.

DUDDECK, H.; DIETRICH, W. **Structure Elucidation by Modern NMR: A Workbook**. 2nd, Darmstad: Steinkopff; New York: Springer, 1992.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 24, p. 285-294, 2005.

DUPORTET, X.; AGGIO, R. B. M.; CARNEIRO, S.; VILLAS-BÔAS, S. G. The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. **Metabolomics**. 8, 410-421, 2012.

ESPOSITO, O. E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul. 2010, p. 638.

FAETH, S.H.; FAGAN, W. F. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. **Integrative and Comparative Biology**. v. 42(2), p. 360-368, 2002.

FANELLI, F.; SCHMIDT-HEYDT, M.; HAIDUKOWSKI, M.; SUSCA, A.; GEISEM, R.; LOGRIECO, A.; MULÈ, G. Influence of light on growth, conidiation and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **FUNGAL BIOLOGY**. 116, 241-248, 2012.

FERREIRA, M. M. C. **QUIMIOMETRIA – Conceitos, Métodos e Aplicação**. Campinas-SP: Editora Unicamp, 2015.

FIEHN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHERWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 1157- 1161, 2000.

FRAÇOIS, J.; PARROU, J. L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 25, p. 125-145, 2001.

FRIES, N. Vitamins and other growth factors. In. G. C. Ainswoeth; A. S. Sussman. **The Fungi**. v. 1, 1965, p. 491-523. New York: Academic Press.

FUNARI, C. S.; EUGSTER, P. J.; MARTEL, S.; CARRUPT, P. A.; WOLFENDER, J. L.; SILVA, D. H. S. High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. **J. Chromatogr. A**, v. 1259, p. 167-168, 2012.

GAO, F. K.; DAI, C. C.; LIU, X. Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 13, p. 1346-1351, 2010.

GOW, N. A. R.; GADD, G. M. **The growing fungus**. Oxford, 1995.

GUNASEKARAN, S.; POORNIAMMAL, R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. **African Journal of Biotechnology** Vol. 7 (12), pp. 1894-1898, 2008

HAEFNER, B. Drugs from the deep: Marine natural products as drug candidates. **Drug Discov. Today**, v. 8, p. 536-544, 2003.

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, Cambridge, v. 169, p. 453-468, 2006.

HAYKIN S. **Neural networks: a comprehensive foundation**. New York: Prentice Hall; 1999.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HAWKSWORTH, L. D; LÜCHING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiology Spectrum**, 5(4): FUNK-0052-2016, 2017.

HERRE, E. A.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D. A.; ROJAS, E.; MAYNARD, Z.; BUTLER, A.; BAEL, S. A. V. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. **Ecology Society of America**, v. 88, p. 550-558, 2007.

HEYDEN, Y. V. Extracting information from chromatographic herbal fingerprints. **LC-GC Europe**, v. 21, p. 438, 2008.

HOIJEMBERG, P. A.; PELCZER, I. Fast Metabolite Identification in Nuclear Magnetic Resonance Metabolomic Studies: Statistical Peak Sorting and Peak Overlap Detection for More Reliable Database Queries. **Journal of Proteome**. 17, 392-401, 2018.

HOLZGRABE, U.; DIEHL, B; WAWER, I. **NMR SPECTROSCOPY IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS**, Elsevier, 2008.

HONGYU, K. **Comparação do GGE-biplot ponderado e AMMI-ponderado com outros modelos de interação genótipo × ambiente**. 2015. 155p. Tese (Doutorado em Estatística e Experimentação Agronômica) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

HUANG, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, H.; FENG, J.; CAI, S.; CHEN, Z. A high-resolution 2D J-resolved NMR detection technique for metabolite analyses of biological samples. **SCIENTIFIC REPORTS**. 5, 8390; 2015.

- JIANG, Z. D.; AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 22, p. 245-72, 2000.
- JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**. Madison: Prentice Hall International, 1998. 816p.
- JOLLIFFE, I. T. **Principal component analysis**. New York: Springer-Verlag; 1986.
- KADDURAH-DAOUK, R.; KRISTAL, B. S.; WEINSHILBOUM, R. M. Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 48, 653–83, 2008
- KASTURE, V.S.; MUSMADE, D. S.; VAKTE, M. B.; SONAWANE, S. B.; PATIL, P. P. METABOLOMICS: CURRENT TECHNOLOGIES AND FUTURE TRENDS. **International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences**, vol. 2, n° 1, 206-217, 2012.
- KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. Irlanda: Wiley, 2005
- KEMPKEN, F.; ROHLFS, M. Fungal secondary metabolite biosynthesis – a chemical defense strategy against antagonistic animals? **Fungal Ecology**, v. 3, p. 107-114, 2010.
- KIM, H. SON, H.; LEE, Y, -W. Effects of light on secondary metabolism and fungal development of *Fusarium graminearum*. **Journal of applied Microbiology**, 116, 380-389, 2013.
- KRIEL, W. M.; SWART, W. J.; CROUS, P. W. Foliar endophytes and their interactions with host plants, with specific reference to the Gymnospermae. **Advances in Botanical Research**, v. 33, p. 1-34, 2000.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. **Chem. & Biol.** v. 19, p. 792-798, 2012.
- LOEWUS, F. A.; TANNER, W. Plant carbohydrates. (Encyclopedias of plants physiology; new series, v. 13A). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1982.
- LUDWING, C.; VIANT, M. R. Two-dimensional J-resolved NMR Spectroscopy: Review of a Key Methodology in the Metabolomics Toolbox. **Phytochemical Analysis**, 21, 22–32, 2010
- MAPARI, S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. **Microbial Cell Factories** 2009, 8:24.
- MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **Eur. J. Med. Chem.** v. 46, p. 4769–4807, 2011.

MURPHY, D. J.; VANCE, J. Mechanism of Lipid Body Formation. Trends in Biochemical Sciences, v. 24 (3), p. 109-115, 1999.

MUSHTAQ, M. Y.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. WILSON, E. G. Extraction for Metabolomics: Access to The Metabolome, **Phytochem. Anal.** 25, 291–306, 2014.

NASCIMENTO, C. J. do; JR., C. B. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR: Gradus Primus. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.** n. 21, 2001.

NETTO, M. S. B.; LIMA, W. G.; CORREIA, K. C.; da SILVA, C. F. B; THON, M.; MARTINS, R. B.; MILLER, R. N. G.; MICHEREFF, S. J.; CÂMARA, M. P. S. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of Anacardium in Brazil, with a new species of Lasiodiplodia. **Fungal Biology**, 121, 347-451, 2017.

PAIVA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução a Espectroscopia.** 2012. Tradução Pedro Barros, Paulo Sergio Santos, Carlos Alberto Villarruel Moreira e Adriane Peçanha Sueli Bossi. 4ª Ed. São Paulo. Cengage Learning NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 6ª ed., Porto Alegre : Artmed, 2014 PELCZAR, M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**, Vol. 1 e 2, 2ª ed., São Paulo, Makron Book, 1997.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N., TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins.** v. 1, p. 185–196, 1992.

POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R.; SOUSA, G. S.; ANDRADE, J. C. R.; LISBOA, H. F.; GONÇALVES, R. C. R. **Production of melanin pigment by fungi and its biotechnological applications.** M. Blumenberg (Ed.), *Melanin* (pp. 47-75). London: IntechOpen, 2017

POORNIAMMAL, R.; PARTHIBA, M.; GUNASEKARAN, S.; MURUGESAN, G. Natural dye production from *Thermomyces* sp fungi for textile application. **Indian Journal of Fibre & Textile Research**, Vol. 38, 2012, 276-279

PRADEEP, F. S.; PRADEEP, B. V. OPTIMIZATION OF PIGMENT AND BIOMASS PRODUCTION FROM FUSARIUM MONILIFORME UNDER SUBMERGED FERMENTATION CONDITIONS. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Vol 5, Suppl 3, 2013

PUTZKE, J; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**, v. 2. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002.

PUTZKE, J; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**, v. 1, 2. d. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004.

RAJASEKARAN, R.; CHANDRASEKARAN, R.; MUTHSELVAM, M. Microbial Biotechnology: Rapid Advances in na área of massive impact. **Advanced Biotech**, p. 19-25, 2008

REY-LADINO, J.; ROSS, A. G.; CRIPPS, A. W.; MCMANUS, D. P.; QUINN, R. Natural products and the search for novel vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 29, p. 6464–6471, 2011.

RICHARDS, S. E.; DUMAS, M.; FONVILLE, J. M.; EBBELS, T. M. D.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Intra- and inter-omic fusion of metabolic profiling data in a systems biology framework. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 104, 121-131, 2010.

RODRÍGUEZ, R.; WHITE, J.; ARNOLD, A. E; REDMAN, R. Fungal endophytes: Diversity and ecological roles. **New. Phytol.** v. 182, p. 314-330, 2009.

ROZE, L. V.; CHANDA, A.; LINZ, J. E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 35-48, 2011.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 319-343, 1998.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 5. ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural Products Isolation: Methods in Biotechnology**. New Jersey: Humana Press, 2006.

SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. Symbiosis of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**. v. 55, p. 315-340, 2004.

SCHULZ, B; BOYLE, C The endophytic continuum. **Mycol. Res.** v. 109, p. 661-686, 2005.

SCHULZ, B.; SUCKER, J.; AUST, H. J.; KROHN, K.; LUDEWIG, K.; JONES, P. G.; DORING, D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. **Mycological Research**, v. 99, p. 1007-1015, 1995.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHM, K. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, p. 996–1004, 2002.

SERANO, S; RODRIGUEZ-DE-VALE, N. Calcium uptake and efflux during the yeast to mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, n. 112, p.1-9, 1990.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF ORGANIC COMPOUNDS**, 7. d. 2005. JOHN WILEY SONS, INC, 2005.

SMOLIŃSKA, A. **Chemometrics and NMR spectroscopy for metabolomics analysis of neurological disorders**. 2012

SONKAR, K.; PURUSOTTAM, R. N.; SINHA, N. Metabonomic Study of Host–Phage Interaction by Nuclear Magnetic Resonance- and Statistical Total Correlation Spectroscopy-Based Analysis. **ANALYTICAL CHEMISTRY**, 84, 4063–4070, 2012.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 315-333, 2002.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 257-268, 2004.

SUMMER, L.W.; MENDES, P.; DIXON, R.A. Review Plant metabolomics: largescale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817–836, 2003.

SUN, R.; GAO, Y. X.; SHEN, K. Z.; XU, Y. B.; WANG, C. R.; LIU, H. Y.; DONG, J. Y. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*, **Phytochemistry Letters**, 2010 doi: 10.1016/j.pjytol.2010.12.001.

TAN, R. X., ZOU, W. X. Endophytes: A rich source of functional metabolites. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TISCH, D.; SCHMOLL, M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. **Applied Microbiol Biotechnol**, 85, 1259-1277, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B; R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 8^a ed. São Paulo, Artmed, 2006.

TRIBA, M. N.; MOYEC, L. L.; AMATHIEU, R.; GOOSSENS, C. BOUCHEMAL, N.; NAHON, P.; RUTLEDGE, D. N.; SAVARIN, P. PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. **Molecular BioSystems**, 11, 13-19, 2015.

TRYGG, J.; WOLD, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). **JOURNAL OF CHEMOMETRICS**, 16(3), 119–128, 2002.

UNAGUL, P.; WONGSA, P.; KITTAKKOP, P.; IINTAMAS, S.; SRIKITIKULCHAI P.; Tatcharoen, M. Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. **J Ind Microbiol Biotechnol** (2005) 32: 135-140

VALDUGA, E.; TASTCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, L.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de Carotenoides: Microrganismos Como Fonte De Pigmentos Naturais. **Quim. Nova**, 32, 9, 2429-2436, 2009

VELMURUGAN, P.; LEE, Y. H.; VENIL, C. K.; Lakshmanaperumalsamy, P.; Chae, J.; Oh, B. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 109, 4, 346-350, 2010

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, 37, 1–20, 2007.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry **Phytochem. Rev.**, v. 6, p. 3-14, 2007.

WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. **Introduction to fungi**, 3th edition. Oxford, Cambridge University Press, 2007

WIKLUND, S., JOHANSSON, E., SJÖSTROM, L., MELLEROWICZ, E. J.; EDLUND, U.; SHOCKCOR, J. P.; GOTTFRIES, J.; MORITZ, T.; TRYGG, J. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. **ANALYTICAL CHEMISTRY**, 80, 115–122, 2008

YUSEF, H. M.; ALLAN, M. E. THE EFFECT OF LIGHT OF GROWTH AND SPORULATION OF CERTAIN FUNGI. **Mycopathologia et mycologia applicata**, 33, 81-89, 1967. ZĄBEK, A.; KLIMEK-OCHAB, M.; JAWIEŃ, E.; MŁYNARZ, P. Biodiversity on targeted metabolomics analysis of filamentous fungal pathogens by ¹H NMR-based studies. **World J. Microbiol Biotechnol.** 33, 132, 2017.

ZĄBEK, A.; KLIMEK-OCHAB, M.; JAWIEŃ, E.; MŁYNARZ, P. Biodiversity in targeted metabolomics analysis of filamentous fungal pathogens by ¹H NMR-based studies. **World J Microbiol Biotechnol**, 33, 132, 2017

ZOBERI, M. H. Tropical microfungi. London: The MacMillan Press, 1972. p. 1.

APÊNDICE A

LOCUS Seq1 577 bp DNA linear PLN 19-MAY-2020

DEFINITION elongation factor 1-alpha (EF-1 alpha) gene, partial cds.

