

Diversidade Microbiana da Amazônia

Vol. 3

ORGANIZADORES

LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA, JULIANA GOMES DE SOUZA OLIVEIRA,
LUADIR GASPAROTTO, MARIA APARECIDA DE JESUS, LILIANE COELHO DA ROCHA,
JANIA LILIA DA SILVA BENTES, LARISSA DE SOUZA KIRSCH, SUANNI LEMOS DE ANDRADE



PRESIDENTE DA REPÚBLICA
Jair Messias Bolsonaro

MINISTRO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
Marcos César Pontes

DIRETORA DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
Antonia Maria Ramos Franco Pereira

Diversidade Microbiana da Amazônia

Vol. 3

ORGANIZADORES

LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA, JULIANA GOMES DE SOUZA OLIVEIRA,
LUADIR GASPAROTTO, MARIA APARECIDA DE JESUS, LILIANE COELHO DA ROCHA,
JANIA LILIA DA SILVA BENTES, LARISSA DE SOUZA KIRSCH, SUANNI LEMOS DE ANDRADE



Manaus
2019

Copyright © 2019, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Capa

Tito Fernandes e Rodrigo Verçosa

Projeto gráfico e editoração eletrônica

Rodrigo Verçosa

EDITORA INPA

Editor-chefe

Mario Cohn-Haft.

Produção editorial

Rodrigo Verçosa, Shirley Ribeiro Cavalcante, Tito Fernandes

FICHA CATALOGRÁFICA

D618 Diversidade microbiana da Amazônia / Organizador Luiz Antonio de Oliveira... [et.al].--

Manaus: Editora INPA, 2019.

35 mb, v. 3: il. color.

ISBN 978-65-5633-000-6

1. Microbiologia - Amazônia. 2. Diversidade. I. Oliveira, L. A.

CDD 576.9811



Editora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Av. André Araújo, 2936, Petrópolis

Cep : 69067-375 Manaus – AM, Brasil

Tel : 55 (92) 3643-3223

www.inpa.gov.br e-mail: editora@inpa.gov.br

Otimização das condições para a produção de metabólitos no co-cultivo de *Quambalaria cyanescens* e *Paecilomyces* sp.

Débora de Sena Raposo¹, Joyce Belentani de Souza Maciel¹, Thiago Fernandes de Sousa¹, Gilvan Ferreira da Silva², Héctor Henrique Ferreira Koolen³

¹ Discentes da Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas, Escola Normal Superior, Universidade do Estado do Amazonas

² Pesquisador da EMBRAPA Amazônia Ocidental

³ Pesquisador e Docente do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas

Emails: deborasenara@gmail.com; hkoolen@uea.edu.br

Resumo

Fungos apresentam-se como seres vivos diversificados podendo ter em seu reino representantes leveduriformes e filamentosos. Estes, além de possuir importância ecológica, alimentar, e ter alguns representantes atuantes como patógenos humanos, também são importantes produtores de metabólitos secundários com grande utilização na indústria farmacêutica. Tendo em vista o potencial biotecnológico desses organismos e a diversidade de espécies com importância química, este estudo aborda técnicas indutoras de desvios metabólicos (OSMAC) em endófitos amazônicos. O estudo foi conduzido com *Quambalaria cyanescens* e *Paecilomyces* sp., isolados do fruto do açaí-do-amazonas. Evidenciou-se, o potencial químico das cepas, em especial *Q. cyanescens*, bem como do co-cultivo das espécies, o que possibilitou a biossíntese de moléculas potencialmente novas.

Palavras-chave: Açaí-do-amazonas; Fungos endofíticos; Metabolismo microbiano; Produtos naturais.

Introdução

Os fungos são seres vivos eucarióticos com um só núcleo, como as leveduras, ou multinucleados, como os bolores e os cogumelos (Takahashi *et al.*, 2017). Fungos têm uma diversidade de interações fundamentais na natureza, entre elas, a associação mutualista com raízes denominada micorrizas e a degradação de lignina com papel fundamental na reciclagem de nutrientes (Souza *et al.*, 2008). Além de possuir caráter de extrema importância em nível ecológico, fungos estão diretamente relacionados aos seres humanos, servindo como alimento, devido ao seu alto valor nutricional, como é o caso do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, e também, sendo fonte de moléculas bioativas, como exemplo, o ascomiceto *Aspergillus terreus* de onde foi descoberto o fármaco lovastatina atuante na redução de colesterol (Singh e Pelaez, 2008).

