

# 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

## Criação de uma micoteca de fungos endofíticos de frutas regionais com potencial antimalárico

Kathiane Rebouças de Souza<sup>1</sup>, Beatriz Gomes Alves<sup>1</sup>, Débora de Sena Raposo<sup>1</sup>,  
Thiago Fernandes Sousa<sup>1</sup>, Paula Hariana Silva Dantas<sup>1</sup>, Cathele Gabriele Silva Felix<sup>1</sup>,  
Yasmin Verçosa Kramer<sup>1</sup>, Gilvan Ferreira da Silva<sup>2</sup>, Hector Henrique Ferreira Koolen<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Discentes da Graduação em Ciências Biológicas, Escola Normal Superior, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>2</sup> Pesquisador da EMBRAPA Amazônia Ocidental

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

Emails: krds.bio16@uea.edu.br; hkoolen@uea.edu.br

### Resumo

O bioma Amazônico abriga alta diversidade vegetal e microbiana. Nesta encontram-se os fungos endofíticos, capazes de habitar o interior das plantas, colonizando seus tecidos sem lhes causar danos aparentes. Estes também são capazes de produzir metabólitos secundários de importância econômica. Portanto, objetivou-se através deste estudo, a criação de uma micoteca de fungos endofíticos associados a frutas regionais com atividade antimalárica. Técnicas clássicas em microbiologia e ferramentas de biologia molecular foram empregadas. Ao fim, os isolados foram fermentados e seus extratos estudados quanto à sua atividade contra *Plasmodium falciparum*. Das 210 linhagens obtidas, apenas nove apresentaram potencial antimalárico, destacando-se as linhagens *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 e *Aspergillus sydowii* MMSRG-031 com dosagens mínimas de inibição na concentração de 6,25 µg. mL<sup>-1</sup>. Estes resultados, demonstram a importância de fungos como promissoras fontes de moléculas bioativas, bem como endófitos de frutos do Amazonas como fontes de linhagens promissoras.

**Palavras chave:** fungos endofíticos, frutas Amazônicas, malária, Plasmodium.

### Introdução

A Floresta Amazônica é considerada a maior floresta tropical do planeta, representando cerca de 20% da biodiversidade mundial e destacando-se por possuir a maior diversidade de animais e de plantas do planeta (Souza *et al.*, 2004). Quanto às plantas, uma biodiversidade de aproximadamente 30.000 espécies é encontrada neste bioma, o que corresponde a 10% das plantas de todo o planeta. Adentrando a diversidade vegetal, os frutos amazônicos são igualmente diversos. Muitos deles, fonte de alimentos e/ou base para cosméticos e medicamentos.

Assim como possui uma alta diversidade vegetal, a Floresta Amazônica traz consigo, uma vasta diversidade microbiana associada. Dentre os microrganismos presentes nos tecidos vegetais, destacam-se os fungos e as bactérias. Estes seres associados são denominados microrganismos endofíticos sendo caracterizados pela capacidade de habitar o interior das plantas colonizando os tecidos saudáveis. Isto pode ocorrer apenas durante uma parte de seu ciclo de vida, como em sua totalidade. O que diferencia os endófitos dos demais seres é a sua capacidade de colonizar as plantas sem lhes causar danos (Souza *et al.*, 2004).

Os fungos endofíticos apresentam potencialidades biotecnológicas, uma vez que são capazes de biosintetizar uma vasta gama de metabólitos secundários com diversas propriedades biológicas (Specian *et al.*, 2014). A produção desses metabólitos pode ser influenciada por fatores bióticos e/ou abióticos, estando relacionados com a situação fisiológica do próprio hospedeiro (Azevedo *et al.*, 2000). Diversos estudos têm sido conduzidos visando a prospecção de metabólitos secundários por fungos endofíticos. Isto se deu inicialmente com a descoberta de uma cepa de *Taxomyces andreanae* capaz de mimetizar as vias metabólicas de sua hospedeira e assim produzir a molécula taxol, um poderoso quimioterápico no combate a certos tipos de câncer (Strobel e Daisy, 2003). Desta forma, diversas moléculas com potenciais bioativos foram descritas. Como exemplos têm-se as pestacinas, com atividade antioxidante (Harper *et al.*, 2003), subglutinóis