ACCESSION Seq1

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Lasiodiplodia theobromae

ORGANISM Lasiodiplodia theobromae

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;

Dothideomycetes; Dothideomycetes incertae sedis; Botryosphaeriales;

Botryosphaeriaceae; Lasiodiplodia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 577)

AUTHORS Crispim,A.C., Crispim,S.M.A., Rocha,J.R., Ursulino,J.S.,

Sabino,A.R., Sobrinho,R.R., Bento,E.S., Santana,A.E.G. and

Caetano,L.C.

TITLE The effects of light on the metabolome of Lasiodiplodia theobromae
mycelia cultured in vitro

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 577)

AUTHORS Crispim,A.C., Crispim,S.M.A., Rocha,J.R., Ursulino,J.S.,

Sabino,A.R., Sobrinho,R.R., Bento,E.S., Santana,A.E.G. and

Caetano,L.C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (19-MAY-2020) School of Plant Sciences, University of
Arizona, 1140 E. South Campus Dr., Tucson, AZ 85721, United States

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:robertorsobrinho@gmail.com

Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:2

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..577
 /organism="Lasiodiplodia theobromae"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="COUFAL2020"
 /host="Schinus terebinthifolia"
 /db_xref="taxon:45133"
 /country="Brazil"

mRNA <105..>146
 /product="elongation factor 1-alpha"

CDS <105..>146
 /codon_start=1
 /product="elongation factor 1-alpha"
 /translation="CGGIDKRTIEKFEK"

mRNA <408..>577
 /product="elongation factor 1-alpha"

CDS <408..>577
 /codon_start=1
 /product="elongation factor 1-alpha"
 /translation="EAAELGKGSFKYAWVLDKLAERERGITIDIALWKFETPKYYVT
 VIDAPGHRDFIK"

BASE COUNT 114 a 177 c 153 g 133 t

ORIGIN

1 cgtcgactct ggcaagtcga ccaccaccgg tcgtaagttg ccctcacct gccttgcgcc
61 tcaaggcaac atccttaca tgtttattag acttgatcta caagtgcggc ggtattgaca
121 agcgtacat tgagaagttc gagaaggctc gtgcacgcat gtcgtttttt aacccccctc
181 gacttcggcg ctgcagcgct gcgggcgaca gtccgcctta tcgcttttgt gaggggcatt

241 tttcgtggtg gggtttggcc cgcgctagcc tcgtctgggt tcggcaaaat gaccgcactt
301 ggtttttttg cgaccggcgt ctggccgacg cgcctcccca ctacgaaaa atgctctgac
361 cactcatgta ccgtcgtacg agcaaaggct aacgcgcccc actacaggaa gccgctgagc
421 tcggcaaggg ttcctcaag tacgcctggg ttcttgacaa gctcaaggcc gagcgtgagc
481 gtggtatcac catcgacatt gccctctgga agttcgagac cccgaagtac tatgtaccg
541 tcatcgacgc ccccggtcac cgtgacttca tcaagaa

//

LOCUS Seq2 515 bp DNA linear PLN 19-MAY-2020

DEFINITION 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed
spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer
2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION Seq2

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Lasiodiplodia theobromae

ORGANISM Lasiodiplodia theobromae

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
Dothideomycetes; Dothideomycetes incertae sedis; Botryosphaerales;
Botryosphaeriaceae; Lasiodiplodia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 515)

AUTHORS Crispim,A.C., Crispim,S.M.A., Rocha,J.R., Ursulino,J.S.,
Sabino,A.R., Sobrinho,R.R., Bento,E.S., Santana,A.E.G. and
Caetano,L.C.

TITLE The effects of light on the metabolome of Lasiodiplodia theobromae
mycelia cultured in vitro

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 515)

AUTHORS Crispim,A.C., Crispim,S.M.A., Rocha,J.R., Ursulino,J.S.,
Sabino,A.R., Sobrinho,R.R., Bento,E.S., Santana,A.E.G. and

Caetano,L.C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (19-MAY-2020) School of Plant Sciences, University of
Arizona, 1140 E. South Campus Dr., Tucson, AZ 85721, United States

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:robertorsobrinho@gmail.com
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:2

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..515

/organism="Lasiodiplodia theobromae"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="COUFAL2020"

/host="Schinus terebinthifolia"

/db_xref="taxon:45133"

/country="Brazil"

misc_RNA 1..515

*/product="18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,
and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and
28S ribosomal RNA gene, partial sequence"*

BASE COUNT 123 a 141 c 126 g 125 t

ORIGIN

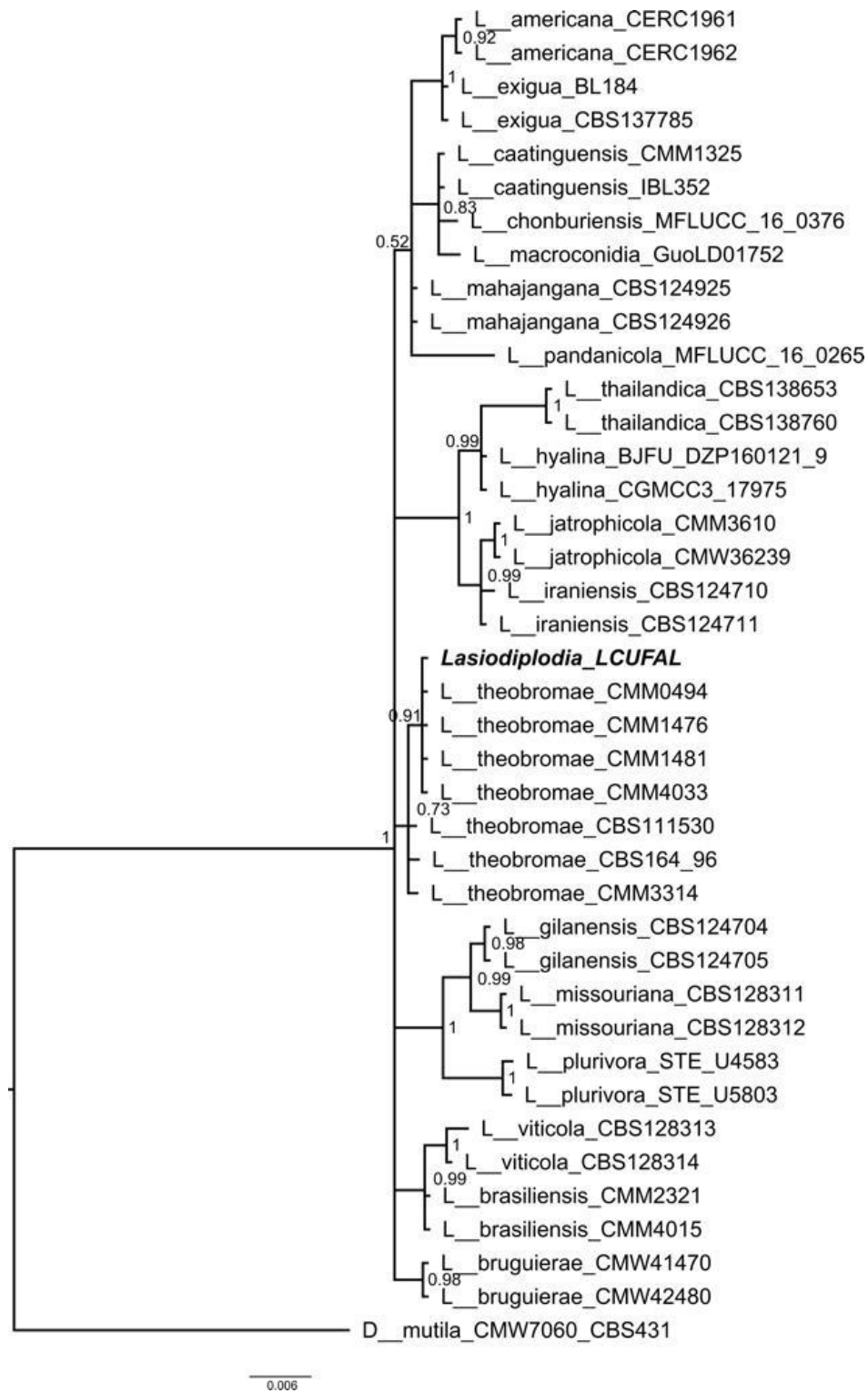
1 ctgcggaagg atcattaccg agttttcgag ctccggctcg actctccac cctttgtgaa
61 cgtacctctg ttgctttggc ggctccggcc gccaaaggac cttcaaactc cagtcagtaa
121 acgcagacgt ctgataaaca agttaataaa ctaaaacttt caacaacgga tctcttggtt
181 ctggcatcga tgaagaacgc agcgaatgc gataagtaat gtgaattgca gaattcagtg

241 aatcatcgaa tctttgaacg cacattgcgc cccttggtat tccggggggc atgcctgttc
301 gagcgtcatt acaacctca agctctgctt ggaattgggc accgtcctca ctgcggacgc
361 gcctcaaaga cctcggcggg ggctgttcag ccctcaagcg tagtagaata cacctcgctt
421 tggagcgggtt ggctcgccc gccggacgaa ccttctgaac ttttctcaag gttgacctcg
481 gatcaggtag ggatacccg tgaacttaag catat

//

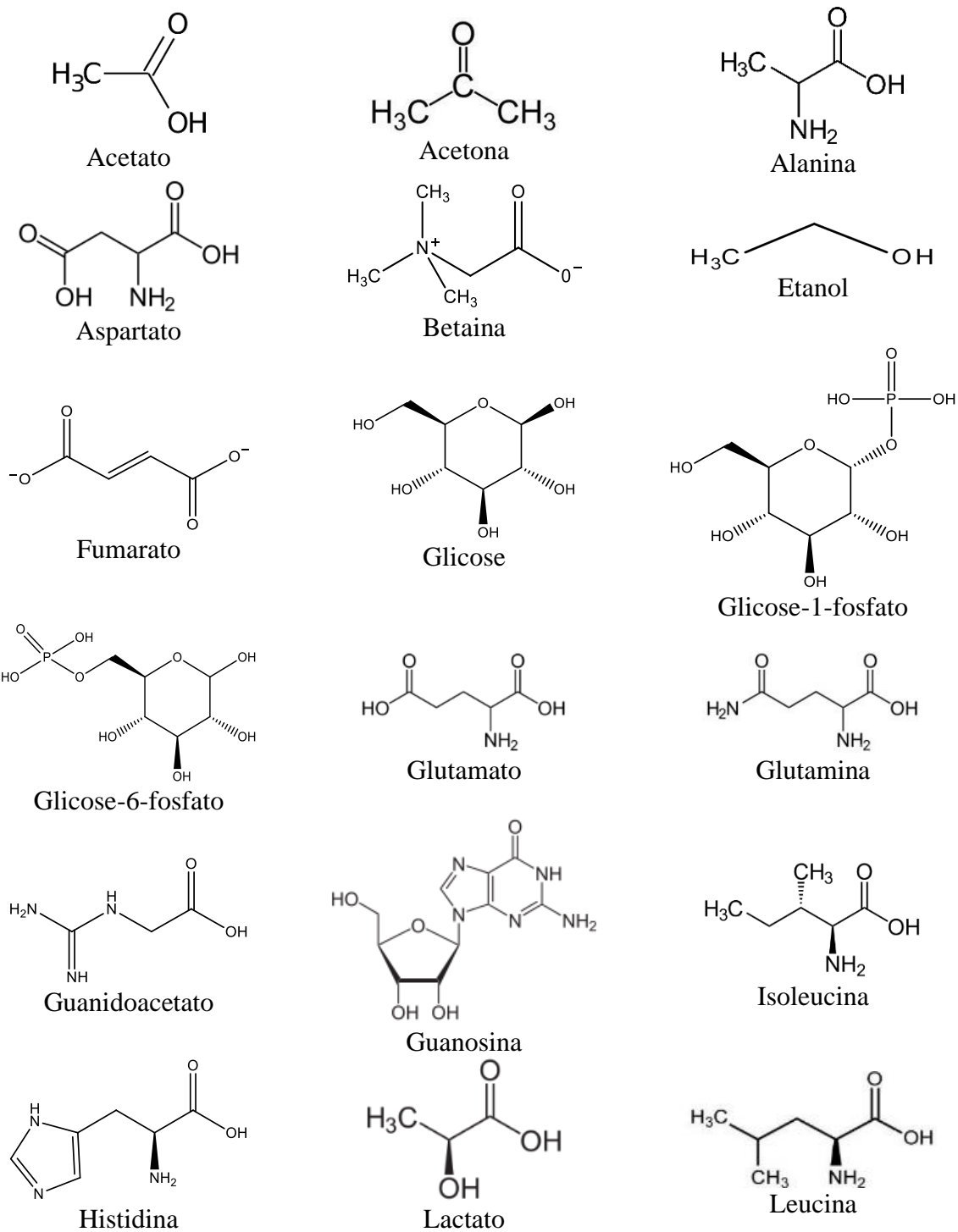
APÊNDICE B

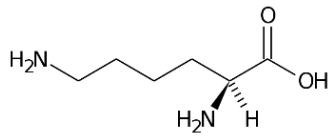
Figura 26.