Pertencente ao filo Basidiomycota, o gênero *Quambalaria* apresenta em suas características morfológicas um grupo de conídios e conidióforos com septos visíveis e posterior brotamento de conídios secundários (Raima *et al.*, 2010) e em suas características macroscópicas produções de diferentes pigmentos. O gênero engloba cinco espécies: *Q. pitereka*, *Q. eucalypti*, *Q. cyanescens*, *Q. coyrecup* e *Q. pusilla* (Stodulková *et al.*, 2015). Representantes deste gênero foram descritos em uma gama de nichos ecológicos, estando presentes no ar, em material vegetal, no solo e até mesmo em insetos (De Hoog e De Vries, 1973). Além disso, *Quambalaria* apresenta espécies produtoras de substâncias bioativas, como por exemplo a *Q. cyanescens* produtora de substâncias bioativas contra células cancerígenas e microrganismos patogênicos, denominadas quambalarinas A e B (Stodulková *et al.*, 2015).

Representantes deste gênero são em sua maioria patógenos de plantas, entretanto, também podem ser encontrados como endofíticos (Padhi e Tayung, 2013). Fungos endofíticos são aqueles que colonizam plantas sem lhes causar sintomas visíveis de infecção (Muvea *et al.*, 2014). Podem gerar benefícios ao hospedeiro, como indução de metabólitos secundários ativos contra patógenos e secreção de fitohormônios. Além disso, são produtores de uma diversidade de substâncias com potencial medicinal, na agricultura e em aplicações industriais (Costa *et al.*, 2012).

Estudos recentes com fungos endofíticos vêm empregando técnicas que permitem a indução de desvios no metabolismo secundário. Uma das vertentes é denominada método OSMAC (do inglês, *one strain many compounds*), a qual consiste em cultivar uma determinada espécie de microrganismo variando-se algumas condições de incubação. Entre os diversos parâmetros que podem ser utilizados estão a alteração da composição e aeração do meio de cultura, o período de cultivo, temperatura, pH, adição de xenobióticos, e por fim o co-cultivo (Saleem *et al.*, 2009). Este último é baseado no cultivo concomitante de duas ou mais espécies fúngicas em uma única fonte de carbono, fazendo com que os microrganismos interajam e disputem os nutrientes limitados produzindo moléculas de ataque e defesa, e assim, produzem novas substâncias (Bertrand *et al.*, 2014). Desta forma, o presente estudo delineou a aplicação da técnica de OSMAC em dois fungos endofíticos dos frutos do açaí-do-amazonas por meio da modalidade de co-cultivo identificando possíveis desvios no metabolismo secundário dos mesmos, bem como otimizando os parâmetros necessário para tal.

Material e Métodos

O isolamento dos microrganismos foi realizado mediante metodologia previamente descrita (Souza *et al.*, 2004).

A purificação das cepas fúngicas se deu por meio da obtenção de culturas monospóricas. Esta etapa foi feita através de diluições seriadas dos esporos (Petrini *et al.*, 1993). As colônias puras foram preservadas conforme metodologia de Castellani (Petrini *et al.*, 1993) e depositadas na coleção de microrganismos do Grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas (MMSRG) da UEA, a fim de constituir a micoteca do grupo citado. Para o cadastro, cada linhagem teve suas características morfológicas avaliadas por microscopia ótica, e as estruturas reprodutivas foram utilizadas para formar grupos de isolados. Nesta etapa, apenas uma parte das linhagens foi passível apenas de identificação a nível taxonômico de gênero.

Em seguida, os isolados monospóricos foram crescidos em meio líquido batata dextrose levedura (BDL, batata 200 g/L, dextrose 10 g/L, extrato de levedura 2 g/L) sob agitação à 150 rpm e 28 °C para obtenção de massa micelial. Após a separação das células do caldo fermentado por meio de filtração à vácuo, o ácido desoxirribonucleico (DNA) total foi obtido conforme o protocolo de extração por detergente catiônico 2% (Doyle e Doyle, 1987). A integridade do DNA extraído foi visualizada por meio de gel de agarose 0,8% (m/m) e quantificada em um espectrofotômetro UV-Vis modelo NanoDrop 2000 e logo após diluídas para a concentração de 100 ng/μL.

