

Avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos

Assessment of the biotechnological potential of endophytic fungi

DOI:10.34117/bjdv8n5-033

Recebimento dos originais: 21/03/2022

Aceitação para publicação: 29/04/2022

Sthefani Nicole Frosi Pardo

Bacharela em Biotecnologia

Instituição: FS Fueling Sustainability

Endereço: Avenida das Indústrias, s/nº, Lucas do Rio Verde – MT

E-mail: sthefanifrosip@gmail.com

Gabrielle Ganzer Fernandes

Discente do Curso de Bacharelado em Biotecnologia

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Campus Avançado Lucas do Rio Verde (IFMT-CALRV)

Endereço: Av. Universitária, 1600 - Parque das Emas, Lucas do Rio Verde – MT

CEP: 78455-000

E-mail: gabrielleganzer@gmail.com

Virna Monique Sobral Lima

Discente do Curso Técnico em Biotecnologia

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Campus Avançado Lucas do Rio Verde (IFMT-CALRV)

Endereço: Av. Universitária, 1600 - Parque das Emas, Lucas do Rio Verde – MT

CEP: 78455-000

E-mail: v.sobral@estudante.ifmt.edu.br

Vanessa Mendes Rego

Doutora em Ecologia e Conservação da Biodiversidade

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Campus Avançado Lucas do Rio Verde (IFMT-CALRV)

Endereço: Av. Universitária, 1600 - Parque das Emas, Lucas do Rio Verde – MT

CEP: 78455-000

E-mail: vanessa.rego@ifmt.edu.br

William Pietro de Souza

Doutor em Biotecnologia e Biodiversidade

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Campus Avançado Lucas do Rio Verde (IFMT-CALRV)

Endereço: Av. Universitária, 1600 - Parque das Emas, Lucas do Rio Verde – MT

CEP: 78455-000

E-mail: william.pietro@ifmt.edu.br

Reginaldo Vicente Ribeiro

Doutor em Ciência da Saúde

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Campus Avançado Lucas do Rio Verde (IFMT-CALRV)Endereço: Av. Universitária, 1600 - Parque das Emas, Lucas do Rio Verde – MT
CEP: 78455-000

E-mail: reginaldo.ribeiro@ifmt.edu.br

RESUMO

Os fungos endofíticos são reconhecidos por sua imensa capacidade de produção de metabólitos que atuam como antimicrobianos, além de serem produtores de diversas enzimas extracelulares. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e enzimática de fungos endofíticos da coleção de microrganismos do IFMT - Campus Avançado de Lucas do Rio Verde. Ao todo foram testadas doze linhagens de fungos endofíticos, isolados da raiz de *Cyperus rotundus* (tiririca) e da folha de *Zea mays* (milho). Para o teste de atividade antibacteriana, utilizou-se o método de difusão em ágar e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) contra bactérias patogênicas gram-positivas: *Staphylococcus aureus* 25923, *Listeria monocytogenes*; e gram-negativas: *Escherichia coli* 25922, *Salmonella choleraesuis* 10708, *Helicobacter pylori* 43504, *Shigella flexneri* 12022. Utilizou-se as seguintes linhagens de fungos: *Lasiosphaeriaceae* sp R2B, *Lasiosphaeriaceae* sp R8E, *Talaromyces pinophilus* FEFM I, *Ceriporia alachuana* R9C, *Fusarium acutatum* T9E, *F. acutatum* R7C, *F. acutatum* R5A, *Trichoderma* sp. R4A, *Fusarium oxysporum* T2A, *F. oxysporum* T7C e *Fusarium solani* T1A e uma linhagem não identificada R9B. Para o primeiro ensaio, discos miceliais (± 7 mm) foram retirados e situados em placas com meio Mueller-Hinton inoculado com bactéria patogênica padronizada a 0,5 da escala de McFarland. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e a atividade foi determinada de acordo com a formação de halos de inibição. A determinação da CIM foi realizada a partir dos extratos fúngicos liofilizados nas concentrações de 0,16 a 20,00 mg/mL em microplacas de 96 poços, incubados a 37°C por 24 h, lidas em espectrofotômetro a 450 nm e reveladas com resazurina. A atividade enzimática foi determinada para as enzimas amilase e protease mediante a formação de halos de degradação de seus respectivos meios. Na avaliação da atividade antibacteriana pelo teste de difusão em ágar, dez isolados (FEFM I, R9C, T9E, R4A, R7C, R9B, T2A, R5A, T1A, T7C) apresentaram atividade contra *Helicobacter pylori* e oito (R2B, R9C, T9E, R7C, R9B, T2A, R5A, T1A) contra *Shigella flexneri*, com destaque para o fungo R9C que apresentou atividade contra quatro cepas de bactérias patogênicas utilizadas: *Salmonella choleraesuis*, *Helicobacter pylori*, *Shigella flexneri* e *Listeria monocytogenes*. Nenhuma concentração dos extratos liofilizados testados inibiram o crescimento das cepas patogênicas. Quanto à atividade enzimática, quatro isolados apresentaram atividade positiva e quatro fortemente positiva para amilase, sete isolados com atividade fortemente positiva e três positivos para atividade proteolítica. Entre os gêneros de fungos utilizados, *Fusarium* foi o que apresentou maior potencial biotecnológico, já que apresentou atividade antibacteriana e enzimática promissoras.