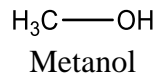
APÊNDICE C

Figura 27. Estrutura dos metabólitos identificados

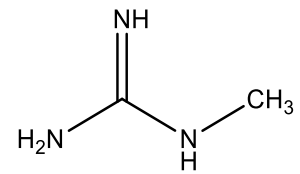




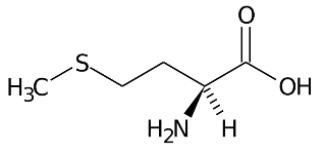
Lisina



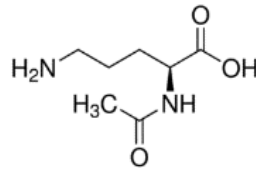
Metanol



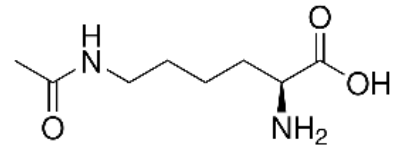
Metilguanidina



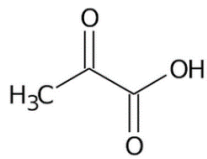
Metionina



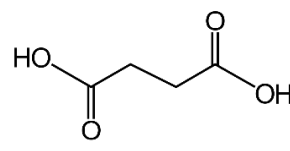
N-Acetilornitina



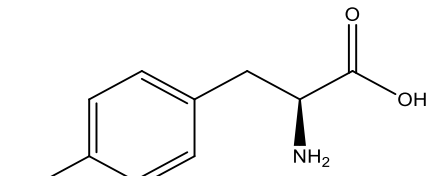
N6-Acetil lisina



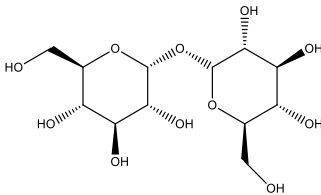
Piruvato



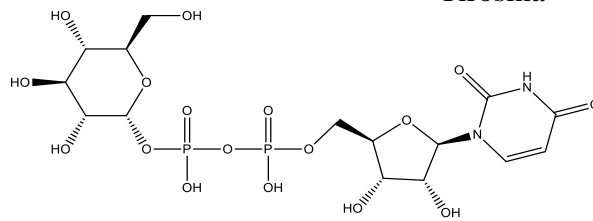
Succinato



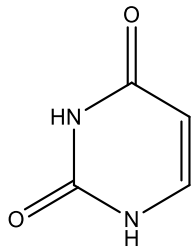
Tirosina



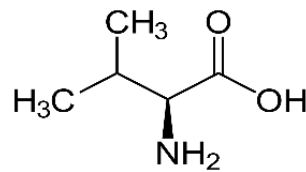
Trealose



UDP-glicose



Uracila



Valina

EVALUATION OF THE METABOLIC PRODUCTION OF THE ENDOPHYTIC FUNGUS *Phomopsis* sp.Jéssica R. da Rocha^{a,*}, Alexandre C. Crispim^a, João M. da Silva^b, Antônio E. G. Santana^b and Luiz C. Caetano^a^aInstituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900 Maceió – AL, Brasil^bCentro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, 57100-000 Rio Largo – AL, Brasil

Recebido em 08/10/2019; aceito em 04/12/2019; publicado na web em 03/03/2020

Endophytic microorganisms have been shown to be an important source of bioactive compounds, and much has been studied about their metabolites. For example, compounds with different biological activities have been isolated from *Phomopsis* sp. The metabolic study of this genus may lead to a better understanding of the routes of production of metabolites of interest. The aim of this study was to map the metabolic profile of *Phomopsis* sp., isolated as an endophyte of *Syzygium jambolanum* DC, using culture filtrate. The fungus was cultivated for six weeks in potato dextrose medium under hypoxia and at room temperature. The filtrate was collected weekly, and the analyses were performed using proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy by applying NOESY1D with suppression of the water signal. The occurrence of reductive routes was verified: alcoholic fermentation throughout cultivation and reductive tricarboxylic acid cycle in the cytosol until the third week of cultivation were observed.

Keywords: citric acid cycle; endophytic; *Phomopsis*; alcoholic fermentation; metabolomic study.

INTRODUCTION

Endophytic microorganisms are present in the inner tissues of plants and coexist in a symbiotic relationship with their hosts without causing damage.¹ On the other hand, endophytes may also behave as pathogens after some kind of external disturbance that, in some way, negatively affects the host. For example, a study of antioxidant activity was carried out in soybean seeds in which compared to seeds infected with *Phomopsis longicolla* and *Cercospora kikuchii*, healthy seeds had a better antioxidant capacity against DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radicals as well as a higher amount of isoflavones.²

Endophytic communities are composed of fungi and bacteria found in a variety of hosts, and it is estimated that many have not yet been identified. Despite their abundance, the relationship between these organisms and their hosts is not yet fully understood. However, many of these endophytes have been applied in agriculture since evidence suggests that they can protect their hosts against pests and pathogenic microorganisms and produce compounds with therapeutic application, such as Taxol and leucinoastatin.³⁻⁷

In general, the most studied endophytes are those isolated from medicinal plants due to their possible symbiotic relationships. Yadav *et al.* verified antioxidant activity in extracts of an endophytic fungus isolated from *Eugenia jambolana* Lam.⁸ Volatile compounds with antibacterial activity were identified in an endophyte associated with *Costus spiralis* (Jacq) Roscoe (Costaceae), a plant traditionally used in the treatment of renal diseases.⁹ In some cases, the endophyte produces the same compound that is synthesized by the host plant, which makes the endophyte one of the main sources of bioactive compounds, and it is often more advantageous to manipulate these microorganisms in the laboratory instead of the plants, which require cultivation and have management costs. To obtain 3 g of vincristine, for example, 3 kg of dried leaves of *Catharanthus roseus* G. Don are needed. In addition, there are cases in which the yield obtained via endophytic production is greater than that of the plant.^{10,11}

The fungus *Phomopsis* sp. has been reported as an endophyte of a variety of plants, including cocoa (*Theobroma cacao* L.) and others of spontaneous growth and medicinal use, such as *Turnera subulata* L.^{12,13} In addition, the biological activities associated with this fungus cover a variety of functionalities, such as antiviral activity against tobacco mosaic virus (TMV), production of mycotoxins with amphiphilic potential against phytopathogenic fungi and antibacterial activity against pathogens and phytopathogens.¹³⁻¹⁶

Some of the bioactive compounds produced by *Phomopsis* sp. isolated from medicinal plants include phomocenamides, with moderate antibacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra;¹⁷ benzoquinone, with antimicrobial activity against gram-positive bacteria and cytotoxicity against the cancer strain HCT-116;¹⁸ mycoepoxidienes, deacetylmethylepoxidienes, phomoxidiene A, phomoxene C and cytosporone E, with antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1 and cytotoxic activity against Vero, KB, MCF-7 and NCI-H187 cells; cytosporone P, with antimalarial activity;¹⁹ 1,5-dihydroxy-3-hydroxyethyl-6-methoxycarbonylxanthone, with cytotoxic activity against A549 and MCF7 tumour cell lines; 1-hydroxy-3-hydroxyethyl-8-ethoxycarbonylxanthone, with cytotoxic activity against the A549 tumour cell line;²⁰ and phomoxanthone F, with weak anti-HIV activity.²¹

In addition to these biological activities, *Phomopsis* sp. is associated with the ability to degrade plant and soil contaminants, such as phenanthrene.²²

Given the diversity of applications of the compounds produced by this endophyte, the investigation of the metabolic routes of these compounds contributes to a better understanding of their production, allowing determination of how much, when and what is produced and then enabling production of these metabolites on a large scale.

Nuclear magnetic resonance (NMR) techniques have proven to be an important ally in this type of study and have been supported by chromatography and mass spectrometry.^{23,24} This work aimed to identify, through NMR experiments, the metabolites present in the culture filtrate (CF) of *Phomopsis* sp. and to evaluate their production during six weeks of cultivation.

*e-mail: jessica.rocha@iqb.ufal.br

EXPERIMENTAL

Biological material

The endophytic fungus *Phomopsis* sp. was previously isolated from the stem bark of *Syzygium jambolanum*, a plant located at 9°33'18.2"S, 35°46'40.9"W.²⁵

Preparation of culture media

Potato dextrose agar culture medium (PDA)

Potato dextrose (20 g) and agar-agar type I (17 g) were dissolved in 1 L of distilled water. The mixture was autoclaved at 121 °C for 17 minutes and then dispensed into previously sterilized petri dishes.

Potato dextrose culture medium (PD)

A methodology similar to the preparation of PDA was followed, excluding agar-agar type I; 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of culture medium (CM) were used and autoclaved at 121 °C for 20 minutes.

Evaluation of metabolic production in the filtered culture of *Phomopsis* sp.

Cultivation

The microorganism was initially cultured on PDA for seven days. After this period, inoculation was performed in 40 Erlenmeyer flasks containing PD media previously prepared. The fungus was cultured for eight weeks, with the vials sealed, in the absence of light and without agitation.

Sample collection

Aliquots of 1.5 mL were collected weekly from five flasks containing the culture and then refrigerated. This procedure was performed in a sterile horizontal laminar flow chamber. From the collected flasks, the mycelium was separated by simple filtration and dehydrated in an oven at 50 °C for seven days for later weighing. The net fraction was discarded.

Mycelial growth

The mycelial growth rate was determined by the average of the five samples collected separately each week, totalling 30 samples. The growth curve was constructed using the dry weight of the mycelium.

Sample preparation

A sodium phosphate buffer solution (0.1 mol L⁻¹; pH = 7.4) was prepared, and trimethylsilylpropanoic acid (TSP) (1 mmol L⁻¹) was added. In each NMR tube, 350 µL of the CF, 350 µL of the buffer solution and 50 µL of D₂O were added.

NMR analysis

The experiments were performed at 25 °C by applying NOESY1D (pulse sequence of noesygppld) to suppress the water signal on a Bruker AvanceUltra Shield 400 spectrometer operating at 9.4 T, observing ¹H at 400.12 MHz. The spectrometer was equipped with a 5 mm BBI probe. The parameters were as follows: 64 scans with an acquisition time of 6.29 s, 64 k time domain points distributed in a spectral width of 13.01 ppm and a recycle delay of 6 s.

Spectrum analysis

The spectra were processed with TopSpin@ 3.5 software using 64 k time domain points. The databases used to identify the metabolites were HMDB (The Human Metabolome Database) and

Chenomx NMR Suite.

Statistical NMR data analysis

Multivariate statistical analysis was performed using MATLAB® software using a tool developed by Dr. K. Veselkov of Imperial College London. The spectra were first grouped and then aligned and finally normalized.

RESULTS AND DISCUSSION

Cultivation and evaluation of mycelial growth

After seven days of culture on PDA, *Phomopsis* sp. presented slight yellowish pigmentation. During the cultivation in PD, the intensification of the yellow colour was observed until the eighth week, in which it presented brownish pigmentation.

According to the mycelial growth curve (Figure 1), the endophyte showed marked growth from the first to the second week and continued to grow until the fourth week. From the fourth week, there was no significant variation in the mycelial mass. In this phase, characterized as a stabilization phase, the accumulation of secondary metabolites may occur.²⁶

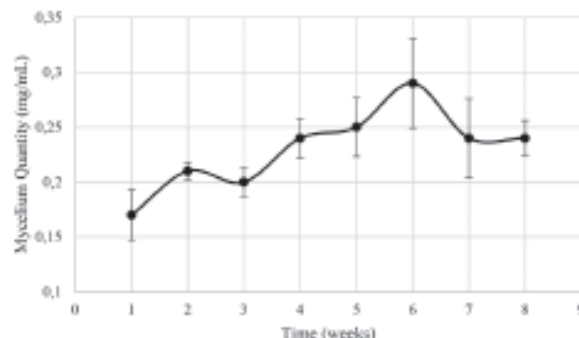


Figure 1. Mycelial growth curve of *Phomopsis* sp. during eight weeks of culture

Metabolic evolution of the CF

To identify the metabolites of the CF of *Phomopsis* sp., suppression of the water signal by NOESY1D was required.

According to the CM spectra, signals attributed to α - and β -dextrose at 5.24 and 4.65 ppm, respectively, were detected in addition to acetoin (1.37 ppm, *d*, *J* = 7.15 Hz, CH₂; 2.21 ppm, *s*, CH₂; 4.42 ppm, *q*, CH), asparagine (2.84 ppm, *m*, CH'; 2.94 ppm, *m*, CH'; 4.00 ppm, *dd*, *J* = 7.69 and 4.26 Hz, CH), citrate (2.53 ppm, *d*, *J* = 15.88, Ha; 2.66 ppm, *d*, *J* = 15.88, Hb), succinate (2.40 ppm, *s*, CH₂), pyruvate (2.46 ppm, *s*, CH₃) (Figure 3), acetate, (1.92 ppm, *s*, CH₃), ethanol (1.18 ppm, *t*, *J* = 7.00, CH₂; 3.66 ppm, *q*, *J* = 7.00, CH₂), oxaloacetate (2.38 ppm, *s*, CH₂), pyroglutamate (2.02 ppm, *m*, CH'; 2.39 ppm, *m*, CH₂; 2.50 ppm, *m*, CH'; 4.17 ppm, *dd*, *J* = 9.02 and 5.83 Hz, CH), tyrosine (6.90 ppm, *dt*, *J* = 2.14, 2.85, 8.56, CH; 7.20 ppm, *dt*, *J* = 2.04, 3.10, 8.56, CH), fumarate (6.53 ppm, *s*, CH) and methanol (3.36 ppm, *s*, CH₃). The signals detected do not include those of protons of amine and hydroxyl groups present in the structures of these metabolites. This is an expected fact since in the presence of D₂O, there is spontaneous hydrogen-deuterium exchange.²⁷

All chemical shifts and coupling constants were assigned based on the HMDB and Chenomx databases. These assignments were supported by the literature as well.²⁸⁻³⁵

According to the CF¹ spectra from the first to the sixth week of culture, variations in the signal intensities of the metabolites were present. The quantitative variations in these compounds were observed through analysis of variance (ANOVA) performed using a tool in MATLAB[®] software. A significant increase in the intensity of the ethanol signals (Figure 2a) was observed, indicating the occurrence of fermentation. The ethanol increase was quantified relative to the TSP based on the 1.18 ppm (t) peak area and represented by the boxplot (Figure 2b); these measurements were performed with R software. In addition, the presence of some metabolites that were not detected in CM was observed from the first week of culture (CF¹): alanine (1.48 ppm, *d*, *J* = 7.20 Hz, CH; 3.76 ppm, *q*, *J* = 7.20 Hz, CH), malate (2.36 ppm, *dd*, *J* = 15.38 and 10.12 Hz, CH; 2.66 ppm, *dd*, *J* = 15.38 and 2.90 Hz, CH; 4.29 ppm, *dd*, *J* = 10.12 and 2.80 Hz, CH), formate (8.46 ppm, *s*, CH) and formaldehyde (9.68 ppm, *s*, CH₂).