A identificação molecular dos isolados foi feita com base na região do espaçador interno transcrito e domínios D1/D2 da região 28S do rDNA utilizando-se os primers ITS 1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (Arhheim *et al.*, 1990) e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Carbone e Kohn, 1999). Os amplicons esperados foram fragmentos de aproximadamente 1200 pares de bases, destes, aproximadamente 500 pb correspondem à região ITS e 700 pb correspondem a LSU 28S.

Reações de PCR foram realizadas utilizando 100 ng do DNA total; 0,5 pmol de cada primer; 1X de tampão de reação (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40); 2 mM de MgCl₂; 1 mM de dNTPs e uma unidade de Taq DNA polimerase (DNA Express) para um volume final de 25 μL. As condições de PCR foram: desnaturação inicial foi de 94 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento 57 °C por 1 min., extensão de 72 °C por 1,5 min, seguido de extensão final a 72 °C por 5 min. Os amplicons gerados foram visualizados em gel de agarose com auxílio do marcador 1kb para confirmar a amplificação apenas da região de interesse. Os produtos de PCR foram tratados com polietilenoglicol (PEG 20%) e sequenciadas usando o kit BigDye™ Terminator v3.1, no 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™) conforme recomendações do fabricante. A sequência consenso para cada locus foi obtida com base no sequenciamento das fitas *forward* (F) e *reverse* (R) utilizando-se o programa DNA Baser v.4.36 (<http://www.dnabaser.com/>) para montagem de contig. O alinhamento das sequências obtidas foi realizado utilizando-se a ferramenta nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

O cultivo dos fungos para a avaliação do potencial de crescimento e subsequente produção de metabólitos foi realizado em placas de Petri de 8,5 cm. Para a primeira etapa foram testadas fontes de carbono à base de meio BDA, Sabouraud, extrato de carne e Czapek-modificado. Para a segunda etapa apenas de co-cultivo foi utilizado o meio de cultura BDA. Cerca de 10 placas contendo o meio mais indicado foram inoculadas duplamente. O fungo MMSRG-018 foi inoculado do lado esquerdo a 5 mm de distância da borda, ao passo que o fungo MMSRG-024 foi inoculado do lado direito. O crescimento das cepas foi acompanhado a cada 3 dias. Placas controle contendo cultivos individuais das mesmas linhagens foram avaliadas concomitantemente. Ao fim de 21 dias, todo o conteúdo da placa (meio de cultura fermentado e micélio) foi raspado, triturado e macerado com uma mistura de acetato de etila, diclorometano e metanol (5:3:2, v/v). Após filtrado, o solvente contendo os metabólitos foi evaporado por meio de rotoevaporação à vácuo.

As análises químicas foram realizadas em um sistema de LC-MS/MS 6550 iFunnel da Agilent, constituído de um cromatógrafo de alta performance acoplado a um espectrômetro de massas com geometria do quadrupolo tempo de voo (Q-TOF). A técnica de ionização utilizada foi a eletrospray (ESI) e os parâmetros de ionização foram os seguintes: voltagem do capilar, 4000 V; tensão do bocal, 0 V; fragmentador, 100 V; skimmer (capilar de transferência), 65 V; temperatura do gás, 275 °C; vazão de gás, 14 L/min; nebulizador, 45 psi. A temperatura do auto-amostrador foi mantida à 20 °C e o volume de injeção foi de 10 µL.

A separação dos compostos foi realizada em uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (Dimensões 50 mm x 4.6 mm, diâmetro da partícula 2.7 µm) utilizando uma fase binária (solvente A: água, solvente B: metanol) para as separações. A eluição em gradiente a 30 °C foi a seguinte: 0-2 min, 5% B; 2-15 min, 5-60% (v/v) B; 15-25 min, 60-70% (v/v) B; 25-35 min, 70-100% (v/v) B; 35-50 min, 100% de B a uma vazão de 0,4 mL/min. As identificações foram realizadas por meio da interpretação manual dos espectros de MS/MS em comparação com a literatura adequada. Os espectros obtidos foram processados utilizando-se o software MassHunter Qualitative Analysis versão B.07.00.