A e B com atividade imunossupressora (Lee *et al.*, 1995), a podofilotoxina com atividade anticancerígena (Puri *et al.*, 2006), a alantrifenona (Fabio *et al.*, 2005) como inseticida, dentre outras. A importância do estudo de metabólitos secundários presentes em fungos endofíticos justifica-se à medida que essas substâncias podem contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de doenças, em especial, doenças negligenciadas, como a malária, de alta ocorrência regional.

## Material e métodos

As frutas regionais açaí do Amazonas (*Euterpe precatoria*), bacuri (*Platonia insignis*), biribá (*Annona mucosa*), buriti (*Mauritia flexuosa*), maracujá do mato (*Passiflora cincinnata*), sapota do Solimões (*Matisia cordata*) e umari (*Geoffroea spinosa*) foram adquiridas na banca do Rosa (rodovia AM-010, Manaus, Amazonas). Após a aquisição, o material foi imediatamente lavado com água destilada para posterior processo de isolamento de fungos endofíticos. Para esta etapa, foram utilizadas apenas as polpas dos frutos maduros. Para sua assepsia, em uma câmara de fluxo laminar, fragmentos (5 mm x 5 mm) das polpas foram imersos em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito 2.5% por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 2 minutos (Souza *et al.*, 2004). Ao final, os fragmentos foram lavados por imersão em água destilada esterilizada e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200g de batata, 20g de dextrose e 15g de ágar) contendo o antibiótico cloranfenicol a 2%. Após o inóculo, as placas foram incubadas em BOD a 28 °C, e a cada 24 horas foi realizada a verificação do crescimento fúngico, seguido de sucessivos repiques.

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.*, 1992). As colônias puras foram preservadas conforme metodologia de Castellani (De Capriles e Middelveen, 1989) 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 óptica e as estruturas reprodutivas foram utilizadas para formar grupos de isolados. Nesta etapa, apenas uma parte das linhagens foi passível apenas de identificação ao 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 a 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 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') (Arheim *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 MgCl<sub>2</sub>; 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 nucleotídeo BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências foram depositadas no GenBank.

Inicialmente, sob condições de assepsia, os preservados da micoteca (n = 210) foram reativados em placas de Petri com a mesma composição da etapa de isolamento. Em seguida, as placas inoculadas foram armazenadas em estufas incubadoras BOD à 28 °C durante 7 dias. Em seguida, plugues circulares (diâmetro = 5 mm, n = 4) das culturas em placa foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer (125 mL) contendo diferentes fontes de carbono autoclavadas. Para esta etapa, foram utilizados o meio em arroz (30 g de arroz parboilizado tipo 1 com 20 mL de água destilada) e sucrilhos (30 g de sucrilhos Kelloggs® com 20 mL de água destilada). Esta etapa fermentativa ocorreu durante 21 dias em estufas incubadoras BOD à 28 °C.

Após este período, 60 mL de acetato de etila grau HPLC foram adicionados e todo o conteúdo foi triturado com auxílio de um moedor do tipo ultra-turrax. A mistura repousou durante 24 horas e após este período, o material foi filtrado à vácuo com auxílio de papel de filtro. Em seguida, a porção líquida contendo os metabólitos fúngicos foi centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos para remoção de esporos residuais. Ao final, o solvente foi eliminado por meio de roto-evaporação à vácuo gerando um extrato correspondente a cada fungo em sua forma específica de cultivo.