On the other hand, asparagine, detected in CM, was no longer observed in CF¹, indicating that the microorganism metabolized it. Figure 3 shows the intensity variations between CM and CF¹.

The yellow pigmentation was considerably elevated from the third to the fourth week of cultivation and intensified until the end of the cultivation period. From the fourth week of culture, the quantitative mycelial mass did not present significant development (Figure 1). Considering the spectra of the samples during the six weeks of culture, it was observed that most of the metabolites could not be detected or presented no observable variation from the fourth week. A minority of metabolites could be visibly monitored through the fifth and sixth weeks. Since all the metabolites identified in the CF¹ were primary, it was inferred that from this period (fourth week), secondary metabolism begins using the primary metabolites present for the production of secondary metabolites. Since the sample was very dilute, the intensity of the signals of secondary metabolites

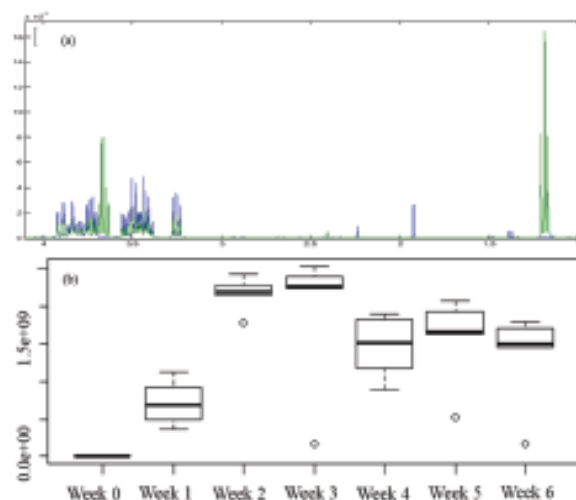


Figure 2. Overlapping of the ¹H NMR spectra of CM (in blue) and CF¹ (in green) (a); relative quantification of ethanol (b)

whose production was beginning was low, making detection difficult. Table 1 indicates these metabolic variations throughout the culture. The classification of the metabolites arranged in the table was made based on the KEGG PATHWAY database available at <http://www.genome.jp/>.²⁶

Variations in the metabolites belonging to the tricarboxylic acid (TCA) cycle were observed through ANOVA performed using a tool in MATLAB[®] software (supplementary material). The occurrence of the reductive TCA cycle is evident until the third week of culture.^{23,27}

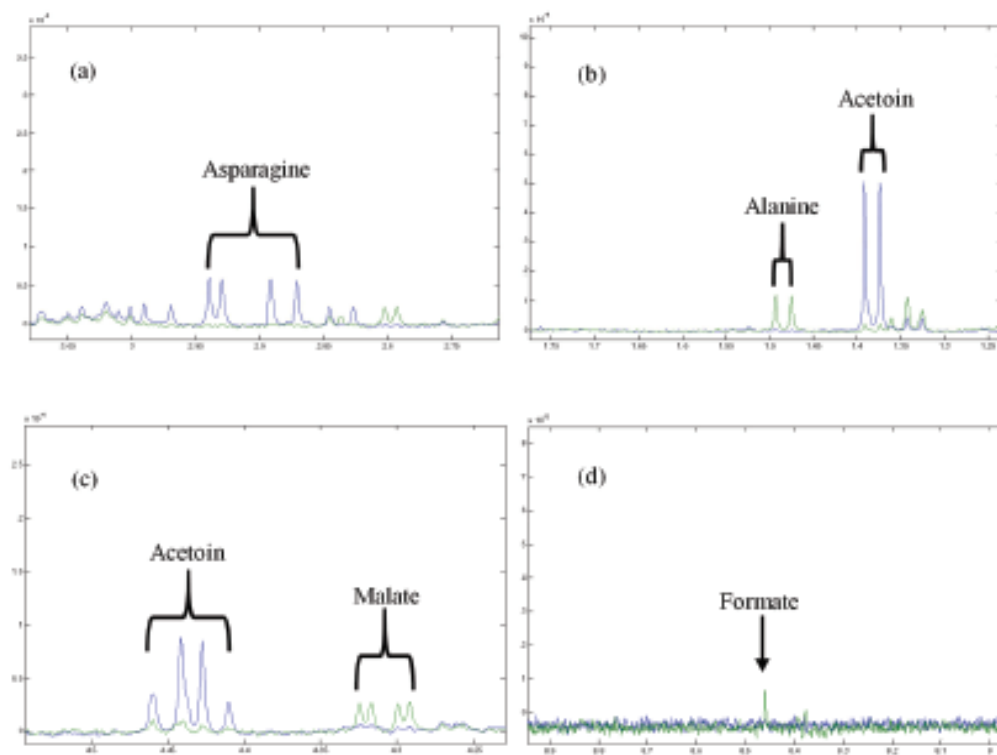


Figure 3. Overlapping of the ¹H NMR spectra of the CM (in blue) and the culture CF¹ (in green): (a) asparagine signals; (b) signs referring to alanine and acetoin; (c) malate and acetoin signals; (d) signal relating to formate

Evans *et al.* first described this route of reductive assimilation of CO₂ by a photosynthetic bacterium.³⁸ In the present case, non-detection of metabolites such as α -ketoglutarate and isocitrate also confirms that the reductive route is occurring. From week 0, CM, until the first week, it was possible to observe a decrease in the quantity of oxaloacetate, while the amounts of malate, fumarate and succinate increased. In the following week, in addition to the decrease in the oxaloacetate content, a decrease in the malate and fumarate contents and a consequent increase in the succinate content were observed. From the second to the third week, the oxaloacetate content began to decrease, and the malate content also followed this trend and decreased; however, although the fumarate content had a small increase, it did not present such significant variation. Consequently, there was a decrease in the succinate content, indicating that the metabolites that would lead to its production began to participate more in other routes. From the third to the fourth week, the oxaloacetate content began to rise, but this time, it did not follow the malate content; oxaloacetate was no longer observed from this point, and the fumarate that would provide it was not observed. In this way, the succinate content continued to decay, as this route had been interrupted. Thus, it is concluded that from the interruption of the reductive TCA cycle, from the third to the fourth week, the production routes of secondary metabolites begin to be established. In fact, it is in this period that yellow pigmentation intensifies.

In an anaerobic system, the production of organic compounds can be expected from CO₂, so this type of system favours reductive routes.³⁹ In this context, by monitoring the metabolic behaviour of *Phomopsis* sp., it was possible to observe alcoholic fermentation occurrence as well as the evolution of ethanol production up to the sixth week of cultivation (Figure 2).

Table 1. Variation in metabolites over 6 weeks of fungal cultivation

Metabolites	Variation per week					
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6
<i>Metabolism of amino acids and proteins</i>						
Acetoin	↓	↓	↓	+	+	+
Alanine	↑	↓	↓	+	+	+
Asparagine	↓					
Pyroglutamate	~	↑	↑	↓	↓	+
Tyrosine	~	↑	↑	+	+	↑
<i>Carbohydrate metabolism</i>						
Acetate	↓	↑	↑	↑	↑	↑
Ethanol	↑	↑	↑	↓	~	~
Citrate	↑	↑	↓	↓	↓	+
Fumarate	↑	↓	↑	+	+	+
Glucose	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Malate	↑	↓	↓	+	+	+
Oxaloacetate	↓	↓	↓	↑	~	~
Succinate	↑	↑	↓	↓	↓	~
<i>Metabolism of methane</i>						
Methanol	↑	↑	↑	~	↓	~
Formaldehyde	↑	↑	~	~	~	↓
Formate	↑	↑	~	+	+	+
<i>Various</i>						
Pyruvate	↓	↑	↑	↓	↓	+

~ = no variation; ↑ = increase; ↓ = decrease; + = it was not possible to determine presence or variations.

Notably, methanol was monitored until the sixth week of analysis. Its quantity increased until the third week and was maintained until the fourth week, followed by a decrease in the fifth week that was maintained until the last week of cultivation. Both formaldehyde and formate showed increasing quantities until the second week; the latter remained until the third week and could no longer be visualized after that point. On the other hand, the quantity of formaldehyde, which could be monitored until the end, also did not change from the second week, but at the fifth week, it decreased. Statistical total correlation spectroscopy (STOCSY) showed that these three metabolites belong to the same route (Figure 4); the oxidation of methanol leads to formaldehyde and then to the formation of CO₂.⁴⁰ However, there was a limited oxygenation environment (hypoxia), and CO₂ came from the fermentation that occurred throughout the growing period. In fact, there was a tendency for methanol to remain present, while the formate could no longer be observed. The formaldehyde content decreased in the last week, and the methanol content also decreased a week before; however, methanol was present in the last week, indicating that its production was occurring through the reduction of CO₂.

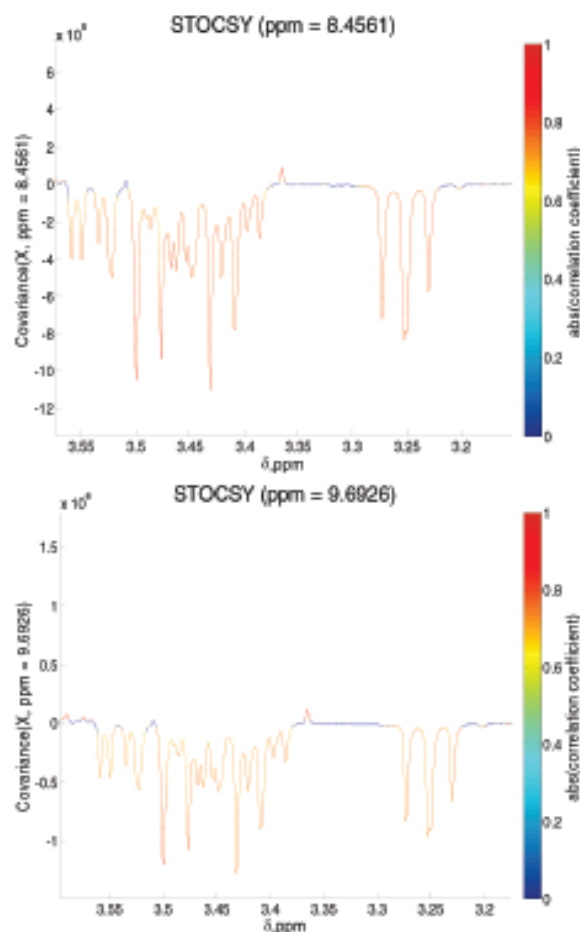


Figure 4. Formate and formaldehyde showed a strong positive correlation and positive covariance with methanol (from the first to the second week)

CONCLUSION

The identified metabolites of the CF of *Phomopsis* sp. were all from primary metabolism. It is not possible to observe the presence

and/or variation in these metabolites from the fourth week of culture when the yellow pigmentation of the fungus intensifies. It was inferred that during this period, secondary metabolism advances.

This *Phomopsis* sp. NMR metabolomic study performed under the presented conditions showed the occurrence of the reductive TCA cycle and alcoholic fermentation occurring in CF.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

ANOVA images produced using MATLAB® software that verify the variations listed in Table 1 of the metabolites belonging to the TCA cycle are available at <http://quimicanova.sbq.org.br> in PDF file format with free access.

ACKNOWLEDGMENT

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship provided.