Resultados e Discussão

Após o sequenciamento, as principais linhagens isoladas dos frutos do açaí-do-amazonas foram identificadas como *Quambalaria cyanescens* MMSRG-018 e *Paecilomyces* sp. MMSRG-024. O gênero *Quambalaria* é de rara ocorrência, sendo sempre associado como um fitopatógeno, especialmente de cultivos de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (Andrade *et al.*, 2005). Este fungo é classificado como um basidiomiceto com reprodução assexuada. Diferentemente de outros representantes do filo Basidiomycota, este gênero não apresenta basidiocarpo. Por outro lado, fungos do gênero *Paecilomyces* são bem mais recorrentes tendo sido isolados nos mais distintos ambientes (Guo *et al.*, 2007). Membros deste gênero são ascomicetos com diversas potencialidades, especialmente o biocontrole de nematódeos que atacam cultivos de tomates (Guo *et al.*, 2007).

Inicialmente, foram avaliadas as taxas de crescimento das duas linhagens de fungos separadamente. Isto se deu pela necessidade de encontrar uma condição de cultivo propícia para a produção de metabólitos para ambas, bem como na necessidade de que as linhagens crescessem em taxas aproximadas. Os fungos *Quambalaria cyanescens* MMSRG-018 e *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 foram avaliados quanto sua taxa de crescimento nos meios BDA, Czapek-modificado, Sabouraud e extrato de carne. O fungo *Q. cyanescens* apresentou a melhor taxa de crescimento em BDA (39,05 mm/dia) e coincidentemente o fungo *Paecilomyces* sp. também preferiu a fonte de carbono de batata crescendo 46.44 mm/dia. Em especial, o fungo *Q. cyanescens* indicou que todas as outras fontes de carbono testadas não eram adequadas para sua nutrição, uma vez que seu crescimento estagnou a partir do quinto dia. Na produção de *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 em diferentes meios de cultura após 21 dias de cultivo, metabólitos foram constatados através da coloração, tanto do micélio como do meio de cultura (extrólitos). Porém, novamente, o meio em BDA mostrou-se mais adequado para o propósito deste trabalho (Figura 1.)

Ao serem inoculadas em porções diferentes das placas, observou-se que o *Paecilomyces* sp. cresceu de forma mais acelerada nos primeiros nove dias, enquanto que *Q. cyanescens* cresceu menos. Observou-se que apesar disso, o basidiomiceto passou a excretar seus metabólitos mais rapidamente, comprometendo

seu crescimento. A partir do nono dia, a linhagem de *Q. cyanescens* passou a excretar metabólitos de coloração violeta, o que fez com que o crescimento do ascomiceto *Paecilomyces* sp. fosse retardado. Isto foi observado como um halo de inibição, o que permitiu a posterior retomada do crescimento de *Q. cyanescens* a partir do décimo-quinto dia. Na etapa final do co-cultivo, o fungo *Paecilomyces* sp. passou a excretar seus metabólitos de coloração avermelhada, e desta forma tingiu o restante da placa. Ao final de 21 dias, o conteúdo das placas foi dividido (Figura 2), extraído e os respectivos extratos preparados.