Palavras-chave: isolados endofíticos, antibacterianos, enzimas, metabólitos secundários.**ABSTRACT**

Endophytic fungi are recognized for their immense ability to produce metabolites that act as antimicrobials, besides being producers of several extracellular enzymes. Thus, the

objective of this work was to evaluate the antibacterial and enzymatic activity of endophytic fungi from the collection of microorganisms at the IFMT - Advanced Campus of Lucas do Rio Verde. Altogether, twelve strains of endophytic fungi were tested, isolated from the root of *Cyperus rotundus* (sedge) and from the leaf of *Zea mays* (corn). For the antibacterial activity test, the agar diffusion method and the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) against gram-positive pathogenic bacteria were used: *Staphylococcus aureus* 25923, *Listeria monocytogenes*; and gram-negative: *Escherichia coli* 25922, *Salmonella choleraesuis* 10708, *Helicobacter pylori* 43504, *Shigella flexneri* 12022. The following fungal strains were used: *Lasiochaetium* sp. R2B, *Lasiochaetium* sp. R8E, *Talaromyces pinophilus* FEFM I, *Ceriporia alachuana* R9C, *Fusarium acutatum* T9E, *F. acutatum* R7C, *F. acutatum* R5A, *Trichoderma* sp. R4A, *Fusarium oxysporum* T2A, *F. oxysporum* T7C and *Fusarium solani* T1A and an unidentified strain R9B. For the first assay, mycelial discs (± 7 mm) were removed and placed on plates with Mueller-Hinton medium inoculated with pathogenic bacteria standardized at 0.5 McFarland scale. The plates were incubated at 37°C for 24 h and the activity was determined according to the formation of inhibition halos. The determination of MIC was made from lyophilized fungal extracts, tested at concentrations of 20 - 0.16 mg/mL in microplates of 96 wells, incubated at 37°C for 24 h, read in a spectrophotometer at 450 nm and revealed with resazurin. Enzyme activity was determined for amylase and protease enzymes through the formation of degradation halos of their respective media. In the evaluation of antibacterial activity by the agar diffusion test, ten isolates (FEFM I, R9C, T9E, R4A, R7C, R9B, T2A, R5A, T1A, T7C) showed activity against *Helicobacter pylori* and eight (R2B, R9C, T9E, R7C, R9B, T2A, R5A, T1A) against *Shigella flexneri*, with emphasis on the fungus R9C that showed activity against four strains of pathogenic bacteria used: *Salmonella choleraesuis*, *Helicobacter pylori*, *Shigella flexneri* and *Listeria monocytogenes*. No concentration of the lyophilized extracts tested inhibited the growth of pathogenic strains. As for the enzymatic activity, four isolates showed positive activity and four strongly positive for amylase, seven isolates with strongly positive activity and three positive for proteolytic activity. Among the genera of fungi used, *Fusarium* was the one that presented the greatest biotechnological potential, since it showed promising antibacterial and enzymatic activity.

Keywords: endophytic isolates, antibacterials, enzymes, secondary metabolites.

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos endofíticos podem ser definidos, de maneira geral, como aqueles que são encontrados no interior das plantas, ou seja, órgãos e tecidos vegetais como folhas, caules e raízes, sem apresentar danos ao seu hospedeiro (JALGAONWALA et al., 2014; PAMPHILE et al., 2017). Estes microrganismos chegam aos tecidos vegetais por diversas aberturas naturais ou artificiais, como estômatos ou ferimentos nos tecidos e podem colonizar diversos tecidos vegetais (NETO SÁ PEIXOTO et al., 2004).

Pamphile et al. (2017) menciona que estes endófitos são resultado de uma relação mutualista evolutiva, onde existe uma troca de benefícios na qual nutrientes e proteção são destinados aos microrganismos e a planta é beneficiada pela resistência a

fitopatogênicos, adaptação a diversos ambientes, tolerância ao estresse, entre outros, devido a produção de uma variedade de metabólitos por parte dos microrganismos endófitos.

A produção de compostos bioativos pode variar de acordo com as condições de crescimento do microrganismo, a espécie do hospedeiro, seu genótipo e do ambiente sugerindo uma condição controlada por genes de ambos envolvidos, mas regulada de acordo com o ambiente (DANTAS et al., 2021).

Nesse sentido, os fungos endofíticos são responsáveis pela produção de uma diversidade de substâncias ativas que representam um ganho comercial, essas moléculas podem ser exploradas para a produção de fármacos com diversas finalidades dada à variedade de atividades biológicas que outorga como: propriedade antimicrobiana, antioxidante, antiviral, anticancerígena, citotóxica, imunossupressora, neuroprotetora, antiparasitária e antidiabética; além da extração de enzimas de interesse industrial e biotecnológico (CHAPLA et al., 2013; PAMPHILE et al., 2017).

Os compostos naturais que apresentam estas atividades são resultado do metabolismo fúngico e a produção de metabólitos primários e secundários, onde estes últimos são mais explorados na biotecnologia. No primeiro grupo encontram-se as substâncias consideradas essenciais para a manutenção da vida do fungo, produzidos ao longo do crescimento do microrganismo e utilizado principalmente em processos industriais, alimentícios e de ração. Já os metabólitos secundários por serem compostos extracelulares sintetizados na fase estacionária de crescimento e diferenciação do fungo, apresentam atividades antibióticas, imunossupressoras e tóxicas, revelando seu alto potencial biotecnológico, especialmente na indústria farmacêutica (PAMPHILE et al., 2017).

A partir da descoberta e isolamento da penicilina de fungos do gênero *Penicillium*, o interesse por metabólitos oriundos destes microrganismos vem crescendo cada vez mais. Além da penicilina, outros metabólitos fúngicos de importância encontra-se o taxol utilizado como anticancerígeno foi isolado primeiramente do endófito *Talaromyces andreanae* e logo encontrado em outros endófitos (CHAPLA et al., 2013; PAMPHILE et al., 2017), e um lipopeptídeo antimicótico conhecido como crypyocandina (STROBEL et al., 1999). Fármacos antimicrobianos frequentemente utilizados são derivados de fungos, envolvendo além da classe das penicilinas, as cefalosporinas (CHAPLA et al., 2013). Devido a sua diversidade vários compostos ativos de interesse farmacológico podem ser produzidos com menores impactos ambientais e econômicos, além de apresentar uma produtividade e rentabilidade de 73% maior quando comparado a metabólitos produzidos

por outros microrganismos ou compostos gerados de maneira sintética (FORTKAMP, 2018).