REFERENCES

- Azevedo, J. L.; Maccheroni Jr., W.; Pereira, J. O.; Araújo, W. L.; *Electron. J. Biotechnol.* **2000**, *3*, 1.
- Lee, J. H.; Hwang, S. R.; Lee, Y. H.; Kim, K.; Cho, K. M.; Lee, Y. B.; *Food Chem.* **2015**, *185*, 205.
- Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D.; *Science* **1993**, *260*, 5105.
- Strobel, G.; Hess, W. M.; *Chem. Biol. (Oxford, U. K.)* **1997**, *4*, 7.
- Santos, T. T.; Varavallo, M. A.; *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde* **2011**, *32*, 2.
- Silva, J. M.; Teixeira, R. R. O.; da Rocha, J. R.; dos Santos, T. M. C.; *International Journal of Agriculture, Environment and Bioresearch* **2017**, *2*, 1.
- Yan, J. F.; Broughton, S. J.; Yang, S. L.; Gange, A. C.; *Fungal Ecology* **2015**, *13*.
- Yadav, M.; Yadav, A.; Yadav, J. P.; *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2014**, *7*, 1.
- Scoures, D. A.; Ascencio, P. G. M.; Leão, G. M. A.; Rodrigues, K. M. T. M.; Pimenta, R. S.; *Journal of Bioenergy and Food Science* **2015**, *2*, 4.
- Bruneton, J.; *Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales*, 2^a ed., Acribia S.A.: Zaragoza, 2001.
- Mussi-Dias, V.; Araújo, A. C. O.; Silveira, S. F.; Rocabado, J. M. A.; Araújo, K. L.; *Braz. J. Med. Plants* **2012**, *14*, 2.
- Rubini, M. R.; Silva-Ribeiro, R. T.; Pomella, A. W. V.; Maki, C. S.; Araújo, W. L.; dos Santos, D. R.; *Int. J. Biol. Sci.* **2005**, *1*, 1.
- Santos, G. B. L.; Caetano, L. C.; Nascimento, A. R. S.; Ramos Sobrinho, R.; Silva, R. M. S.; da Silva, J. M.; dos Santos, T. M. C.; *Afr. J. Microbiol. Res.* **2017**, *11*, 17.
- Chapla, V. M.; Biasetto, C. R.; Araujo, A. R.; *Rev. Virtual Quim.* **2013**, *5*, 3.
- Jouda, J.; Tamoku, J.; Mbazoa, C. D.; Douala-Meli, C.; Sarkar, P.; Bag, P. K.; Bag, P. K.; Wandji, J.; *BMC Complementary Altern. Med.* **2016**, *16*, 1.
- Tan, Q.; Fang, P.; Ni, J.; Gao, F.; Chen, Q.; *Molecules* **2017**, *22*, 12.
- Rukachaisirikul, V.; Sommart, U.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J.; Kirikara, K.; *Phytochemistry* **2008**, *69*, 3.
- Adelin, E.; Servy, C.; Cortial, S.; Lévaïque, H.; Martin, M. T.; Retailleau, P.; Le Goff, G.; Bussaban, B.; Lumyong, S.; Ouazzani, J.; *Phytochemistry* **2011**, *72*, 18.
- Kornsakulkarn, J.; Somyong, W.; Sapothina, S.; Boonyuen, N.; Thongpanchang, C.; *Tetrahedron* **2015**, *71*, 48.
- Yang, H. Y.; Gao, Y. H.; Niu, D. Y.; Yang, L. Y.; Gao, X. M.; Du, G.; Hu, Q. F.; *Fitoterapia* **2013**, *91*.
- Hu, H. B.; Hu, H. B.; Luo, Y. F.; Wang, P.; Wang, W. J.; Wu, J. *Fitoterapia* **2018**, *131*.
- Fu, W.; Fu, W.; Xu, M.; Sun, K.; Hu, L.; Cao, W.; Dai, C.; Jia, Y.; *Chemosphere* **2018**, *203*.
- Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E.; *The handbook of metabolomics and metabolomics*, Elsevier: Amsterdam, 2007.
- Baynes, J. W.; Dominiczak, M. H.; *Bioquímica médica*, 4^a ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2015.
- Lima, S. M. S.; *Monography*, Universidade Federal de Alagoas, Brasil, 2010.
- Nogueira, R. C.; Paiva, R.; Lima, E. C.; Soares, G. A.; Oliveira, L. M.; Santos, B. R.; Emrich, E. B.; Castro, A. H. F.; *Rev. Bras. Plant. Med.* **2008**, *10*, 1.
- Pavia, D. L.; Lampman, G.; Kriz, G.; Vyvyan, J.; *Introdução à espectroscopia*, 2^a ed., Cengage Learning: São Paulo, 2015.
- Pomin, V. H. Em *Glycosylation*; Petrescu, S., ed.; InTech: London, 2012, cap. 4.
- Capozzi, F.; Laghi, L.; Belton, P. S.; *Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance*, Royal Society of Chemistry: London, 2015.
- Anet, F. A. L.; Park, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4.
- Somashekar, B. S.; Gowda, G. A. N.; Ramesha, A. R.; Khetrpal, C. L.; *Magn. Reson. Chem.* **2004**, *42*, 636.
- Govindaraju, V.; Young, K.; Maudsley, A. A.; *NMR Biomed.* **2000**, *13*, 129.
- Hinterholzer, A.; Stanojlovic, V.; Cabrele, C.; Schubert, M.; *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 14299.
- Corlett, E. K.; Blade, H.; Hughes, L. P.; Sidebottom, P. J.; Walker, D.; Walton, R. I.; Brown, S. P.; *CrystEngComm* **2019**, *21*, 3502.
- Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A.; *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512.
- <http://www.genome.jp/>, accessed in February 2020.
- Vuoristo, K. S.; Märs, A. E.; Sanders, J. P. M.; Eggink, G.; Weusthuis, R. A.; *Trends Biotechnol.* **2016**, *34*, 3.
- Evans, M. C.; Buchanan, B. B.; Arnon, D. I.; *Proceedings of the national academy of sciences of USA* **1966**, *55*, 4.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Princípios de bioquímica de Lehninger*, 6^a ed., Artmed: Porto Alegre, 2014.
- Cloarec, O.; Dumas, M. E.; Craig, A.; Barton, R. H.; Trygg, J.; Hudson, J.; Blancher, C.; Gauguier, D.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5.



APÊNDICE E

The effects of light on the metabolome of *Lasiodiplodia theobromae* mycelia cultured *in vitro*

Alessandre C. Crispim¹ • Shirley M. A. Crispim¹ • Jéssica R. Rocha¹ •

Jeferson S. Ursulino¹ • Adilson R. Sabino¹ • Roberto R. Sobrinho² •

Edson S. Bento¹ • Antônio E. G. Santana¹ • Luiz C. Caetano¹

✉ Alessandre C. Crispim

alessandre89@gmail.com

¹ Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Avenida Lourival Melo Mota s/n, Tabuleiro dos Martins, 57072-900, Maceió, AL, Brazil

² School of Plant Sciences, The University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA

Acknowledgements:

Funding: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Abstract

Introduction *Lasiodiplodia theobromae* is a well-known phytopathogen of economically important crops in subtropical and tropical regions and an excellent model for studying the influence of light on the biology and biochemistry of fungi.

Objectives The aim of the study was to identify and compare intracellular metabolites and metabolic networks in mycelial cultures of *L. theobromae* grown under a 12 natural light photoperiod or 24 h dark using a proton nuclear magnetic resonance-based metabolomics approach.

Methods Fungal cultures were grown in potato dextrose media and metabolites were extracted, by sonication with sodium phosphate buffered saline (pH = 6.0, 10% D₂O, 0.1 mM TSP), from mycelium samples collected every each week over a four-week period.

Results Multivariate analyses revealed that beta-hydroxybutyrate, acetoacetate, acetone, betaine, choline, glycerol and phosphocholine were positively correlated with light, whereas phenylacetate, leucine, isoleucine, valine and tyrosine were positively correlated with dark conditions. Light favored the oxidative degradation of valine, leucine and isoleucine, leading to the accumulation of choline, phosphocholine and betaine along with ketone bodies (ketogenesis). The accelerated growth and depletion of glucose stores induced by the photoperiod stimulated the endogenous synthesis of glucose (gluconeogenesis). The light-induced increase in the oxidative degradation of tyrosine led to the production of melanin and its subsequent release into the culture media.

Conclusions Ketogenesis, gluconeogenesis as well as the biosynthesis of choline, phosphocholine and betaine were considered discriminatory routes for light conditions. The light-sensing pathways were interlinked with fungal development, as verified by the increased

production of mycelia biomass without fruiting bodies, and stress signaling, as demonstrated by the increased production of pigments.

Keywords Ascomycota • Botryosphaeriaceae • Phytopathogen • Light response • Discriminatory pathway • Pigment production

1 Introduction

Although the kingdom Fungi is the largest group of eukaryotic organisms with an estimated 3.8 million members, only approximately 120,000 species have been described (Hawksworth and Lücking 2017). Such biodiversity represents an important source of primary and secondary metabolites that find application in medical, agricultural, industrial and environmental areas of biotechnology and is, therefore, of considerable socio-economic value to humankind (Adrio and Demain 2003; Lange 2010).

One of the most striking features of the fungi is their ability to adapt to different environments by releasing extracellular enzymes that degrade complex organic compounds into simple molecules that can be readily *assimilated during fungal development* (Gow and Gadd 1995; Maggi et al. 2013; Selbmann et al 2013). Among the key factors that affect spore germination, growth and reproduction of fungi are the quantity and quality of light, both of which vary according to season and geographical location. However, the biochemical and metabolic responses of fungi towards light are still not fully understood.

Members of the genus *Lasiodiplodia* (Ascomycota, Botryosphaeriaceae) are well-known pathogens of economically important subtropical and tropical crops, and are causative agents of so-called black-soot disease. Species of the fungus can also colonize plants endophytically and may or may not produce pycnidia (Pereira et al. 2006) *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl., a common phytopathogen with a wide host range, serves as an excellent model organism for studying the underlying biology and biochemistry of the different growth stages in response to light since the fungus is easy to isolate and develops readily during culture *in vitro*.

In the present study, a proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR)-based metabolomics approach has been employed to detect alterations in fungal metabolites and pathways in response

to changes in light. This technique offers many advantages over other analytical procedures, including the ability to quantify the more abundant compounds present in cell extracts without the need for elaborate sample preparation, to identify compounds with identical masses and to elucidate the dynamics of metabolite transformations and metabolic pathways (Markley et al. 2017)

The aim of the study was to compare the intracellular metabolites and metabolic networks in mycelia cultures of an entophytic form of *L. theobromae* incubated under dark and photoperiod conditions. To the best of our knowledge, the present study is the first to focus on the responses to light of the metabolome of an isolate of *L. theobromae* that does not produce fruiting bodies.

2 Materials and Methods

2.1 Culture of *L. theobromae*

Entophytic *L. theobromae* was isolated from the fruits of *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae), commonly known as the Brazilian pepper tree or aroeira-da-praia. The freshly harvested fruits were surface sterilized, cut into small fragments, deposited in Petri dishes containing potato-dextrose-agar (PDA) and kept at room temperature and 12h photoperiod until fungal outgrowth was observed. Hyphal tips originating from fruit fragments were transferred to new PDA medium and maintained at room temperature under the conditions described above for 30 days. The fungal species was identified by molecular genetics and the absence of fruiting bodies was confirmed by examination of cultures under the light microscope (data not shown).

The fungal culture were prepared by adding 30 mL of sterilized ultrapure water to a 7-day-old *theobromae* colonie, and transferring 50 μ L aliquots of the hyphal suspension to 64 glass tubes each containing 100 mL of potato-dextrose (PD) media. The culture were incubates at room

temperature on an orbital shaker at 160 rpm. The tubes were divided into two equal groups ($n = 32$), with one group maintained under dark conditions and the other submitted to a 12 h photoperiod of natural light. Biomasses of eight replicates from each treatment (dark and 12h photoperiod) were harvested by filtration at the end of the first, second, third and fourth week of growth, corresponding to different developmental stages of the mycelia. The corresponding mycelial masses were washed with sterilized ultrapure water, frozen in liquid nitrogen, pulverized in a ceramic mortar and pestle, lyophilized, weighed and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until required for analysis. The total dry biomass of mycelia produced each week, and under different culture conditions was calculated from the mean masses determined in eight replicate tubes.

2.2 Extraction of metabolites and sample preparation

The intracellular metabolites present in lyophilized mycelia were extracted by adding $800\text{ }\mu\text{L}$ of phosphate buffered saline (PBS; pH 6.0) containing 10% deuterium dioxide (D_2O ; 99% purity; Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA) and 0.1 mM sodium 3-(trimethylsilyl)propionate (TSP; Cambridge Isotope Laboratories) to 20 mg of fungal biomass and sonicating for 20 min. Cell debris was removed by centrifugation at 14000 rpm (Hettich zentrifugen, ROTANTA 460R) for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, the supernatant was transferred to a new tube, submitted to further centrifugation under the conditions described above, and an aliquot of the final extract transferred to a 5 mm NMR tube. To identify unambiguously the intracellular metabolites produced by mycelia over the four-week period under each culture condition, qualitative control (QC) samples were prepared comprising either $20\text{ }\mu\text{L}$ aliquots of each of the 32 methanolic extracts obtained from dark-grown cultures or $20\text{ }\mu\text{L}$ aliquots of each of the 32 extracts obtained from cultures maintained under the photoperiod.

2.3 NMR spectroscopy

Proton NMR analyses were performed in a Bruker UltraShield 400 MHz spectrometer (Billerica, MA, USA) equipped with a multinuclear 5 mm PABBO probe at 300 K. One-dimensional ^1H -NMR spectra were recorded using the *noesygppr1d* pulse sequence with suppression of the water resonance by pre-saturation. For each sample, 128 transients were collected into 64 K data points with a 90° pulse angle, 19.0 s relaxation delay, 0.05 s mixing time and 5.11 s acquisition time. Spectra were Fourier transformed, with automatic correction of phase and baseline, using Bruker TopSpinTM NMR data processing software version 3.5. Chemical shifts (δ) were corrected with reference to the TSP signal (0.00 ppm) and expressed in ppm. The identities of metabolite peaks and the assignments of signals were confirmed by comparison of one-dimensional and two-dimensional J-resolved spectral details of QC samples with data available in Human Metabolome Database (www.hmdb.ca).

2.4 Statistical analysis and chemometrics

The dry masses (g) of mycelia harvested at each growth stage were expressed as mean values \pm standard deviation ($n = 8$) and compared using *t*-tests with the level of statistical significance set at 5%. The ^1H -NMR data were pre-processed using Bruker AMIXTM software version 2018 by which spectra were aligned, normalized and the region corresponding to D_2O removed. A data matrix comprising 49 observations and 24971 variables each was generated and exported in the form of a text file to SIMCATM software version 14 (Umetrics, Umeå, Sweden). Data were submitted to Pareto scaling to minimize undesirable noise effects and submitted to multivariate analysis.

Principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA; Ward's linkage method) were carried out with the aim of classifying samples according to the developmental stage of the culture. Orthogonal partial least squares - discriminant analysis (OPLS-DA) was performed in order to examine the differential effects of light and dark on the metabolomic profile of *L. theobromae*. A summary of the main metabolic pathways operative in *L. theobromae* was constructed with the aid of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway maps (<https://www.genome.jp/kegg/>).

2.5 DNA extraction

Hyphal-tip culture was grown in PD media at 25 ± 2 °C for three days. The mycelial growth was collected using a sterile filter paper and washed with autoclaved distilled water. Total DNA was extracted from 20 mg of fresh mycelium according to Doyle and Doyle (1990), and stored at -20°C until use.