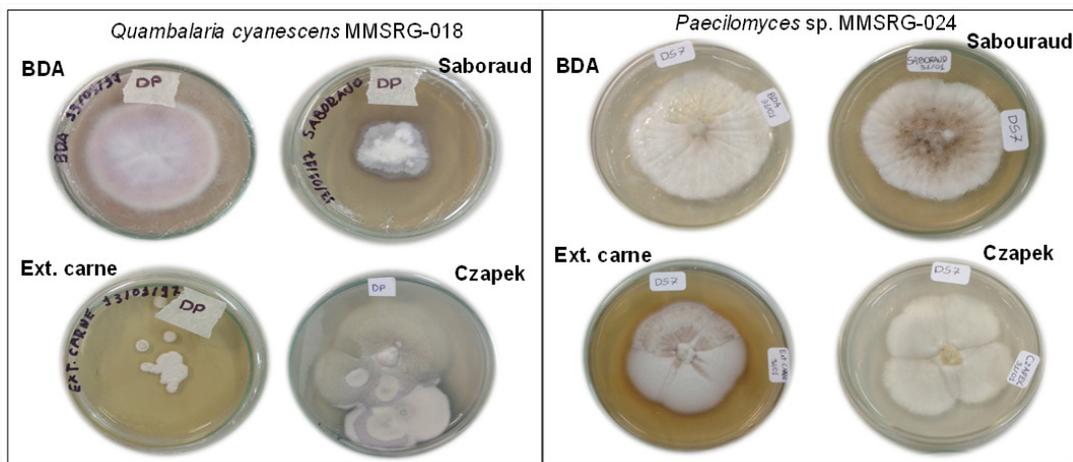


Figura 1. Culturas das linhagens de fungos endofíticos *Quambalaria cyanescens* MMSRG-018 e *Paecilomyces* sp. MMSRG-024.

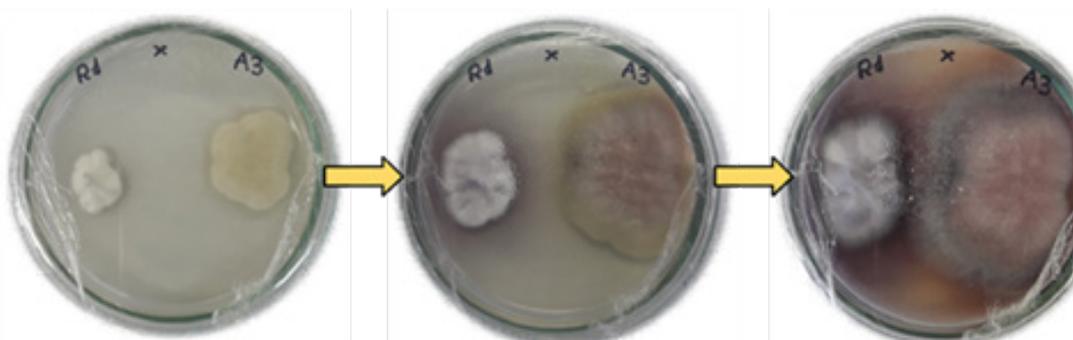


Figura 2. Cultivo de *Quambalaria cyanescens* MMSRG-018 (R1) e *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 (A3) em meio BDA com 4, 12 e 21 dias, respectivamente.

Os diferentes extratos obtidos foram analisados pela técnica de LC-MS/MS. A comparação dos cromatogramas permitiu identificar os metabólitos produzidos pela cepa de *Q. cyanescens* quando cultivada sozinha, bem como identificar que novos metabólitos são produzidos quando os dois fungos passam a competir pela fonte de carbono. A Figura 3 indica a diferença no metabolismo entre os cultivos isolados e o co-cultivo, onde uma maior complexidade, já esperada, é observada. A principal mudança no metabolismo é constatada pela aparição de dois picos nos tempos de retenção 12,8 e 13,3 minutos. Os compostos eluindo nos referidos tempos apresentaram m/z 375,2591 e 461,2876, respectivamente. A busca na literatura por substâncias fúngicas com as mesmas m/z não apresentou resultados consistentes, o que nos leva a supor que se tratam de novas moléculas. Adicionalmente, os picos encontrados para os cultivos individuais também foram analisados. Para o fungo *Paecilomyces* sp., apenas o pico 1 foi passível de identificação. A comparação de sua massa exata (m/z 279,1618; M-H) e seu padrão de fragmentação com a literatura permitiu a identificação deste pico como sendo o composto brefeldina A (Wang *et al.*, 2002). Esta substância foi previamente identificada em uma linhagem endofítica de *Paecilomyces* sp. associada à planta *Taxus mairei* (Wang *et al.*, 2002). Para o fungo *Q. cyanescens*, apenas um estudo

prévio relatou alguns de seus metabólitos produzidos (Raima *et al.*, 2010). Por se tratar de um fungo raro e descrito a menos de 20 anos, poucos estudos prévios foram conduzidos até então. As substâncias assinaladas como **2** (m/z 221,0099; [M-H]⁻), **3** (m/z 317,0643; [M-H]⁻) e **4** (m/z 319,0839; [M-H]⁻) foram identificadas como as naftoquinonas mompaína, quambalarina A e quambalarina B, respectivamente (Figura 3) (Stodulková *et al.*, 2015).