Ademais, além de produzir compostos com atividade antibacteriana os fungos se destacam na produção de enzimas com aplicação industrial. Esses compostos são biocatalizadores, normalmente constituídos de proteínas, capazes de acelerar a velocidade das reações químicas e que podem ser utilizadas reduzindo custos em metodologias analíticas, levando melhorias em eficiência e tempo gasto em processos industriais, além da fabricação de produtos tecnológicos de melhor qualidade (FELBER et al., 2019; ORLANDELLI et al., 2012).

Atualmente, as enzimas obtidas de origem microbiana apresentam maior potencial devido a facilidade de produção, graças a possibilidade de cultivo em grande escala e em um tempo relativamente curto, além do uso de substratos de fácil acesso e baixo valor de mercado. Entre as enzimas produzidas por fungos e com aplicação industrial, pode-se mencionar a β -glucanase por *Talaromyces emersonii*; celulases, xilanases e aminopeptidases por espécies do gênero *Trichoderma*; glucoamilases, proteases e lipases por fungos *Rhizopus* (FERREIRA et al., 2009; ORLANDELLI et al., 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e enzimática de fungos endofíticos isolados de raízes de *Cyperus rotundus* (Tiririca) e de folhas de *Zea mays* (Milho).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ISOLADOS FÚNGICOS

Os isolados de fungos endofíticos utilizados neste trabalho foram obtidos da micoteca do Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Mato Grosso (IFMT) - Campus Avançado de Lucas do Rio Verde (IFMT-CALRV), as linhagens endofíticas foram isoladas a partir do tecido da raiz da planta *Cyperus rotundus* L. (Tiririca) e da folha de *Zea mays* (Milho).

Foram utilizadas 12 linhagens, sendo que 11 foram identificadas com base no sequenciamento da região ITS (WHITE et al., 1990) e foram designadas nomenclaturas aos fungos endofíticos isolados (Tabela 1). Destes, somente o fungo FEFM I foi isolado a partir da folha de milho.

Tabela 1. Linhagens de fungos endofíticos utilizados

Linhagem	Órgão vegetal	Hospedeiro
<i>Lasiosphaeriaceae</i> sp. R2B	Raiz	<i>Cyperus rotundus</i>
<i>Talaromyces pinophilus</i> FEFM I	Folha	<i>Zeya mays</i>
<i>Ceriporia alachuana</i> R9C	Raiz	<i>Cyperus rotundus</i>
<i>Fusarium acutatum</i> T9E	Raiz	<i>Cyperus rotundus</i>
<i>Trichoderma</i> sp. R4A	Raiz	<i>Cyperus rotundus</i>
<i>Lasiosphaeriaceae</i> sp. R8E	Raiz	<i>Cyperus rotundus</i>
<i>Fusarium acutatum</i> R7C	Raiz	<i>Cyperus rotundus</i>
Não identificado R9B	Raiz	<i>Cyperus rotundus</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> T2A	Raiz	<i>Cyperus rotundus</i>
<i>Fusarium acutatum</i> R5A	Raiz	<i>Cyperus rotundus</i>
<i>Fusarium solani</i> T1A	Raiz	<i>Cyperus rotundus</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> T7C	Raiz	<i>Cyperus rotundus</i>

Para sua reativação, as linhagens de fungos endofíticos foram inoculados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) contendo antibiótico para evitar o crescimento de bactérias e incubados a 28°C ± 2 durante 14 dias.

2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Nos ensaios de avaliação da atividade antibacteriana foram testadas as seguintes bactérias patogênicas gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022); e gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Listeria monocytogenes* retirada do acervo do laboratório de microbiologia do IFMT - LRV. As bactérias foram inoculadas em caldo BHI a 37°C durante 24 horas e padronizadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland, sendo confirmada por leitura em espectrofotômetro a 450nm.

2.2.1 Difusão em ágar

Para este teste foi utilizada a metodologia estabelecida por Ichikawa et al. (1971), com algumas modificações. Este ensaio se baseia em expor um inóculo patogênico frente a uma substância bioativa de outro microrganismo em meio de cultura sólido, relacionando o tamanho do halo de inibição com a concentração dos antimicrobianos

difundidos no meio de cultivo. Inicialmente os isolados fúngicos foram inoculados em meio BDA durante o período de 7 - 21 dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$. Como controle positivo utilizou-se discos de papel com cloranfenicol ($30 \mu\text{g}/\text{disco}$) e como controle negativo, discos de ágar nutriente estéril ($\pm 7\text{mm}$). Assim, $150 \mu\text{L}$ do inóculo bacteriano padronizado foi distribuído de forma homogênea em toda a superfície da placa, acrescida de discos de micélio ($\pm 7 \text{ mm}$) contendo os isolados de fungos, controle positivo e negativo. As placas foram colocadas na geladeira a 4°C por 4 horas. Após este período, as placas foram incubadas por um dia a 37°C .

A capacidade de inibir o crescimento bacteriano foi verificada através da formação de halos ao redor dos discos, sendo os diâmetros dos halos mensurado em mm, com auxílio de paquímetro. O experimento foi realizado em triplicata.

2.2.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Neste ensaio, utilizou-se extratos obtidos das linhagens de fungos, conforme metodologia preconizada por Oliveira (2013), com algumas alterações. Para isso, os isolados fúngicos foram previamente inoculados em meio BDA e incubados a 27°C durante 14 dias, seguido pela retirada de 3 discos miceliais ($\pm 7\text{mm}$) de cada fungo, que foram inoculados em 50mL de caldo Muller-Hinton (MH) e incubados a 150 rpm a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 dias. Após este período, o meio inoculado foi centrifugado a 4.100 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado em filtros de seringa de $0,45 \mu\text{m}$, liofilizados e ressuspensos em solução salina $0,85\%$ estéril até obter a concentração de 20 mg/mL .

