

Comparação da citotoxicidade de *Poincianella pyramidalis* e de seu fungo endofítico *Penicillium* sp. em macrófagos da linhagem J774

Joice Fragoso Oliveira de Araujo^{1*}, Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão², Adriana Reis Todaro¹, Anderson Brandão Leite³, Eliane Aparecida Campesatto³, Thais Honório Lins Bernardo¹, Maria Lysete de Assis Bastos¹

¹Universidade Federal de Alagoas, Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, 57072-900, Maceió, Brasil

²Universidade Federal de Alagoas, Laboratório de Microbiologia Clínica, Av. Lourival Melo Mota, s/n, 57072-900, Maceió, Brasil

³Universidade Federal de Alagoas, Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Av. Lourival Melo Mota, s/n, 57072-900, Maceió, Brasil

*Autor para correspondência: joicefragoso_@hotmail.com

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica do extrato etanólico da planta *Poincianella pyramidalis* e do extrato em acetato de etila do caldo de fermentação do fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado da referida espécie vegetal. Tratou-se de pesquisa básica do tipo experimental *in vitro* com abordagem quantitativa. A pesquisa foi constituída de ensaios de análise macroscópica associada à análise microscópica para identificar a taxonomia do fungo isolado, e ensaio de viabilidade celular para avaliar a atividade citotóxica pelo método colorimétrico metiltetrazólio (MTT) com macrófagos da linhagem J774. No ensaio do MTT, os dois extratos testados com a linhagem de macrófagos J774 mostraram-se atóxicos em todas as concentrações. Conclui-se que a planta medicinal *P. pyramidalis* abriga o fungo endofítico *Penicillium* sp. e os mesmos não apresentaram toxicidade significativa quando testados no ensaio do MTT.

Palavras-chave: *Poincianella pyramidalis*, *Penicillium*, citotoxicidade

ABSTRACT: Comparison of the cytotoxicity of the medicinal plant *Poincianella pyramidalis* and the endophytic fungus *Penicillium* sp. in macrophages of the J774 lineage. The aim of the present study was to evaluate the cytotoxic activity *in vitro* of the ethanolic extract of the plant *Poincianella pyramidalis* and of ethyl acetate extracts from the fermentation broth of endophytic fungi *Penicillium* sp. isolated from *P. pyramidalis*. This was a basic *in vitro* experimental research with a quantitative approach. The research consisted of macroscopic analysis assays associated with microscopic analysis to identify the taxonomy of isolated fungi as well as cell viability assay to evaluate the cytotoxic activity by the colorimetric method Methyltetrazolium (MTT) with macrophages of the J774 lineage. In the cytotoxic assay, the two extracts tested with the J774 macrophages strain proved to be non-toxic in all concentrations tested (100, 10 e 1 µg/mL). It is concluded that the medicinal plant *P. pyramidalis* harbor endophytic fungi *Penicillium* sp. and the fungal extract and ethanolic extract of the plant that were tested did not present deleterious effects to J774 macrophages.

Keywords: *Poincianella pyramidalis*, *Penicillium*, cytotoxicity.

INTRODUÇÃO

Comumente, o uso terapêutico das plantas é conhecido pela sabedoria popular. No entanto, este uso deve basear-se não apenas na observação, mas também nos resultados da experimentação científica (Aversi-Ferreira et al. 2013).

Na vasta flora do Brasil, existe a

caatinga, bioma unicamente brasileiro que pode ser caracterizado como florestas arbóreas ou arbustivas, compreendendo principalmente árvores e arbustos baixos muitos dos quais apresentam espinhos, microfilia e algumas características xerofíticas. Dentre as espécies lenhosas mais típicas da vegetação da caatinga está a *Poincianella*

Recebido para publicação em 16/04/2018

Aceito para publicação em 15/07/2022

Data de publicação em 20/07/2022

ISSN 1983-084X

© 2020 Revista Brasileira de Plantas Medicinais/Brazilian Journal of Medicinal Plants.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

pyramidalis (Tul.) L.P. Queiroz (“catingueira”, Caesalpiniaceae) (Leal et al. 2003).

P. pyramidalis (sín. *Caesalpinia pyramidalis* Tul.) é uma árvore pertencente à família Caesalpiniaceae, que é endêmica do Nordeste do Brasil (Oliveira 2013), e tem como característica predominante sua resistência à seca (Leal et al. 2003).

A busca por compostos produzidos por micro-organismos tem uma história mais recente que a dos produtos derivados de plantas. A descoberta da penicilina por Fleming em 1929, levou pesquisadores acadêmicos e indústrias farmacêuticas a procurar intensivamente produtos bioativos derivados de micro-organismos, e esta busca produtiva resultou em um grande número de fármacos com uma variedade de indicações terapêuticas (Gallo et al. 2009).