Os metabólitos identificados das culturas isoladas possuem diversas potencialidades comprovadas. Destaca-se o potencial antibiótico da brefeldina A (Wang *et al.*, 2002) e as atividades antifúngicas das quambalarinas (Stodulková *et al.*, 2015). Fica claro que o fungo *Q. cyanescens* MMSRG-018 excretou estes metabólitos, e que estes auxiliaram na competição atuando como agentes fungistáticos. Destaca-se também o potencial da substância quambalarina B, recentemente descrita como uma potente substância antitumoral (Grobárova *et al.*, 2016). Os pigmentos identificados tanto no cultivo isolado de *Q. cyanescens* como no co-cultivo indicam que estes compostos desempenham papel vital na ecologia desta espécie. Ressalta-se também, o potencial do fungo *Paecilomyces* sp. que em situação de perigo excretou metabólitos com pigmentação vermelha, estes ainda por terem suas identidades a descobrir.

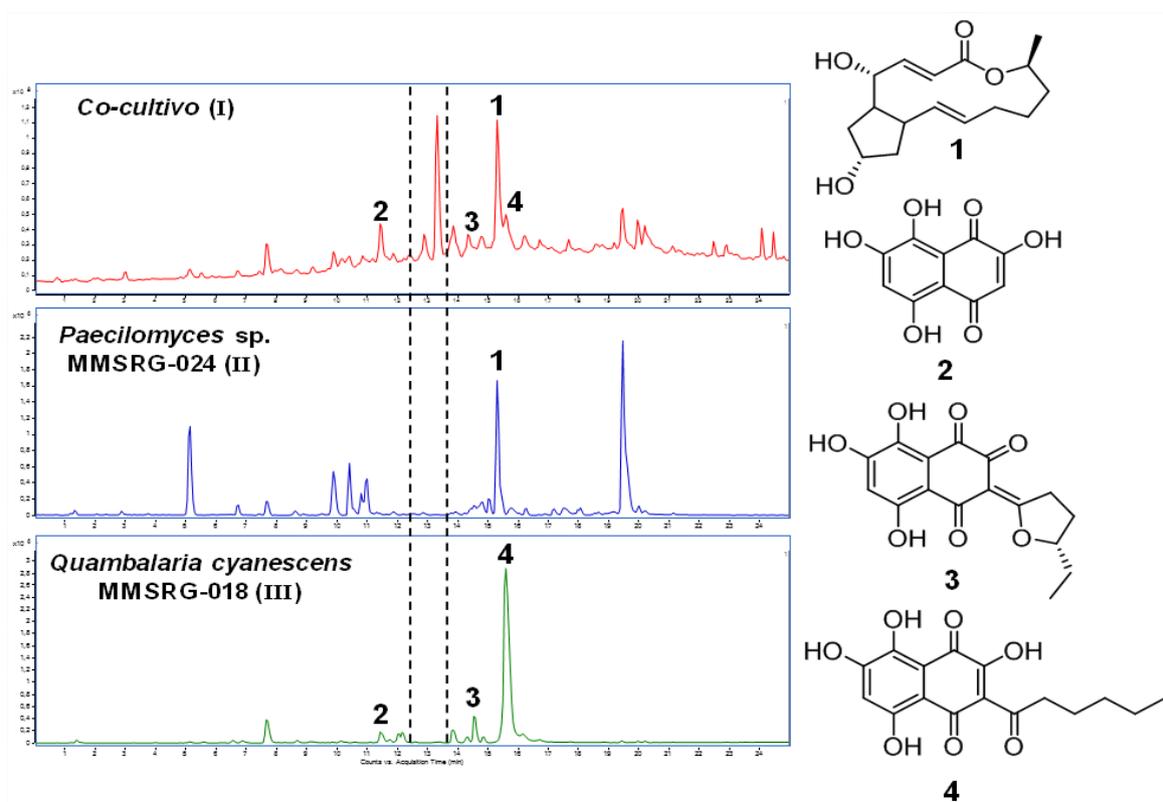


Figura 3. Cromatogramas de LC-MS/MS no modo negativo do co-cultivo (I), cultura isolada de *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 (II) e *Quambalaria cyanescens* MMSRG-018 (III), respectivamente. Os picos assinalados foram identificados como brefeldina A (1), mompaína (2), quambalarina A (3) e quambalarina B (4).