Para o cultivo de *Plasmodium falciparum* (cepa FRC3), foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 25 mM de HEPES, hipoxantina (50 mg/L), glicose (2g/L) e de gentamicina (50 mg/L) (Ljungström *et al.*, 2004). Ao meio RPMI foi adicionado 10% de soro humano tipo AB+ e eritrócitos humanos normais. A incubação foi realizada durante 72 horas em câmara de hipóxia à 37 °C em uma atmosfera contendo mistura gasosa específica (5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>) (Trager e Jensen, 1976).

Os ensaios antimaláricos foram realizados em placas de 96 poços de fundo chato, com um volume total de 100 µL, nos quais foram testadas diferentes concentrações dos extratos por meio de diluições seriadas (50 → 3,12 µg/mL). A proporção para cada poço foi de 50 µL de extrato em DMSO para 50 µL de suspensão de eritrócitos infectados por *P. falciparum* em meio RPMI (hematócrito final 2% e parasitemia 1%). O crescimento parasitário foi comparado com os controles positivo (ausência de droga), e negativo (quinina). As placas de 96 poços ficaram incubadas por 72 horas à 37 °C na mesma atmosfera utilizada anteriormente.

A verificação da parasitemia final foi realizada por citometria de fluxo em um equipamento modelo FACSCanto II. A análise das amostras foi realizada através do software Getting Started with BD FACSDiva. Como corante para a fluorescência foi utilizado o brometo de etídio. Ao final foi calculada a inibição do crescimento parasitário no software GraphPad GraphPad Prism 6 de acordo com a fórmula:

$$\%inib. = 100 - \frac{\%fluorescência amostra - \%fluorescência erit. sádios}{\%fluorescência controle - \%fluorescência erit. sádios} \times 100$$

Ao final, foram considerados ativos os extratos com inibições superiores a 70% (parasitemia ~ 3,5).

## Resultados e discussão

Um total de 210 linhagens de fungos associados às polpas de frutos Amazônicos foram isolados, o que demonstra a rica diversidade da microbiota que habita alimentos consumidos no estado do Amazonas. Dentre estas, maiores quantidades de isolados foram obtidas do açaí (n = 51) e buriti (n = 42) frutos estes com elevadas taxas de substâncias antioxidantes como antocianidinas e flavonoides no açaí e, carotenoides no buriti. O açaí, que possui a maior taxa de substâncias fenólicas entre as frutas estudadas, e logo, a fruta com maior poder antimicrobiano, foi também a que mais apresentou fungos cultiváveis. Em seguida está a polpa do biribá, da qual, 31 linhagens foram isoladas. As demais frutas tiveram um número próximo de fungos isolados (~ 20) (Figura 1). Um fato a ser mencionado é que mesmo com o

uso de cloranfenicol a 2%, cerca de 1% das placas apresentaram crescimento de bactérias endofíticas, fato este que deverá ser estudado futuramente por questões de segurança alimentar.

Cada isolado passou por processo de microcultivo para visualização de suas estruturas reprodutivas por meio de microscopia óptica. Esta etapa possibilitou a classificação dos 210 isolados em 12 diferentes grupos. Destes, 10 eram referentes a gêneros específicos, um para representantes do filo Basidiomycota e outro para os isolados não identificados (N.I.) (Figura 2). Dentre todos os isolados, destacaram-se indivíduos do gênero *Penicillium*, totalizando 44 linhagens seguidos dos grupos N.I. ( $n = 30$ ), *Aspergillus* ( $n = 29$ ) e *Trichoderma* ( $n = 25$ ).

Dentre estes, destaca-se a presença de linhagens do gênero *Aspergillus*, as quais podem ou não apresentar toxicidade por meio da produção de aflatoxinas. Menos recorrentes, grupos representados pelos gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe* e *Cladosporium* também foram isolados das polpas., Representantes do filo Basidiomycota foram encontrados com certa recorrência, especialmente nos frutos da sapota do Solimões e do açáí.