O teste ocorreu seguindo orientações do protocolo preconizado por CLSI (2008) e CLSI (2015). Em microplacas de polietileno de 96 poços, foram adicionados inicialmente $100 \mu\text{L}$ de caldo MH em cada poço, exceto na coluna 12, que recebeu $200 \mu\text{L}$ de caldo MH (controle de esterilidade). O controle negativo foi realizado na coluna 1 (meio de cultura + inóculo bacteriano); o controle positivo na coluna 11 (meio de cultura + $100 \mu\text{L}$ de suspensão bacteriana + $100\mu\text{L}$ de cloranfenicol ($0,2 \text{ mg/mL}$)). Os poços situados entre as colunas de 2 a 10 receberam o meio de cultura e $100\mu\text{L}$ dos extratos fúngicos. As concentrações testadas foram $0,156$; $0,312$; $0,625$; $1,25$; $2,5$; 5 ; 10 e 20 mg/mL (Quadro 1). Ao final da montagem das diluições dos extratos fúngicos, adicionou-se $100 \mu\text{L}$ de suspensão bacteriana.

A placa foi incubada a 37°C durante 24 horas para controle de esterilidade e depois armazenada na geladeira de material estéril por no máximo um dia.

Quadro 1. Esquema layout de amostras situadas nos poços das microplacas.

Concentração (Extratos)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
20 mg/mL	A	CC	E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	ABT	CE
10 mg/mL	B	CC	E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	ABT	CE
5 mg/mL	C	CC	E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	ABT	CE
2,5 mg/mL	D	CC	E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	ABT	CE
1,25 mg/mL	E	CC	E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	ABT	CE
0,625 mg/mL	F	CC	E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	ABT	CE
0,312 mg/mL	G	CC	E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	ABT	CE
0,156 mg/mL	H	CC	E1	E1	E1	E2	E2	E2	E3	E3	E3	ABT	CE

*CC: Controle de crescimento (meio de cultivo + inóculo); ABT: Cloranfenicol com concentração inicial de 0,2 mg/mL; CE: Controle de esterilidade (meio de cultivo); E1, E2, e E3: Extratos fúngicos testados (triplicata).

Paralelamente, foi preparada uma microplaca de cor colocando 100 µL de caldo Mueller-Hinton em cada poço e inicialmente 100 µL de cada extrato a 20 mg/mL, logo, a diluição seriada sucedeu da mesma maneira que na placa teste.

Todas as colunas participaram da diluição seriada, com exceção do controle de crescimento e esterilidade, para chegar nas concentrações desejadas. Na primeira fila, foi pipetado 100 µL de cada extrato, e 100 µL do antibiótico em seus respectivos poços. Em seguida, todas as microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Os resultados foram obtidos em leitor de microplaca (Diatek, DR-200B) a 450 nm. Por fim, 30 µL de resazurina 100 µg/mL foi adicionado em cada poço e a microplaca foi incubada novamente a 37°C por 2 horas, seguido por leitura visual. O teste foi realizado em triplicata.

A porcentagem de inibição do crescimento foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\% = 1 - [(Abs\ teste - Abs\ cor) / (Abs\ cc - Abs\ ce)] * 100$$

2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS FUNGOS

Para a avaliação da atividade enzimática dos fungos, foi utilizada a metodologia descrita por Hankin e Anagnostaki (1975) com algumas modificações.

2.3.1 Atividade amilolítica

O meio de cultura para a avaliar a atividade amilolítica consistiu de duas soluções: A (0,01g ZnSO₄·7H₂O; 0,005g CuSO₄·5H₂O; 1g K₂HPO₄; 2g NaNO₃; 0,5g KCl; 0,01g MgSO₄·7H₂O e 15 g ágar em 500 mL de água destilada) e a B (10g de amido e dissolvido em 500 mL de água destilada). As soluções foram autoclavadas separadamente e homogeneizadas no momento do plaqueamento.

Após o plaqueamento do meio, um disco de micélio (± 7 mm) de cada fungo foi colocado no centro da placa e incubado a 37°C ± 1 durante 4-7 dias. O teste foi realizado em triplicata. Uma solução de lugol 1% foi utilizada para visualização do halo. Os diâmetros do crescimento do micélio e do halo formado foram determinados com o paquímetro.

2.3.2 Atividade proteolítica

Para a verificação da atividade proteolítica, também foram preparadas duas soluções (A e B), sendo que a solução A é a mesma utilizada no meio de cultura para atividade amilolítica (solução A). A solução B foi preparada com 10g de leite desnatado em 500 mL de água destilada. Ambas foram autoclavadas e homogeneizadas durante plaqueamento. Em seguida, discos miceliais (± 7 mm) foram inoculados e incubados a 37°C entre 4 a 7 dias. O halo formado e o crescimento do fungo foram mensurados com paquímetro.

2.3.3 Determinação da atividade enzimática

Para determinação da atividade enzimática (Pz) utilizou-se a metodologia utilizada por Cuzzi et al. (2011) que consiste na razão entre a média do diâmetro da colônia (dc) e a média do diâmetro da colônia mais a área formada pelo halo (dcp).

$$Pz = dc/dcp$$

Assim, os resultados obtidos foram classificados como fortemente positivos quando $Pz < 0,64$, positivos $0,64 = Pz < 1$ e como negativos $Pz=1$.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA) e da aplicação do teste de Tukey com uma probabilidade de 5% com o auxílio do programa computacional Graphpad Prisma 8.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DIFUSÃO EM ÁGAR

Das doze linhagens de fungos endofíticos utilizados no teste, onze apresentaram ação inibitória em pelo menos para uma bactéria patogênica testada, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade antibacteriana de isolados de fungos endofíticos por difusão em ágar.