Conclusões

Além da capacidade de produzir diferentes metabólitos da classe das naftoquinonas, neste trabalho evidenciou-se o potencial do fungo *Quambalaria cyanescens* MMSRG-018 em retardar o crescimento de *Paecilomyces* sp. MMSRG-024.

Adicionalmente observou-se que o co-cultivo entre estes dois fungos causa desvios metabólicos que conduzem à produção de duas substâncias não previamente descritas. Os resultados alcançados reforçam a necessidade de estudos visando novas moléculas bioativas de fungos da Amazônia

Referências

- Andrade GCG, Alfenas AC, Mafia RG, Mafii LA, Gonçalves RC 2005. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*. *Fitopatologia Brasileira*, 30(5):504-509.
- Arnheim N, White T, Rainey WE 1990. Application of PCR: Organismal and population biology. *BioScience*, 40(3):174-182.
- Bertrand S, Bohni N, Schnee S, Schumpp O, Gindro K, Wolfender JL 2014. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*, 32(6):1180-1204.
- Carbone I, Kohn LM 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3):553-556.
- Costa IPMW, Maia LC, Cavalcanti MA 2012. Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1):1165-1173.
- De Hoog GS, De Vries GA 1973. Two new species of *Sporothrix* and their relation to *Blastobotrys nivea*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 39(1):515-520.
- Doyle JJ, Doyle JL 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1):11-15.
- Grobárova V, Valis K, Talacko P, Pavlu B, Hernychová L, Nováková J, Stodulková E, Flieger M, Novák P, Černý J 2016. Quambalarine B, a secondary metabolite from *Quambalaria cyanescens* with potential anticancer properties. *Journal of Natural Products*, 79(9):2304-2314.
- Guo Z, She Z, Shao C, Wen L, Liu F, Zheng Z, Lin Y 2007. ¹H and ¹³C NMR signal assignments of paecilin a and b, two new chromone derivatives from mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45(9):777-780.
- Muvea AM, Meyhofer R, Subramanian S, Poehling HM, Ekesi S, Maniania NK 2014. Colonization of onions by endophytic fungi and their impacts on the biology of *Thrips tabaci*. *Plos One*, 9(9):1-22.
- Padhi S, Tayung KA 2013. Antimicrobial activity and molecular characterization of an endophytic fungus, *Quambalaria* sp. isolated from *Ipomoea carnea*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 63(2):793-800.
- Petrini O, Sieber TN, Toli L, Viret O 1993. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1(3):185-196.
- Raima MA, Strobel GA, Vishnevetsky M, Ren Y, Geary B 2010. Biologically active endophytic *Quambalaria* sp. from *Leptospermum junipae* in Australia. *Mycology*, 1(1):67-74.
- Souza AQL, Souza ADL, Filho SA, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*, 34(2):185-195.
- Souza HQ, Oliveira LO, Andrade JS 2008. Seleção de basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(1):116-124.
- Saleem TSM, Ravi V, Gauthaman K, Saisivam S 2009. Microbial production and OSMAC study of *Streptomyces* species coded as G-16. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(2):57-60.
- Singh SB, Pelaez F 2008. Biodiversity, chemical diversity and drug discovery. *Natural Compounds as Drugs*, 65(1):141-174.
- Stodulková E, Císarová I, Kolarík M, Chudícková M, Novák P, Man P, Kuzma M, Pavlu B, Černý J, Flieger M 2015. Biologically active metabolites produced by the basidiomycete *Quambalaria cyanescens*. *Plos One*, 10(2):1-12.
- Takahashi JA, Lima GS, Santos GF, Lyra FH, Silva-Hughes AF, Gonçalves FAG 2017. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. *Revista Virtual de Química*, 9(6):2351-2382.
- Wang J, Huang Y, Fang M, Zhang Y, Zheng Z, Zhao Y, Su W 2002. Brefeldin a, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 34(1):51-57.