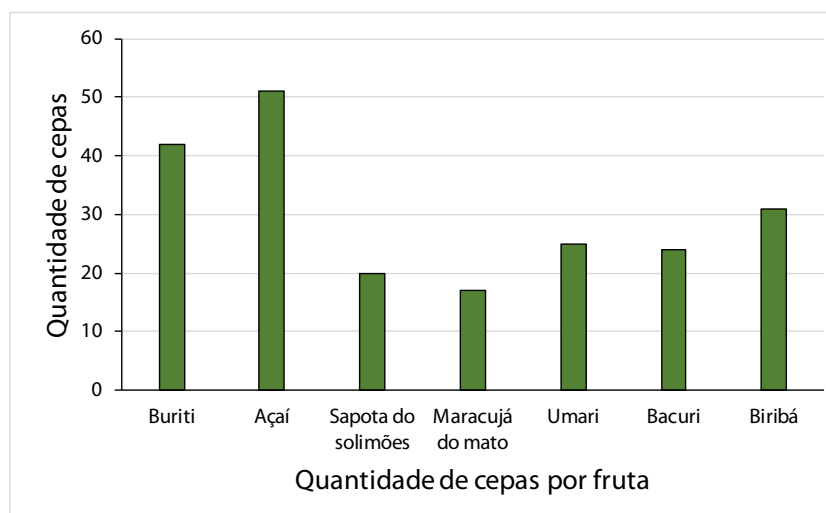


Figura 1. Identificação das frutas.