Tratamentos	Microrganismos testados					
	<i>Ec</i>	<i>Sa</i>	<i>Sc</i>	<i>Lm</i>	<i>Ha</i>	<i>Sf</i>
	Halos de inibição (mm)					
<i>Lasiochaeriales</i> sp. R2B	-	-	-	-	-	14,76±2,13
<i>Talaromyces pinophilus</i> FEFM I	-	19,29±3,85	-	-	22,91±1,98	-
<i>Ceriporia alachuana</i> R9C	-	-	12,18±4,88	14,88±2,03	15,35±0,24	19,14±2,16
<i>Usarium acutatum</i> T9E	-	-	12,16±1,46	-	19,74±0,50	23,13±1,17
<i>Trichoderma</i> sp. R4A	-	-	-	-	13,39±1,10	-
<i>Lasiochaeriales</i> sp. R8E	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium acutatum</i> R7C	-	-	-	-	15,33±1,25	18,18±2,12
Não identificado R9B	-	-	-	-	12,58±1,44	15,26±1,60
<i>Fusarium oxysporum</i> T2A	-	-	-	19,11±1,60	16,75±1,05	19,43±2,44
<i>Fusarium acutatum</i> R5A	-	-	-	-	19,94±3,88	15,62±2,20
<i>Fusarium solhai</i> T1A	-	-	-	25,95±1,91	15,54±1,98	15,27±3,29
<i>Fusarium oxysporum</i> T7C	-	-	-	-	17,60±1,36	-
Cloranfenicol	34,17±2,26	35,50±2,87	30,86±2,89	36,89±1,42	36,49±1,40	35,77±2,66

**Ec*: *Escherichia coli*; *Sa*: *Staphylococcus aureus*; *Sc*: *Salmonella choleraesuis*; *Lm*: *Listeria monocytogenes*; *Hp*: *Helicobacter pylori*; *Sf*: *Shigella flexneri*.

Verificou-se que nenhuma linhagem apresentou atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*. Em contrapartida, as linhagens FEFM I, R9C, T9E, R4A, R7C, R9B, T2A, R5A, T1A e T7C apresentaram atividade contra *Helicobacter pylori* (Figura 1), bactéria gram-negativa que pode causar diversas afecções estomacais, tais como gastrite, úlceras pépticas e câncer (BARBOSA; SCHINONNI, 2011).

Figura 1. Halos de inibição dos fungos endofíticos em *Helicobacter pylori*.



As linhagens, R2B, R9C, R9B, T9E, R7C, T2A, R5A e T1A, por sua vez, apresentaram formação de halo inibitório contra cepa patogênica *Shigella flexneri*. Para a bactéria *Listeria monocytogenes* apenas as linhagens R9C, T2A e T1A apresentaram atividade e R9C e T9E formaram halo inibitório para *Salmonella choleraesuis*. A linhagem FEMF I foi a única em apresentar atividade contra *Staphylococcus aureus*.

A baixa inibição em *S. choleraesuis* e a inibição nula de *E. coli* quando comparadas aos inóculos gram-positivos pode estar relacionada com a diferença morfológica existente entre esses dois grupos, uma vez que bactérias gram-negativas possuem em sua parede celular e membrana externa muito mais complexa que dificulta a ação antibacteriana (LOPEZ, 2011).

A atividade antibacteriana observada no teste possivelmente tem relação com os metabólitos secundários produzidos pelos fungos testados. Estudos relatam que o gênero *Trichoderma* possui uma ampla gama de produção de compostos antibacterianos, incluindo poliquetídicos e terpenos voláteis (OLIVEIRA, 2019). Phupiewkham et al. (2015) mencionam que os peptaboils, glicotoxina e gliovirina como os responsáveis pela ação antibacteriana, além disso, outras substâncias como tricodermina, viridina, ácido

harziânico e sideróforos tem ação inibitória contra bactérias (TIJERINO et al., 2011, ZEILINGER et al., 2016).

Neste estudo, as linhagens do gênero *Fusarium* apresentaram atividade antimicrobiana. Estudos mostraram que o gênero *Fusarium* produzem metabólitos de interesse biotecnológico, como observado por Kyekyeku et al. (2017) que caracterizaram quimicamente alguns metabólitos secundários provenientes de *Fusarium solani*, encontrando compostos análogos à fusarina C. Além deste, as micotoxinas beauvericina, fusaproliferinam e enniatinas podem ser encontradas em *Fusarium* (LUZ et al., 2017). Entre os compostos citados, fusarina C e beauvericina se destacam por suas propriedades antibacterianas.

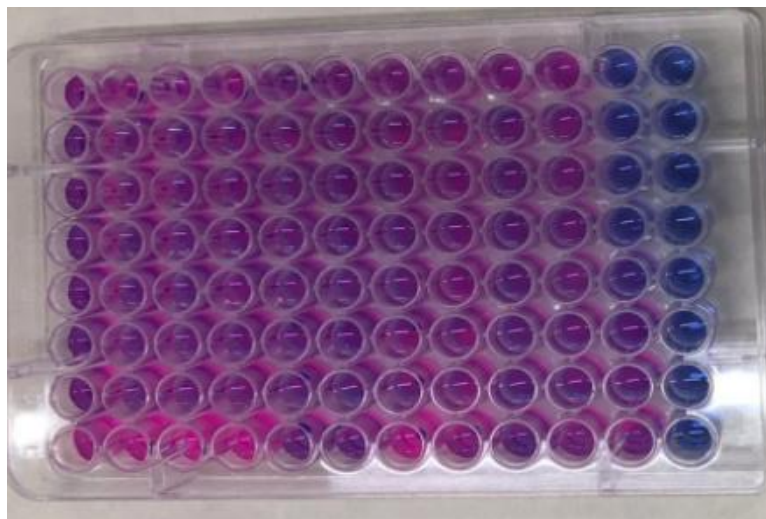
De acordo com a literatura, além dos compostos citados acima os fungos endofíticos testados também são capazes de sintetizar vários outros metabólitos secundários que podem estar relacionados com ação antimicrobiana, tais como terpenóides, alcalóides, fenóis, quinonas, isocumarinas, lactonas, flavonóides, xantonas, entre outros. As diversas reações biossintéticas e a disponibilidade de diferentes precursores contribuem na variedade de compostos químicos formados (SPECIAN et al., 2014). Chapla e colaboradores (2013) trazem em seu trabalho um compilado de resultados obtidos em diversos projetos envolvendo a ação biológica de metabólitos oriundos de fungos endofíticos, indicando a presença de terpenos (ex: citocalasinas), isocumarinas, sesquiterpenos, benzopiranos, tetralonas, benzoaldeídos inéditos, griseofulvina e periconicinas, e responsabilizando estes compostos principalmente pelas propriedades antibacterianas, antitumorais, fitotóxicas e como inibidores de protease.