2.6 Amplification and sequencing

Total DNA was used as template for amplification, by Polymerase Chain Reaction (PCR), of the Internal Transcribed Spacer (ITS) and Elongation Factor 1 α (EF1 α) genomic regions using the primer pairs ITS1-5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'/ITS4-5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' and 728F-5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'/986R-5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC3-', respectively. The PCR reactions were performed as follows: 1X MyTaq MasterMix (Bioline®), 0.2 μ M of each forward and reverse primers, 1 μ L of total DNA (template), and nuclease-free water to a final volume of 25 μ L. The cycling conditions were: 2 min at 95°C as initial denaturation, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 20 s, annealing at 58°C for 30 s, extension at 72°C for 1 min, with a final extension step at 72°C for

5 min. The expected size fragments were bidirectionally Sanger sequenced at Macrogen Inc., (South Korea).

2.7 Sequences analysis and phylogeny

The nucleotide sequences were assembled and edited manually using Geneious v.8.1.9 (<https://www.geneious.com/>). Partial sequences were initially analyzed with the BLASTn algorithm (Altschul et al. 1990) and the NCBI-GenBank non-redundant nucleotide database to determine the species with which they share the greatest identity. To additionally support the species identification, a Bayesian phylogenetic tree was reconstructed using concatenated ITS and EF1 α partial sequences downloaded from GenBank and the isolate reported here. The Bayesian inference (BI) was carried out using MrBayes v.3.2 (Ronquist et al. 2012) through the CIPRES web portal (Miller et al. 2010), assuming a general time reversible (GTR) nucleotide substitution model with a gamma (G) model of rate heterogeneity and invariable (I) sites. The BI consisted of two replicates with four chains each for 10 million generations, and sampling every 1,000 generations. The first 2,500 trees per run were discarded as burn-in. The posterior probabilities (Rannala and Yang 1996) were determined from the majority-rule consensus tree reconstructed with the 15,000 remaining trees.

3 Results and Discussion

3.1 Species identification and mycelial growth

No fruiting bodies or spores were detected in any of the *in vitro* cultures of the endophytic isolate obtained from *S. terebinthifolia*. For precise species demarcation based on molecular data, the ITS and EF1 α regions were amplified and sequenced. The ITS and EF1 α partial nucleotide

sequences were 515 and 577 bp in length, respectively, and shared 99.5-100% identity with previously reported *L. theobromae* isolates in the BLASTn analysis. Additionally, our isolate grouped with other *L. theobromae* isolates in the Bayesian phylogenetic tree based on concatenated sequences (ITS and EF1 α) (study S26364 deposited in TreeBASE). Therefore, the new isolate was molecularly identified as *L. theobromae*. The partial sequences reported here were submitted to GenBank under accession nos. MT497468 and MT497469.

The quantities of dry mycelia produced each week by dark-grown *L. theobromae* cultures were significantly lower ($p < 0.001$), over the four-week period when compared to fungal cultures incubated under the photoperiod (Table 1).

TABLE 1 NEAR HERE

Light pink mycelia/media were observed in one-week old cultures maintained under the photoperiod, whereas those grown in dark conditions were essentially colorless (Fig. 1a). The production of extracellular pigments by four-week old cultures was confirmed by the grey to black and red coloration exhibited by mycelia and culture media, respectively, regardless of the light/dark regime applied, but the change in color was more intense in cultures grown under the photoperiod in comparison with those maintained in the dark (Fig. 1b).

FIGURE 1 NEAR HERE

The influence of light on the growth and sporulation of some species of fungi has long been recognized (Yusef and Allam 1967). A number of studies have shown that light of different wavelengths not only modulates fungal development but can also affect the production of intra- and extra-cellular secondary metabolites, especially pigments (Babitha et al. 2008; Velmurugan et al. 2010; Fanelli et al. 2012; Cheong 2016). Here the reduced coloration observed in cultures kept under dark conditions can be explained by fungal adaptation to ecological niches

considering that the production of pigments is a trait acquired during evolution as a protection against radiation (Shumacher 2017).

Fungi produce a wide range of pigments that may be classified as carotenoids and polyketides (such as melanin and aromatic phenols). Carotenoid pigments are synthesized *via* the mevalonate *pathway* that is present in all eukaryotes and are generally accumulated in lipid bodies that likely originate from the endoplasmic reticulum (Murphy and Vance 1999). However, in the absence of lipid bodies, as evidenced by the accumulation of phosphocholine in the cells, these pigments are released into the extracellular environment in hydrophilic form either by linking to a phosphate group, an amino acid or a carbohydrate.

The various types of melanin produced by fungi are generated by oxidative polymerization of phenolic or indolic intermediates and may either accumulate in cell walls or be released into the extracellular environment. In the phylum Ascomycota, melanin is typically synthesized by the pentaketide pathway in which the immediate precursor, 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN), is polymerized to DHN-melanin by a laccase. However, some fungal species produce melanin from tyrosine, which is converted into L-dihydroxyphenylalanine (DOPA) by the action of tyrosine 3-mono-oxygenase and subsequently oxidized to dopaquinone. This intermediate undergoes a number of oxidation, hydroxylation and decarboxylation reactions to yield dihydroxyindoles, which undergo spontaneous polymerization to form DOPA-melanin (Pombeiro-Sponchiado et al. 2017).

3.2 Metabolic fingerprinting of *L. theobromae* mycelia

The ¹H-NMR analysis of the QC samples and comparison of the chemical shifts with those catalogued in the Human Metabolome Database revealed that the qualitative profiles of the cultures were similar during the entire growth period regardless of the culture conditions (Fig. 2).

FIGURE 2 NEAR HERE

Prior to multivariate analysis, variables were scaled according to the Pareto method to reduce the importance of high values and partially preserve the structure of the data (Worley and Powers 2013). Analysis by PCA increased the interpretability of the large number of variables recorded by reducing the dimensionality of the data set with minimal loss of information. The first six principal components (PC1 to PC6) were calculated based on the variation in intracellular fungal metabolites over four weeks in culture. The model presented coefficients of observed variation ($R^2 = 0.78$) and predicted variation ($Q^2 = 0.66$) that were well within the limits ($R^2 \geq 0.7$ and $Q^2 \geq 0.4$) considered acceptable for goodness of fit in biological systems (Jiménez-Contreras et al. 2009).

PC1 and PC2 represented 38.7 and 15.1%, respectively, of the variability of the data set and together accounted for 53.8% of total variability. The two-dimensional PC1 vs. PC2 score plot (Fig. 3a) revealed that data points relating to mycelia harvested at the same stage of development clustered together in distinct quadrants irrespective of the light/dark regime applied. The clustered points indicate the metabolomes of the samples were similar, while dispersed points imply distinct differences in metabolomes. In the PC1 vs. PC2 loadings plot (Fig. 3b), data points were separated according to the weightings of the variables (metabolites). Positively correlated variables have approximately the same weighting value and, therefore, appear near each other, while negatively correlated variables appear diagonally opposite each other. The HCA dendrogram produced by the Ward method (Fig. 3c) complemented the results obtained by PCA and confirmed the formation of four groups of samples, but divided these groups into two subgroups showing that cultures grown under the photoperiod differed in their metabolism from those kept in the dark.

FIGURE 3 NEAR HERE

While PCA revealed the variation between groups of samples, the supervised OPLS-DA model captured the variation within groups and separated the variables (metabolites) that were significantly and positively associated with light or dark as shown in the scores plot (Fig. 4a). According to the S-line plot (Fig. 4b), the intracellular metabolites β -hydroxybutyrate, acetoacetate, acetone, betaine, choline, glycerol and phosphocholine were positively correlated with light, whereas phenylacetate, leucine, isoleucine, valine and tyrosine were positively correlated with dark conditions. The OPLS-DA model was verified by the leave-one-out cross-validation method, which gave the values $R^2 = 0.788$ and $Q^2 = 0.734$. In the general case, the predictive quality of a model is considered acceptable when $R^2 > Q^2$ and the difference between the two coefficients is less than 0.3. Larger differences between R^2 and Q^2 would indicate that the model suffered from overfitting (Hawkins et al. 2002; Veerasamy et al. 2011), but a difference <0.06 was observed in the present study. Moreover, although Q^2 was higher than 0.5, permutation tests were performed using the SIMCA software to ensure that the Q^2 **value of the model was significant as shown by random permutation of the** rows in the dataset (Fig. 4c).

FIGURE 4 NEAR HERE

Variations in the levels of the main intracellular metabolites during the growth cycle (Fig. 5) provided many insights into the effects of light on the metabolome of *L. theobromae*. For example, the concentrations of the branched-chain amino acids (BCAAs) valine, leucine and isoleucine were lower in cultures exposed to light in comparison with their dark-grown counterparts (Fig. 5a-c). Similar to plants, fungi are able to synthesize BCAAs, but in this study the BCAAs were also available in the PDA media (Roessner et al. 2000; Guedes et al. 2011). The explanation for the observed difference in levels of BCAAs is that light stimulated the complete oxidation of BCAAs in the mitochondria with generation of high amounts of energy in form of adenosine triphosphate (ATP) *via* oxidative phosphorylation. The first step in BCAA degradation

is formation of branched-chain 2-oxo acids, which suffer irreversible oxidative decarboxylation to acyl-CoA and, ultimately, acetyl-CoA, propionyl-CoA, acetoacetyl-CoA and acetoacetate (Binder 2010; Schertl et al. 2017). The concentrations of the ketone bodies, β -hydroxybutyrate and acetoacetate (Figs. 5j and 5k), were positively correlated and increased throughout the growth period regardless of culture conditions, but especially in cultures grown under light conditions. Apparently, both metabolites occurred in analogous proportions since β -hydroxybutyrate is formed by reduction of acetoacetate. Acetone is the breakdown product of acetoacetate, so its concentration also increased during the growth period (Fig. 5l). The decline in the levels of BCAAs, together with those of alanine (Fig. 5n), occurred concomitantly with augmentation of glucose (Fig. 5m), indicating that depletion of glucose stores during the light-induced accelerated growth triggered endogenous glucose production (gluconeogenesis).

FIGURE 5 NEAR HERE

The increased production of acyl-CoA resulting from increased BCAA oxidation under light conditions stimulated the biosynthesis of choline (Fig. 5g), which is a vital metabolite for the synthesis of phosphocholine in eukaryotes (Fig. 5i). The latter is a precursor as well as a degradation product of phosphatidylcholine (lecithin), a major component of phospholipids in eukaryotic membranes. In addition, phosphocholine can covalently bind to proteins and glycolipids in a wide spectrum of organisms, and such modified macromolecules play important functions including host defense and virulence (Richter et al. 2016). Hence, the larger mycelial biomass produced by cultures exposed to light rather than dark (Table 1) can be explained in terms of intensification of phospholipid biosynthesis and assembly of lipid bilayers in the fungal cells. Choline is also the precursor of betaine (*N,N,N*-trimethylglycine; Fig. 5h), a modified amino acid with strong osmoprotectant properties that confers tolerance to salinity, drought and other stresses (Lambou et al. 2013).

The concentration of phosphocholine was strongly but negatively correlated with the levels of its BCAA precursors. The production of phosphocholine peaked during the second week (especially in light-grown cultures) when growth reached its exponential phase and the synthesis of lipid membranes was maximal, but decreased from the third week onwards. However, the relative amounts of phosphocholine were higher than those of all other metabolites during the entire growth period, likely due to the degradation of glycerophospholipids as evidenced by the high concentration of glycerol (Fig. 5f) in the mycelia during the third and fourth weeks. Indeed, the concentration of glycerol was strongly and positively correlated with that of phosphocholine.

The levels of phenylacetate were much lower in cultures grown under the photoperiod compared with those maintained in the dark (Fig. 5d), mainly because fungi can employ this compound as an alternative carbon source when glucose stores are depleted, a situation that occurs more rapidly under light conditions with the escalation of mycelial growth. However, when glucose is plentiful, the degradation of phenylacetate is downregulated. The oxidation of phenylacetate in fungi usually proceeds via 2-hydroxyphenylacetate and homogentisate and subsequent conversion to acetate and fumarate. An alternative pathway for oxidation of phenylacetate is mediated by phenylacetate-CoA ligase resulting in conversion to benzylpenicillin, an antibiotic used by fungi as protection against bacteria (Middelhoven 1993, Jami et al. 2018).

Although light stimulates growth *via* upregulation of oxidative routes, it jeopardizes fungal survival by inducing formation and accumulation of highly reactive oxygen species including H_2O_2 and O_2^- that cause oxidative damage to biomolecules. As a protection against light-induced oxidative stress, some fungi produce pigments such as melanin that confer a dark brown coloration to the cells. Ultra-violet radiation stimulates melanogenesis by triggering

oxidative degradation of tyrosine and consequent polymerization of indolic intermediates (Calvo et al. 2002; Beltrán-García et al. 2014; Thabet et al. 2014; Zaidi et al. 2014). Regardless of their origins, melanin pigments have common structural characteristics that confer an ability to scavenge free radicals and provide natural antioxidant and protective functions under adverse conditions. There is also evidence suggesting that melanin is essential for zoopathogenic and phytopathogenic microorganisms by virtue of its antioxidant properties (Pombeiro-Sponchiado et al. 2017). The above provides an explanation of the lower levels of tyrosine in light-grown mycelia compared with their dark-grown counterparts (Fig. 5e) and signifies that this amino acid should be a discriminatory metabolite for dark conditions.

It is interesting to note that the levels of ethanol were high towards the end of the growth cycle regardless of the culture conditions (Fig. 5p). Ethanol is produced from pyruvate (Fig. 5o) in a two-step reaction involving decarboxylation by pyruvate decarboxylase with formation of acetaldehyde and subsequent reduction to ethanol catalyzed by NADH-dependent alcohol dehydrogenase.