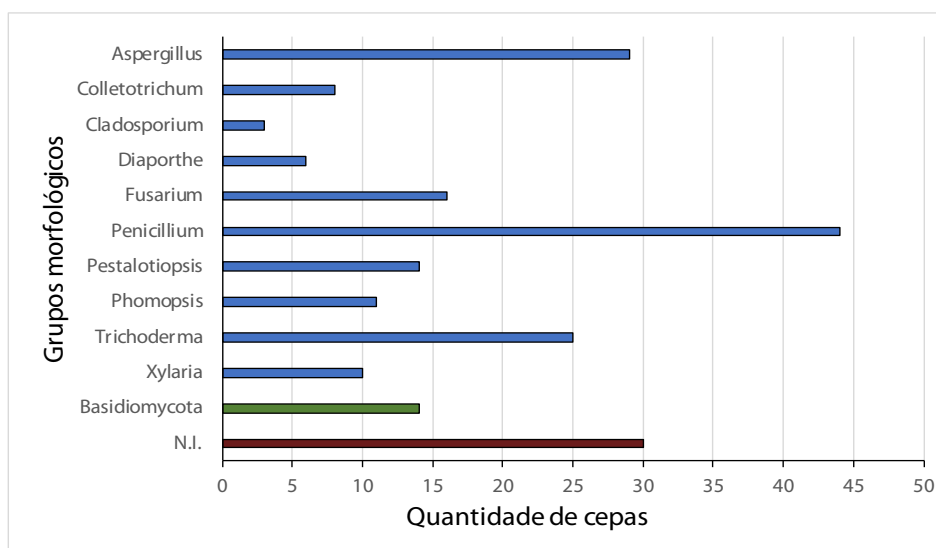


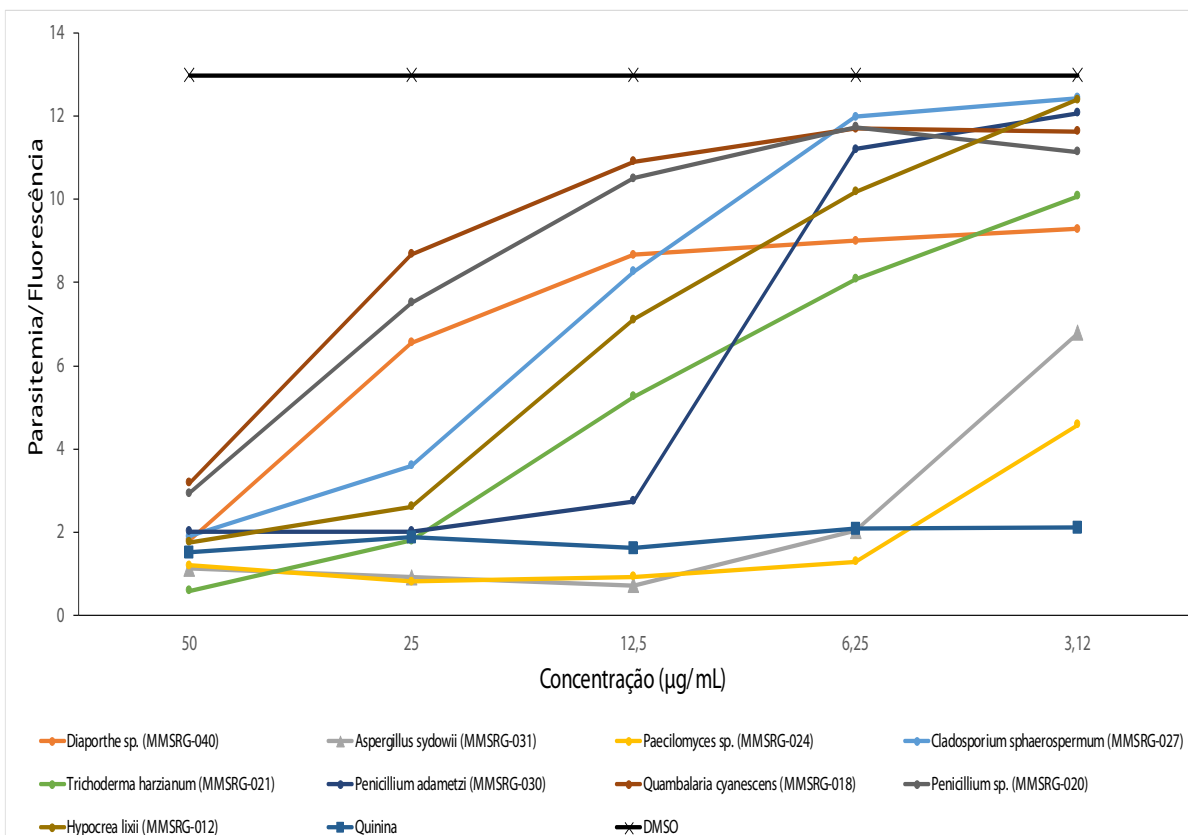
Figura 2. Distribuição das classificações em grupos ( $n = 12$ ) baseado na morfologia e análise por microscopia óptica das linhagens isoladas a partir das frutas regionais.



Os microrganismos isolados, após adequadamente preservados, foram fermentados em meios sólidos arroz e sucrilhos de modo a serem produzidos os metabólitos a serem testados. No total, 420 fermentações foram realizadas, onde observou-se que todos as linhagens apresentaram crescimento satisfatório. Em especial, o meio de sucrilhos, inédito neste trabalho, apresentou uma taxa de crescimento micelial e produção de metabólitos superior ao arroz e a meios líquidos convencionais. Isto abre possibilidades para a utilização deste meio de cultura de baixo custo, especialmente para a padronização de formulações com aditivos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos. Ao final foram excluídas as linhagens que não apresentaram produção de metabólitos adequada (rendimento < 0,01 % de extrato, m/m). Desta forma, foram selecionados 348 extratos para os testes.

Observa-se que apenas 2,6% dos extratos testados foram ativos. Desta forma, apenas as linhagens que apresentam atividade foram selecionadas para serem identificadas por ferramenta moleculares. A Figura 3 apresenta os resultados em termos da concentração inibitória mínima que resultou em pelo menos 70% de inibição, e ou parasitemia (fluorescência) entre 0 e 3,5.