Devido à complexidade da interação entre planta-fungo endofítico, diversos metabólitos secundários são expressos, dando vantagens em situações que o microrganismo deve competir com outro, gerando compostos que apresentam efeitos tóxicos ou inibitórios, e que são aproveitados na indústria farmacêutica. Lopez (2011) traz uma relação dos principais metabólitos secundários isolados a partir de fungos filamentosos onde alguns são utilizados como antibióticos, entre eles pode-se mencionar a cefalosporina, isolado do fungo *Acremonium chrysogenum*, ácido fusídico obtido de *Acremonium fusidioides* e o caso mais conhecido, a penicilina sintetizada pela espécie *Penicillium*.

3.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Não foi possível determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos liofilizados dos fungos endofíticos nas concentrações testadas. Já o controle positivo apresentou uma concentração inibitória mínima de 0,2 mg/mL contra todas as bactérias patogênicas utilizadas (Figura 2).

Figura 2. Revelação de microplaca utilizando resazurina em teste de CIM.



Para Oliveira (2019) os elevados valores de CIM ou a falta de atividades nesse modelo pode estar relacionado com a utilização dos extratos fúngicos em sua forma bruta, onde não existe nenhum tipo de separação e extração de compostos, sendo que a concentração de dado composto se encontra numa quantidade baixa devido a que os metabólitos com potencial antibacteriano se encontram junto com os componentes do metabolismo fúngico. Nesse sentido, a escolha por um solvente ideal para extração de compostos se torna necessária, já que isso pode afetar diretamente os resultados devido à diferença de polaridade entre os solventes, situação evidenciada no presente trabalho, sendo que o extrato liofilizado partiu de uma solução aquosa e por se tratar de uma solução polar, possivelmente os antibacterianos com uma polaridade diferente não foram evidenciados de maneira ideal.

Nesse sentido, Techaoei et al. (2020) realizou avaliação química e antibacteriana de fungos endofíticos isolados de *Nelumbo nucifera* em extratos orgânicos com hexânico, acetato de etila, butanólico e metanólico, verificando que o extrato contendo acetato de etila obteve uma resposta positiva, apresentando valores mínimos de CIM a 2,5 mg/mL contra *Staphylococcus aureus*.

Takahashi e Lucas (2008) chegaram à conclusão de que a produção dos metabólitos secundários depende diretamente das condições nutricionais e de fermentação na qual o fungo será exposto, sendo que a produção desses compostos ativos ocorre na fase final do crescimento logarítmico ou na fase estacionária da fermentação e alguma instabilidade neste processo pode modificar a qualidade e quantidade do metabólito expresso. Ademais, a expressão dessas substâncias pelo endófito depende diretamente da espécie e do genótipo do hospedeiro, além das condições ambientais na qual estão submetidos (JALGAONWALA et al., 2014).

3.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS FUNGOS

Nos ensaios de avaliação da atividade enzimática, observou-se que a maioria das linhagens apresentaram potencial para produção de enzimas amilolíticas e proteolíticas (Tabela 3).

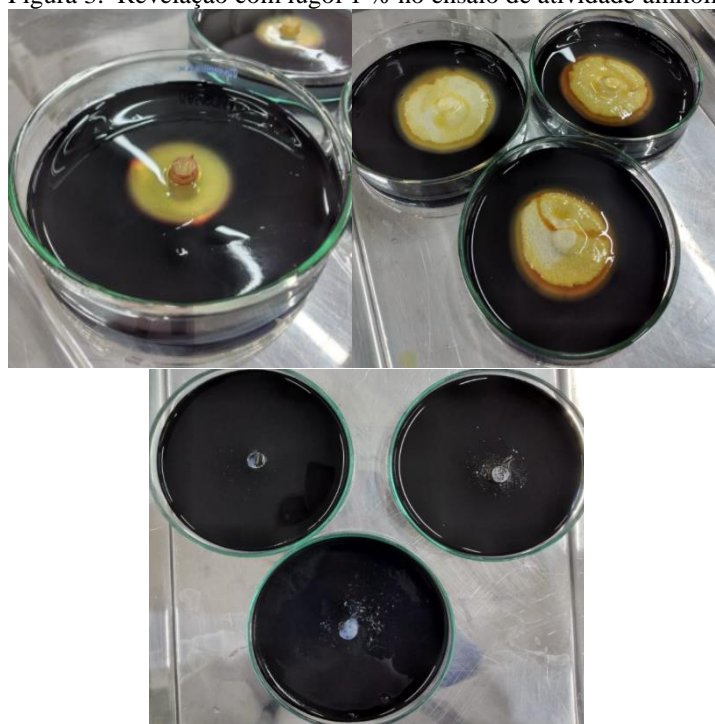
Tabela 3. Atividade enzimática dos fungos endofíticos isolados