3.3. Discriminatory primary pathways

The identification of the main intracellular metabolites by ¹H-NMR and subsequent multivariate analysis revealed the pathways that were most affected in *L. theobromae* cultures by changes in light conditions (Fig. 6). The exposure of fungal cultures to the photoperiod favored primarily oxidative pathways, particularly those involving degradation of BCAAs, leading to accumulation of phospholipid membrane components (choline, phosphocholine and betaine) and ketone bodies. The endogenous synthesis of glucose from non-carbohydrate substrates such as TCA cycle intermediates, alanine and glycerol was also stimulated by light.

Since ketogenesis and gluconeogenesis were upregulated in cultures grown under light conditions, these pathways can be considered discriminatory. Moreover, the biosynthesis of choline and phosphocholine from BCAAs could also be considered discriminatory since the levels of these metabolite increased significantly up to the second week in mycelial cultures exposed to light, following which they declined probably because of the synthesis of phospholipids and the self-assembly of lipid bilayers and vesicles. Interestingly, anaerobic glycolysis/fermentation was not influenced by light, since the levels of the end product (ethanol) were similar regardless of the culture conditions.

4. Conclusions

The data presented herein demonstrates the importance of light on the biology of *L. theobromae* and provide the groundwork for future studies on this important plant pathogen. ¹H-NMR coupled with PCA and OPLS-DA proved to be an excellent combination of tools for detection of metabolomic differences between *L. theobromae* cultures grown under light and dark conditions. The PC1 vs PC2 score plot demonstrated that differences in metabolism existed between groups, whereas the loading plot highlighted the metabolites that better expressed such differences. The light-sensing pathways were interlinked not only with respect to stress signaling, as demonstrated by the increased production of pigments that serve as protection against oxidative stress, but also with fungal development, as verified by the increased production of mycelia biomass without fruiting bodies. Further, choline, phosphocholine and betaine emerged as main discriminatory metabolites, and their accumulation may explain why this isolate is a non-producer of fruiting bodies and why the pigments were released into the media. The light-induced oxidation of tyrosine is an important finding since it suggests that *L. theobromae* cultures produce DOPA-melanin rather than DHN-melanin. In this context, cultures of *L. theobromae* could represent a

good source of natural pigments for cosmetic, pharmaceutical and food-processing industries since pigment production from microorganisms is considered to be more efficient and cost-effective than chemical synthesis.

Authors contribution Alexandre C. Crispim and Luiz C. Caetano conceived and planned the experiments. Shirley M. A. Crispim, Jéssica R. Rocha and Jeferson S. Ursulino carried out the experiments. Antônio E. G. Santana, Edson S. Bento, Adilson R. Sabino and Roberto R. Sobrinho contributed to the interpretation of the results. Alexandre C. Crispim wrote the manuscript. All authors read, provided critical feedback and approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethics approval This article does not contain any studies involving human or animal participants performed by any of the authors.

References

- Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology*, 6, 191-199. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0133-0>.
- Babitha, S., CARVAHLO, J. C., SOCCOL, C. R., PANDEY, A. (2008) Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 2671–2675. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9794-3>.

- Beltrán-García, M. J., Prado, F. M., Oliveira, M. S., Ortiz-Mendoza, D., Scolfo, A. C., Pessoa-Jr, A., et al. (2014). Singlet molecular oxygen generation by light-activated DHN-melanin of the fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in black sigatoka disease of bananas. *PloS One*, 9(3), e91616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091616>.
- Binder, S. (2010). Branched-chain amino acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book*, 8, e0137. <https://doi.org/10.1199/tab.0137>.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447-459. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002>.
- Cheong, K. K., Strub, C., Montet, D., Durand, N., Alter, P., Meile, J. C., et al. (2016). Effect of different light wavelengths on the growth and ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus westerdijkiae*. *Fungal Biology*, 120(5), 745-751. <https://doi.org/751.10.1016/j.funbio.2016.02.005>.
- Fanelli, F., Schmidt-Heydt, M., Haidukowski, M., Susca, A., Geisen R., Logrieco, A., et al. (2012). Influence of light on growth, conidiation and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Fungal Biology*, 116(2), 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.11.007>.
- Gow, N.A.R., & Gadd, G. M. (1995). *The Growing Fungus*. Heidelberg: Springer.
- Guedes, R. L. M., Prosdocime, F., Fernandes, G. R., Moura, L. K., Ribeiro, H. A. L., & Ortega, J. M. (2011). Amino acids biosynthesis and nitrogen assimilation pathways: a great genomic deletion during eukaryotes evolution. *BMC Genomics*, 12(Suppl. 4), S2. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-S4-S2>.

- Hawkins, D. M., Subhash, C. B., & Mills, D. (2002). Assessing model fit by cross-validation. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 43, 579–586.
<https://doi.org/10.1021/ci025626i>.
- Hawksworth, L. D., & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum*, 5(4), FUNK-0052-2016.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>.
- Jami, M. S., Martín, J. F., Berreiro, C., Domínguez-Santos, R., Vasco-Cárdenas, M. F., Pascual, M., et al. (2018). Catabolism of phenylacetic acid in *Penicillium rubens*. Proteome-wide analysis in response to the benzylpenicillin side chain precursor. *Journal of Proteomics*, 187, 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.08.006>.
- Jiménez-Contreras, E., Torres-Salinas, D., Moreno, R. B., Baños, R. R., & López-Cózar, E. D. (2009). Response surface methodology and its application in evaluating scientific activity. *Scientometrics*, 79(1), 201-218.
<https://doi.org/10.1007/s11192-009-0413-3>.
- Lambou, K., Pennati, A., Valsecchi, I., Tada, R., Sherman, S, Sato, H., et al. (2013). Pathway of glycine betaine biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 12(6), 853-863.
<https://doi.org/10.1128/EC.00348-12>.
- Lange, L. (2010). The importance of fungi for a more sustainable future on our planet. *Fungal Biology Reviews*, 24(3-4), 90-92. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.12.002>.
- Maggi, O., Tosi, S., Angelova, M., Lagostina, E., Fabbri, A. A., Lorenzo Pecoraro, L., et al. (2013). Adaptation of fungi, including yeasts, to cold environments. *Plant Biosystems*, 147(1), 247-258. <https://doi.org/10.1080/11263504.2012.753135>.

- Markley, J. L., Brüschweiler, R., Edison, A. S., Eghbalnia, H. R., Powers, R., Raftery, D., et al. (2017). The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 43, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001>.
- Middelhoven, W. J. (1993). Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeasts and yeast-like fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63, 125-144. <https://doi.org/10.1007/BF00872388>.
- Murphy, D. J., & Vance, J. (1999). Mechanism of lipid-body formation. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(3), 109-115. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01349-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01349-8).
- Pereira, A. L., Silva G. S., & Ribeiro V. Q. (2006). Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae* [Physiological, cultural and pathogenic characterization of different isolates of *Lasiodiplodia theobromae*]. *Fitopatologia Brasileira*, 31(6), 572-576. (in Portuguese) <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000600006>.
- Pombeiro-Sponchiado, S. R., Sousa, G. S., Andrade J. C. R., Lisboa, H. F., & Gonçalves, R. C. R. (2017). Production of melanin pigment by fungi and its biotechnological applications. In M. Blumenberg (Ed.), *Melanin* (pp. 47-75). London: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/67375>.
- Richter, K., Matheus, V., Fronius, M., Althaus, M., Hecker, A., Krasteva-Christ, G., et al. (2016). Phosphocholine - an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of $\alpha 9$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. *Scientific Reports*, 6, art. #28660. <https://doi.org/10.1038/srep28660>.

- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N., & Willmitzer, L. (2000). Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Journal*, 23(1), 131-142. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00774.x>.
- Schertl, P., Danne, L., & Braun, H. P. (2017). 3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase is involved in both, valine and isoleucine degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 175, 51-61. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00649>.
- Selbmann, L., Egidi, E., Isola, D., Onofri, S., Zucconi, L., Sybren de Hoog, G. , et al. (2013). Biodiversity, evolution and adaptation of fungi in extreme environments. *Plant Biosystems*, 147(1), 237-246. <https://doi.org/10.1080/11263504.2012.753134>.
- Schumacher, J., (2017). How light affects the life of *Botrytis*. *Fungal Genetics and Biology*, 106, 26-41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.06.002>.
- Thabet, S., Simonet, F., Lemaire, M., Guillard, C., & Cotton, P. (2014). Impact of photocatalysis on fungal cells: depiction of cellular and molecular effects on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7527-7535. <https://doi.org/10.1128/AEM.02416-14>.
- Veerasingam, R., Rajak, H., Jain, A., Sivadasan, S., Varghese, C. P., & Agrawal, R. K. (2011). Validation of QSAR models – strategies and importance. *International Journal of Drug Design and Discovery*, 2(3), 511-519.
- Velmurugan, P., Lee, Y. H., Venil, C. H., Lakshmanaperumalsamy, P, Chae, J. & Oh. BT. (2010). Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-production filamentous fungi in synthetic medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109(4), 346-350. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.10.003>.

- Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics*, *1*(1), 92-107. <https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092>.
- Yusef, H. M., & Allam, M. E. (1967). The effect of light on growth and sporulation of certain fungi. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, *33*, 81–89. <https://doi.org/10.1007/BF02053439>.
- Zaidi, K. U., Ali, A. S., Ali, S. A., & Naaz, I. (2014). Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochemistry Research International*, 2014, Art. # 854687. <https://doi.org/10.1155/2014/854687>.

Figure captions

Fig. 1 Cultures of *Lasiodiplodia theobromae* during (a) the first week and (b) the fourth week of growth. The cultures were grown under a 12 h photoperiod of natural light (L) or 24 h darkness (D)

Fig. 2 Typical one-dimensional $^1\text{H-NMR}$ spectra of qualitative control extracts from *Lasiodiplodia theobromae* cultures grown under (a) dark conditions and (b) 12 h photoperiod of natural light. Key to peak assignments: 1 - isoleucine, 2 - leucine, 3 - valine, 4 - β -hydroxybutyrate, 5 - ethanol, 6 - lactate, 7 - alanine, 8 - lysine, 9 - acetone, 10 - acetoacetate, 11 - n6-acetyl lysine, 12 - N-acetyl ornithine, 13-methionine, 14 - glutamate, 15 - succinate, 16 - pyruvate, 17 - glutamine, 18 - aspartate, 19 - methylguanidine, 20 - choline, 21- betaine, 22 - phosphocholine, 23 -methanol, 24 - glycerol, 25 - guanidoacetate, 26 - glucose-6-phosphate, 27 - glucose, 28 - trehalose, 29 - glucose-1-phosphate, 30 - UDP-glucose, 31 - uracil, 32-guanosine, 33 - fumarate, 34 - tyrosine, 35 - phenylacetate, 36 – histidine

Fig. 3 Principal component analysis (PCA) of the $^1\text{H-NMR}$ -derived metabolic profiles of *Lasiodiplodia theobromae* cultures: (a) PC1 vs. PC2 scores plot showing relationships among the 64 samples obtained from cultures exposed to 12 h photoperiod of natural light (L) and 24 h dark conditions (D); (b) loadings plot showing the correlation between variables (metabolites) in PC1 and PC2; (c) hierarchical cluster analysis (HCA) dendrogram showing the chemical relationships among the 64 samples: the cluster distance between two samples is a measure of similarity.

Fig. 4 Orthogonal partial least squares – discriminant analysis (OPLS-DA) of the $^1\text{H-NMR}$ -derived metabolic profiles of *Lasiodiplodia theobromae* cultures: (a) scores plot showing two separate groups, one containing metabolites produced by cultures exposed to a 12 h photoperiod

of natural light (L) and the other containing metabolites produced by cultures exposed to dark (D) conditions; (b) S-line plot showing the metabolites positively correlated with light and dark conditions ($R^2 = 0.788$ and $Q^2 = 0.734$); (c) predictive capacity of the OPLS-DA model as determined by the permutation test

Fig. 5 Relative concentrations of the endogenous discriminant metabolites produced by *Lasiodiplodia theobromae* cultures under dark (D) and 12h photoperiod of natural light (L) conditions

Fig. 6 The general scheme of metabolic pathways in *Lasiodiplodia theobromae* cultures showing the discriminant metabolites produced by oxidative reactions under dark ([blue](#)) and 12h photoperiod of natural light ([red](#)) conditions, and ethanol produced by reductive reactions ([pink](#)). The scheme was based on Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, 2019) pathway maps

Table 1 Dry masses of *Lasiodiplodia theobromae* mycelia obtained during the growth cycle under different culture conditions

Growth conditions	Growth stages (weeks)	Dry masses (g) ^a
12 h photoperiod of natural light	First	0.0882 ± 0.0214
	Second	0.1951 ± 0.0101
	Third	0.3284 ± 0.0106
	Fourth	0.4143 ± 0.0229
24 h dark	First	0.0433 ± 0.0164
	Second	0.1218 ± 0.0121
	Third	0.2178 ± 0.0167
	Fourth	0.3406 ± 0.0299

^a Mean values ± standard deviation ($n = 8$).