Dentre as linhagens que apresentaram atividade, os fungos *Penicillium* sp. MMSRG-020, *Diaporthe* sp. MMSRG-040 e *Quambalaria cyanensis* MMSRG-018 apresentaram atividade antimalárica apenas na concentração basal de 50 µg/mL, o que caracteriza uma atividade fraca. Este último, o único representante do filo Basidiomycota de nossa coleção que apresentou atividade. Fungos deste gênero são de rara ocorrência, sendo mais descritos como patógenos do eucalipto e até mesmo como patógenos humanos (Kuan *et al.*, 2015). Este fungo apresenta brotamento de pseudo-hifas e células leveduriformes, além de ausência de corpo de frutificação, o que o mantém isolado dentro da família Quambalariaceae da classe dos Exobasidiomycetes (Simpson, 2000).



**Figura 3.** Distribuição da parasitemia em função da concentração (µg/mL) para as espécies ativas. Controle positivo quinina e controle negativo DMSO.

Os fungos *Cladosporium sphaerospermum* MMSRG-027, *Hypocrea lixii* MMSRG-012 e *Trichoderma harzianum* MMSRG-021 apresentaram potencial antimalárico moderado (25 µg/mL). Destaca-se que em estudos prévios, a substância trichodermol isolada de *T. polysporum* e *T. sporulosum* é um potencial agente antimalárico (Reino *et al.*, 2008). Além disso, o gênero *Hypocrea* é o telomorfo de *Trichoderma*, e conseqüentemente, possui potencial para produzir substâncias semelhantes, o que demanda estudo futuros.

O fungo *Penicillium adametzi* MMSRG-030 apresentou potencial elevado com inibição na concentração de 12,5 µg/mL. Diversas moléculas antimaláricas foram descritas para este gênero, em especial destacam-se as recentemente descritas: ácido puberélico e viticolinas A-C de *P. viticola* (Iwatsuki *et al.*, 2010 e os penicolinatos A-E de *Penicillium* sp. (Intaraudom *et al.*, 2013). Os fungos *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 e *Aspergillus sydowii* MMSRG-031 apresentaram elevado potencial antimalárico com inibição na concentração de 6,25 µg/mL, comparável à do fármaco quinina (1,6 µg/mL). Destes gêneros foram isoladas moléculas com elevada atividade contra *P. falciparum*, como o ciclodepsipeptídeo beuvaricina de *Paecilomyces tenuipes* (Nilanonta *et al.*, 2000) e dibenzofuranonas karnatakafuranos A e B de *A. karnatakaensis* (Manniche *et al.*, 2004). Em especial, a espécie *A. sydowii* é de rara ocorrência em ambientes terrestres sendo este encontrado como patógeno em diversos corais do caribe (Alker *et al.*, 2001).

## Conclusões

Frutos regionais comestíveis constituem uma fonte promissora de fungos endofíticos das mais diversas espécies. Destaca-se o isolamento de aproximadamente 210 linhagens dos filos Ascomycota e Basidiomycota habitando as polpas dos frutos açaí do Amazonas (*Euterpe precatória*), bacuri (*Platonia insignis*), biribá (*Annona mucosa*), buriti (*Mauritia flexuosa*), maracujá do mato (*Passiflora cincinnata*), sapota do Solimões (*Matisia cordata*) e umari (*Geoffroea spinosa*).

Grande parte das linhagens demonstrou potencial para a produção de metabólitos na forma de extratos.

O meio em sucrrilhos foi o mais promissor, pois apresentou maior pigmentação quando comparado ao meio clássico de arroz. Dentre todos os fungos ensaiados, apenas nove apresentaram potencial antimalárico.

Destacaram-se as linhagens *Paecilomyces* sp. MMSRG-024 e *Aspergillus sydowii* MMSRG-031 com dosagens mínimas de inibição de 6,25 µg/mL.

Estes resultados demonstram que fungos são promissores fontes de novas moléculas no combate a malária, bem como endofíticos de frutos do Amazonas apresentam o mesmo potencial, porém ainda inexplorado.