Isolados de fungos endofíticos	Amilase		Protease	
	Atividade*	Pz*	Atividade	Pz
<i>Lasiosphaeriaceae</i> sp.R2B	-	1,00±0,00 ^c	-	1,17±0,066 ^d
<i>Talaromyces pinophilus</i> FEFM I	+	0,799±0,062 ^b	++	0,239±0,105 ^a
<i>Ceriporia alachuana</i> R9C	-	1,00±0,0 ^c	++	0,239±0,079 ^a
<i>Fusarium acutatum</i> T9E	+	0,734±0,033 ^b	+	0,752±0,041 ^c
<i>Trichoderma</i> sp. R4A	-	1,00±0,005 ^c	+	0,794±0,128 ^c
<i>Lasiosphaeriaceae</i> sp. R8E	-	1,08±0,023 ^c	-	1,18±0,072 ^d
<i>Fusarium acutatum</i> R7C	+	0,721±0,093 ^b	+	0,833±0,038 ^e
Não identificado R9B	++	0,361±0,086 ^a	++	0,352±0,006 ^b
<i>Fusarium oxysporum</i> T2A	++	0,258±0,034 ^a	++	0,434±0,024 ^b
<i>Fusarium acutatum</i> R5A	++	0,685±0,042 ^b	++	0,709±0,129 ^c
<i>Fusarium solani</i> T1A	+	0,827±0,085 ^b	++	0,566±0,072 ^b
<i>Fusarium oxysporum</i> T7C	++	0,298±0,034 ^a	++	0,246±0,029 ^a

* Pz=média da atividade enzimática (diâmetro da colônia/diâmetro da colônia com halo de degradação. (-) $Pz \geq 1$; (+) $Pz = 0,65$ a $0,99$; (++) $Pz \leq 0,64$ (Cuzzi *et al.*, 2011). Letras diferentes em cada coluna indicam as diferenças significativas entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Com relação às atividades enzimáticas dos fungos testados, 66,67% foram capazes de hidrolisar o amido, enquanto 83,33% demonstraram atividade proteolítica. Apenas as linhagens R2B e R8E não apresentaram formação de halo em nenhum dos testes. De maneira geral, dez linhagens apresentaram resultados positivos para a produção de pelo menos uma das enzimas envolvidas, assim é possível sugerir que estas linhagens são promissoras testes futuros visando a obtenção de enzimas, com destaque para os isolados do gênero *Fusarium*, visto que todos apresentaram atividade amilolítica e proteolítica.

Figura 3. Revelação com lugol 1 % no ensaio de atividade amilolítica.



(3A). Fungo *F. oxysporum* T2A com halo evidenciado; (3B). Fungo *F. solani* T1A com formação de halo de degradação; (3C). Fungo *Ceriporia alachuana* R9C sem crescimento nem formação de halo.

Na avaliação da atividade amilolítica, todos as espécies do gênero *Fusarium* foram capazes de hidrolisar amido, com destaque para as linhagens T2A, R5A e T7C que demonstraram atividade enzimática fortemente positiva. Este resultado que difere dos obtidos por Gopinath (2005) para alguns fungos do mesmo gênero, isolados de ambientes poluídos por óleo e avaliou a produção de enzimas extracelulares, entre elas a amilase e

relatou uma baixa atividade para *Fusarium oxysporum* e nenhuma atividade detectada para *Fusarium solani* e *Fusarium* sp.

Já Wenzel et al. (2013) obteve atividade enzimática amilolítica para *Fusarium* sp. com $0,64 = Pz < 1$, mostrando que a variação da produção das enzimas pode diferir de acordo com a espécie ou isolado. Cuzzi et al. (2011) estudou a produção de enzimas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C e verificou que o gênero *Fusarium* sp. tem alta capacidade de produzir amilases.

De maneira geral, os fungos do gênero *Fusarium* estão entre os principais fitopatógenos conhecidos, provocando doenças que causam perdas consideráveis na colheita de cereais, cultivo de hortaliças e frutas. Essa hostilidade com a planta infectada ocorre principalmente pela capacidade do fungo em produzir enzimas hidrolíticas como amilase, lipase, celulase, entre outras enzimas necessárias para sua sobrevivência (Bueno et al., 2009).

Sobre a capacidade proteolítica, as linhagens FEMF I, R9C, R9B, T2A, R5A, T1A e T7C apresentaram atividade fortemente positiva, enquanto que T9E, R4A e R7C foram apenas positivas. Por outro lado, as linhagens R2B e R8E, ambos *Lasiosphaeriaceae* sp., não demonstraram atividade proteolítica.

Figura 4. Revelação do ensaio de avaliação da atividade proteolítica.



(4A). Fungo *F. oxysporum* T7C; (4B). Fungo *F. oxysporum* T2A; (4C). Fungo Não identificado R9B.

Bueno et al. (2009) avaliou a secreção de enzimas extracelulares de fungos *Fusarium solani* isolados de maracujazeiro amarelo e concluiu que esta espécie é capaz de produzir enzimas como amilase, lipase, celulase, proteases, lacase e catalase, onde não houve diferença de quantidade entre os isolados na produção das enzimas proteases e catalase. Já Gopinath et al. (2005) registrou que *Fusarium oxysporum* apresentou uma atividade moderada para produção de protease e uma produção nula desta enzima para o

fungo *Fusarium solani*. Ao mesmo modo Cuzzi et al. (2011) concluiu em seu estudo, uma baixa taxa de produção de protease para o gênero *Fusarium*.

As divergências entre os resultados obtidos no presente estudo comparado com outros trabalhos demonstram que a atividade enzimática depende diretamente do ambiente de onde o fungo foi isolado e sua forma de cultivo, envolvendo a quantidade de substrato sólido no meio, sua solubilidade, difusibilidade e demais fatores.

Os resultados da atividade proteolítica do fungo R4A condiz com o estudo realizado por Cherkupally et al. (2017) no qual foi avaliado a formação de halos de espécies de *Trichoderma* para as enzimas amilase, celulase, pectinase, protease e quitinase.

De acordo Cherkupally et al. (2017) a produção de proteases por estes tipos de microrganismos acontece devido a necessidade de degradação das paredes celulares do hospedeiro quando o fungo atua como parasita. Meyer (2019) defende que existe uma relação direta entre a produção de proteases e a atividade micoparasita do *Trichoderma* visto que muitos dos genes que codificam as proteases, se expressam antes e durante o contato com o patógeno.