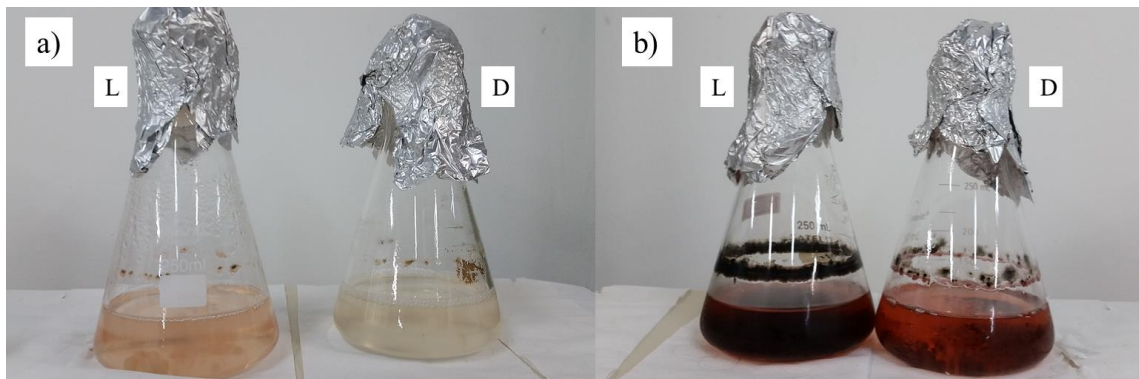


Figure 1

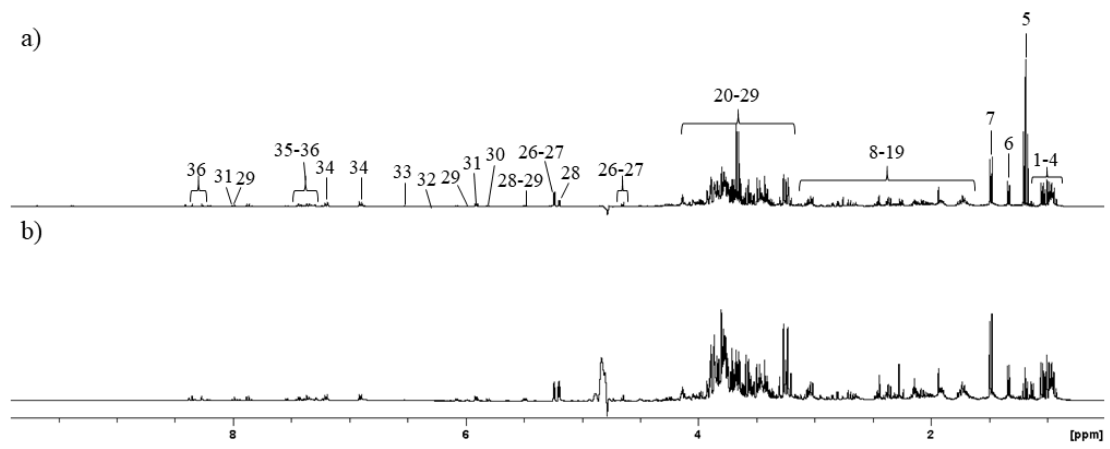


Figure 2

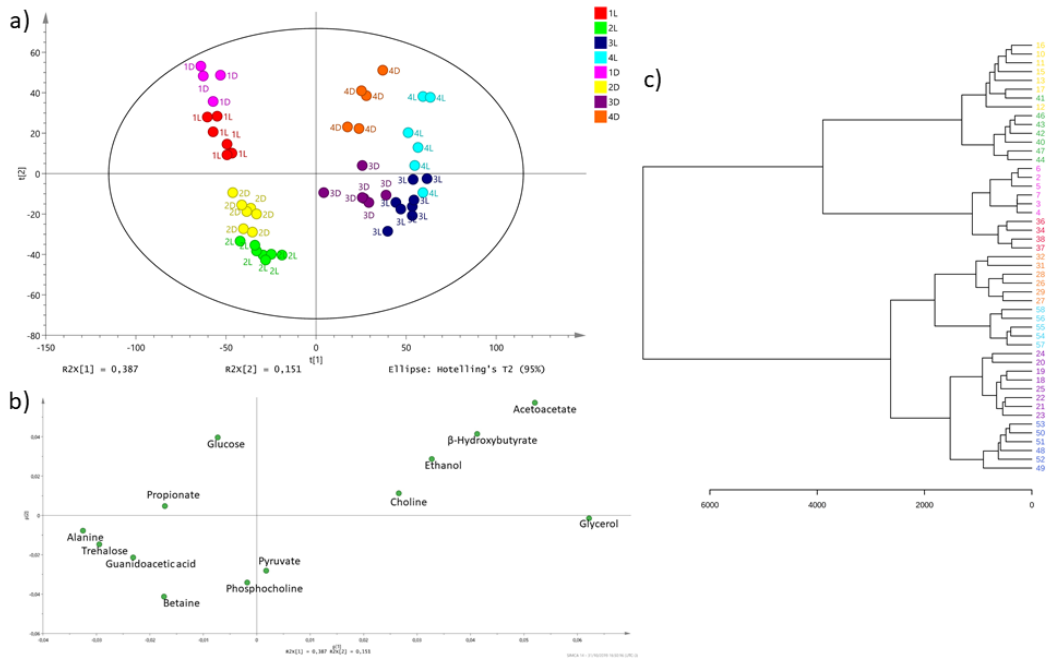


Figure 3

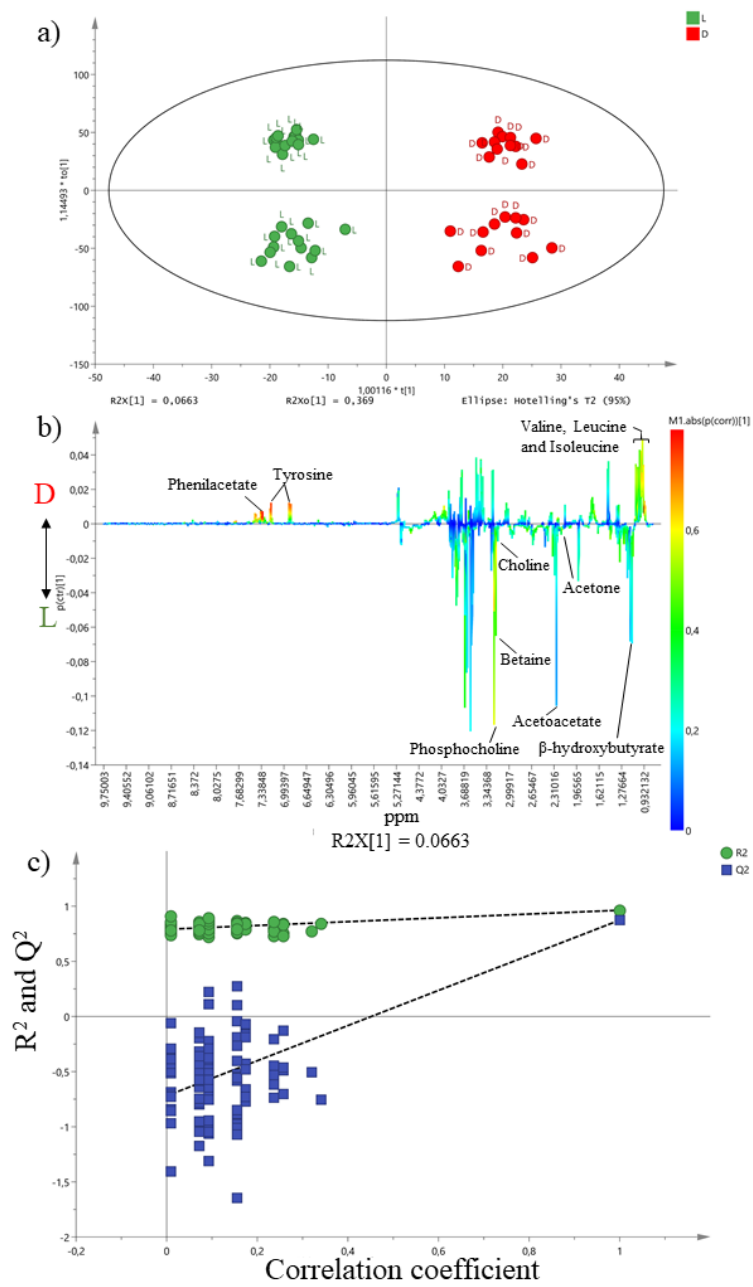


Figure 4

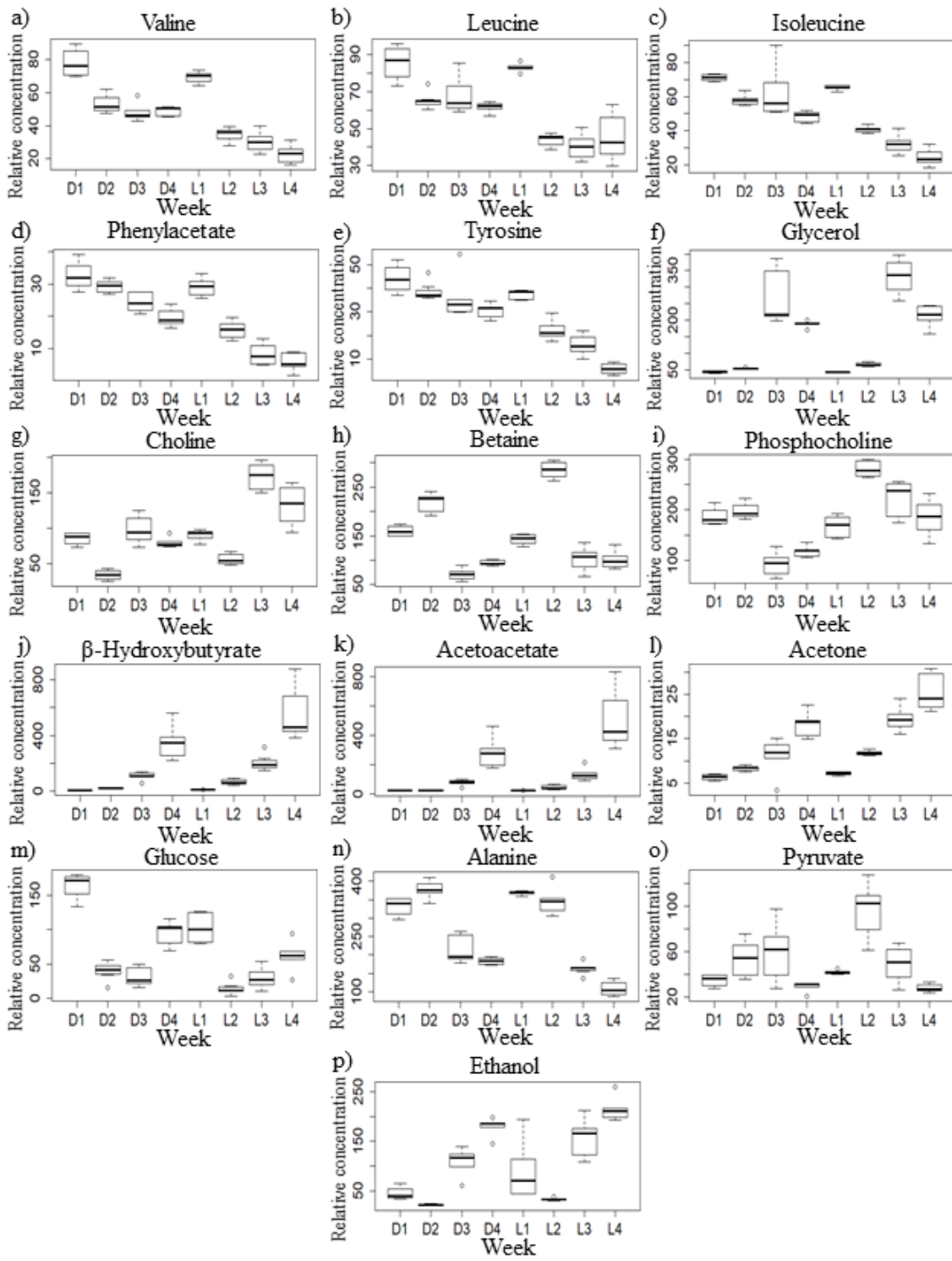


Figure 5

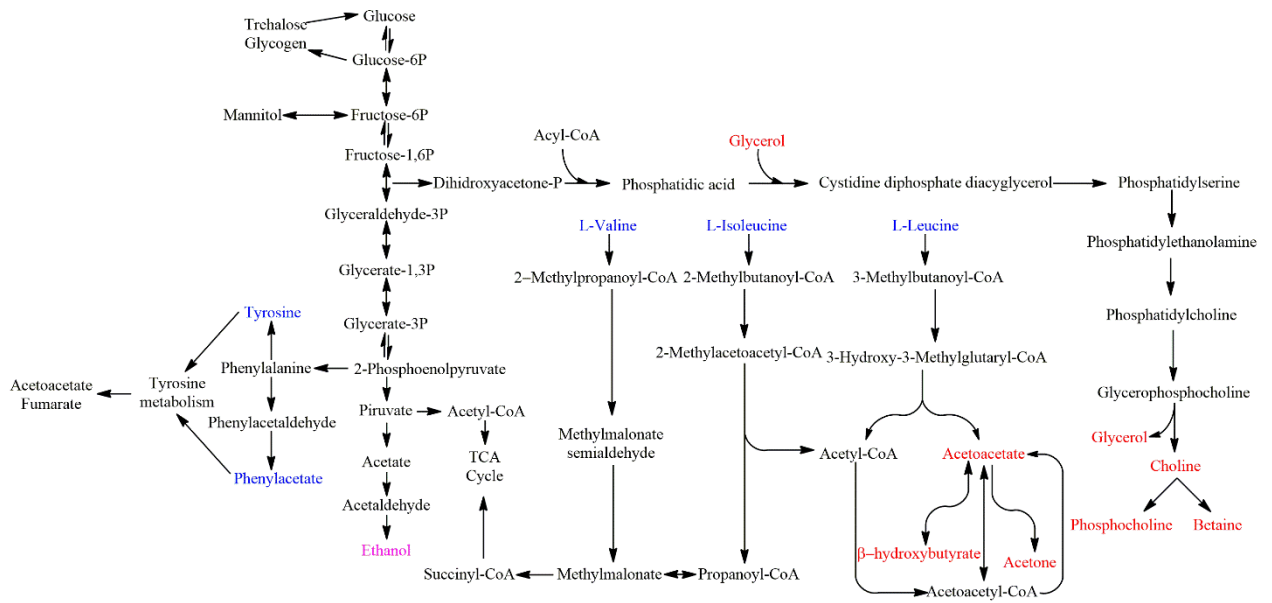


Figure 6