## Referências

- Alker AP, Smith GW, Kim K 2001. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean Sea fan corals. *The International Journal of Aquatic Sciences*, 460: 105-111.
- Amheim N, White T, Rainey WE 1990. Application of PCR: Organismal and population biology. *Bioscience*, 40(3):174-182.
- Azevedo JL, Maccheroni Jr W, Pereira JO, Araújo WL 2000. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(1):40-65.
- Carbone I, Kohn L 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3):553-556.
- De Capriles CH, Middelveen M, Mata S 1989. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*, 106:73-79.
- Doyle JJ, Doyle JL 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.
- Fabio A, Barros P, Rodrigues E, 2005. Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp. isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya peniculata* (Rutaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33:257-268.
- Harper JK, Arif AM, Ford EJ, Strobel G, Porco Jr JA, Tomer DP, Oneill KL, Heider EM, Grant DM 2003. Pestacin: a 1,3-dihydroisobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron Letters*, 59:2471-6.

- Intaraudom C, Boonyuen N, Suvannakad R, Rachtawee P, Pittayakhajonwut P 2013. Penicolinates A-E from endophytic *Penicillium* sp. BCC16054. *Tetrahedron Letters*, 54:744-748.
- Iwatsuki M, Takada S, Ishiyama A, Namatame M, Tukashima-Nishihara A, Nonaka K, Masuma R, Mori M, Shiomi K, Otaguro K, Omura S 2010. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activities of puberulic acid and its new analogs, viticolins A-C, produced by *Penicillium* sp. FKI-4410. *The Journal of Antibiotics*, 64:183-188.
- Kuan CS, Yew SM, Toh YF, Chan CL, Lim SK, Lee KW, Na SL, Hoh CC, Yee WY, Ng KP 2015. Identification and characterization of a rare fungus, *Quambalaria cyanescens*, isolated from the peritoneal fluid of a patient after nocturnal intermittent peritoneal dialysis. *Plos One*, 10(12):0145932.
- Lee JC, Lobkovsky E, Pliam NB, Strobel G, Clardy J 1995. Subglutinols A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *The Journal of Organic Chemistry*, 60:7076-7077.
- Ljungström I, Perlmann H, Schlichterle M, Scherf A, Wahlgren, M 2004. *Methods in malaria research*. 4th ed. MR4/ATCC, Manassas, Virginia.
- Manniche S, Sprogøe K, Dalsgaard PW, Christophersen C, Larsen, TO 2004. Karnatakafurans A and B: Two dibenzofurans isolated from the fungus *Aspergillus karnatakaensis*. *Journal of Natural Products*, 67:2111.
- Nilanonta C, Isaka M, Kittakoop P, Palittapongarnpim P, Kamchonwongpaisan S, Pittayakhajonwut D, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y 2000. Antimycobacterial and antiplasmodial cyclodepsipeptides from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614. *Planta Médica*, 66:756-758.
- Petrini O, Sieber TN, Toti L, Viret O 1992. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1:185-196.
- Puri SC, Nazir A, Chawla R, Arora R, Riyaz-ul-Hasan S, Amna T, Ahmed B, Verma V, Singh S, Sagar R, Sharma A, Kumar R, Sharma RK, Qazi GN 2006. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related tetralin lignans. *Journal of Biotechnology*, 122(4):494-510.
- Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Galán R, Collado IG 2008 Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7:89-123.
- Simpson JA 2000. *Quambalaria*, a new genus of eucalypt pathogens. *The Australasian Mycologist Society*, 19(2):57-62.
- 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 amazônica*, 34:185-195
- Specian V, Orlandelli RC, Felber AC, Azevedo JL, Pamphilea JA 2014. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos. *Journal of Health Sciences*, 16(4):345-51
- Strobel G, Daisy B 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4):491-502.
- Trager W, Jensen JB 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science Magazine*, 193:673-675.