Orlandelli e colaboradores (2012) destacam que as proteases e as amilases são as enzimas microbianas que mais crescem no mercado mundial, atuando em diversos setores da Biotecnologia Industrial. Os dados demonstram que um número expressivo dos isolados apresentou atividade enzimática fortemente positiva para amilase e protease, o que indica um grande potencial biotecnológico que poderá ser explorado em trabalhos futuros, com o propósito obter novas fontes de enzimas, o que poderá conferir vantagens para indústrias de diferentes áreas, com destaque para alimentícia, farmacêutica, biocombustíveis, cosméticos, entre outros.

4 CONCLUSÃO

Fungos endofíticos podem ser importantes fontes de metabólitos ativos contra bactérias causadoras de doenças em humanos e animais. Todos os isolados avaliados apresentaram atividades antibacteriana em pelo menos uma cepa de bactéria testada, destacando-se o isolado R9C (*Ceriporia alachuana*) que demonstrou halo inibitório para quatro dos seis isolados patogênicos. Ademais, oito isolados fúngicos apresentaram atividade amilolítica e dez se mostraram ativos na degradação de proteínas, sendo do gênero *Fusarium* as espécies com atividade enzimática mais promissoras. Assim, os dados obtidos apontam que os isolados que com melhores resultados apresentaram

importante potencial biotecnológico, especialmente em estudos futuros para o desenvolvimento novos antibióticos e na produção enzimática.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso de Mato Grosso - *Campus* Avançado Lucas do Rio Verde (Edital Interno 003/2021 IFMT/CALRV) pelo apoio financeiro aportado na forma de taxa de bancada e de bolsas de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, J.A.; SCHINONNI, M.I. *Helicobacter pilory*: Associação com o câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 10, n. 3, p. 254-262, 2010.

BUENO, C.J. et al. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 343-346, 2009.

CHAPLA, V.M.; BIASSETTO, C.R.; ARAUJO, A.R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.3, 2013.

CHERKUPALLY, R.; AMBALLA, H.; REDDY, B.N. In vitro screening for enzymatic activity of *Trichoderma* species for biocontrol potential. **Annals of Plant Sciences**, India, v. 6, n. 11, p. 1784-1789, 2017.

CUZZI, C. et al. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (ASTERACEAE). **Global Science and Technology**, Paraná, v. 4, n. 2, p. 47-57, 2011.

DANTAS, S.B.S.; ALVES, F.A.M.; CHAPLA, V.M. Chemical, diversity and biotechnological potential of endophytic fungi isolated from Brazilian Cerrado plants. **Rev. Biota Neotropica**, v. 21, n. 2, p. 1-8, 2021.

OLIVEIRA, K.K.C. **ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE RECURSOS NATURAIS CONTRA *Staphylococcus aureus***. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

FELBER, A.C. et al. Endoglucanase production by endophytic fungi isolated from *Vitis labrusca* L. with peanut hull and sawdust as substrates. **Bioscience Journal**, v.35, n.3, p.933-940, 2019.

FERREIRA, P.A. et al. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática: Após os antibióticos, enzimas são os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, 2009.

FORTKAMP, D. **Metabólitos produzidos por fungos endofíticos isolados de *Anthurium alcatrazense* e *Begonia spp.*** Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

GOPINATH, S. C. B.; HILDA, A.; ANBU, P. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v. 46, n. 2, p. 119–126, 2005.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, v. 16, p. 218- 224, 1971.

JALGAONWALA, R.E.; MOHITE, B.V.; MAHAJAN, R.T. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, India, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.

KYEKYEKU, J.O. et al. Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Fusarium solani* JK10. **Fitoterapia**, Alemanha, v. 119, p. 108-114, 2017.

LOPEZ, F.C. **Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos**. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LUZ, C. et al. Occurrence, toxicity, bioaccessibility and mitigation strategies of beauvericin, a minor *Fusarium* mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 107, p. 430-439, 2017.

MEYER, M.C.; MAZARO, S.M.; SILVA, J.C. **Trichoderma Uso na Agricultura**. 1. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2019.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Document, p. M27-A3, 2008.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. Document, p. M07-A10, 2015.

NETO SÁ PEIXOTO, P.A.; AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago - Chile, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

OLIVEIRA, K.S. **Atividade antimicrobiana de metabólitos provenientes de fungos isolados do solo**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) - Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2013.

ORLANDELLI, R.C. et al. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **Revista de Saúde e Biologia**, Maringá - PR, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

PAMPFILE, J.A. et al. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **Revista UNINGÁ**, Maringá, v. 53, n. 1, p. 113-119, 2017.

PHUPIEWKHAM, W. et al. Antibacterial agents from *Trichoderma harzianum* strain T9 against pathogenic bacteria. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 42, n. 2, p. 304-316, 2015.

SPECIAN, V. et al. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. **Ciências biológicas e da saúde**, v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014.

STROBEL, G. A. et al. Cryptocandin, a potente antimycotic from the Endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. quercina. **Microbiology**, v. 17, p. 417-423, 1999.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, Minas Gerais, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TECHAOEI, S. et al. Chemical evaluation and antibacterial activity of novel bioactive compounds from endophytic fungi in *Nelumbo nucifera*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Tailândia, v. 27, p. 2883-2889, 2020.

TIJERINO, A. et al. Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. **Fungal genetics and Biology**, v. 48, n. 3, p. 285- 296, 2011.

WENZEL, J.B. et al. Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos isolados de soja. **Rev. Perspectivas Online**, Campos dos Goytacazes, v. 9, n. 3, p. 1-15, 2013.

WHITE T.J et al., Amplificação e sequenciamento direto de genes de RNA ribossômico fúngico para filogenia. In: Innis MA, Gelfald DH, Sninsky JJ, White T.J, editores. *Protocolos de PCR: um guia para métodos e aplicações*. San Diego: Imprensa Acadêmica, p. 315-322, 1990.

ZEILINGER, S. et al. Secondary metabolism in *Trichoderma*: Chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, India, v. 30, n. 2, p. 74-92, 2016.