A existência de micro-organismos dentro dos órgãos de plantas de forma assintomática tem sido conhecida desde o final do século XIX (Guerin 1898), e desde então, todas as espécies de plantas investigadas neste aspecto, abrigaram pelo menos um micro-organismo endofítico (Kusari 2012). Historicamente, de todos os micro-organismos estudados, os fungos têm sido reconhecidos como um dos produtores de metabólitos secundários mais promissores. Tem sido sugerida a essencialidade dos fungos para a saúde e prosperidade de todos os ecossistemas terrestres, devido a eficácia dos mesmos para sustentabilidade e biodiversidade destes ecossistemas (Gunatilaka 2006).

Os fungos endofíticos são micro-organismos que habitam os tecidos internos das plantas (Martinez-Klimova 2017), possuem uma grande diversidade de estruturas químicas e metabólitos com atividade biológica única, são um recurso promissor para novas descobertas nas ciências e têm o potencial de fornecer agentes terapêuticos para muitas doenças (Wang et al. 2011). Dados da literatura tem reportado a habilidade dos fungos endofíticos em produzir metabólitos secundários idênticos aos de sua planta hospedeira (Strobel 1996). O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade de extratos da planta *P. pyramidalis* e de seu fungo endofítico *Penicillium* sp., para fins de comparação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento do fungo endofítico

Após a coleta, as amostras das folhas de *P. pyramidalis* foram lavadas suavemente em água corrente para remover os pós e detritos. As amostras foram desinfetadas na superfície pelo método de Dobranic et al. (1995), sendo imersas em etanol a 70% por 5 segundos, seguidas por

imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 4% por 90 segundos e depois lavadas em água destilada estéril por 10 segundos. Em seguida, com o auxílio de uma tesoura autoclavada, foram cortados quatro segmentos de 01 cm das folhas e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA).

O material biológico foi incubado em temperatura ambiente (28 ± 1 °C) e observado diariamente. Conforme ocorria a formação dos micélios ao redor dos segmentos das folhas, estes, eram transferidos para outras placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura. Para o isolamento total dos fungos, foram feitos vários repiques até a obtenção de cultura pura.

Identificação do fungo endofítico

O procedimento de identificação foi realizado em duas etapas, na primeira foram observadas características macroscópicas em meio de cultura BDA, como coloração, diâmetro das colônias, textura e comparadas com a literatura (Domsch et al. 1980).

Na etapa seguinte foi realizado o microcultivo em lâminas (Riddel 1950), onde foram transferidos três segmentos do fungo a ser identificado e cobertos com lamínulas, sendo retiradas após o tempo de crescimento satisfatório de cada fungo, e com leitura realizada no período de 3, 7 e 10 dias, seguido de posterior análise em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200). Aspectos micromorfológicos auxiliaram na classificação, com auxílio de chaves taxonômicas padrão (De Hoog et al. 2000), e avaliando a presença ou ausência de estruturas reprodutivas.

Preparo dos extratos

Espécie vegetal *Poicniana pyramidalis*

A espécie vegetal *P. pyramidalis* foi coletada em Delmiro Gouveia-AL em novembro de 2016, identificada pela botânica Rosângela Pereira de Lyra Lemos do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas e a exsiccata está depositada no Herbário do referido instituto com numeração MAC 63736.

O material vegetal das folhas de *P. pyramidalis*, após secagem à temperatura ambiente e trituração, foi extraído por meio de maceração, com o solvente etanol em grau absoluto. Após concentração da solução em evaporador rotativo na temperatura máxima de 40 °C com 120 rotações por minuto e secagem a temperatura ambiente, foi obtido o extrato etanólico bruto.

Fungo endofítico *Penicillium* sp.

O fungo endofítico *Penicillium* sp. (isolado de *P. pyramidalis*) foi retirado de armazenamento em placas de Petri com meio de cultura BDA e cultivado em erlenmeyers contendo 100 ml de meio líquido

de Batata e Dextrose (BD), incubado a 28 °C em repouso, e o cultivo foi conduzido por um período de até 30 dias. Em seguida, a massa micelial do fungo foi separada por filtração, passando-se duas vezes consecutivas em papel de filtro estéril. A fase líquida da cultura, agora denominada caldo de cultivo fermentado, foi submetida ao processo de extração líquido-líquido com acetato de etila (2:1). A seguir, o caldo de cultivo fermentado foi concentrado em evaporador rotativo a 40 °C, até eliminação do solvente, e obtenção do extrato em acetato de etila do caldo de cultivo fermentado de *Penicillium* sp.

Ensaio Colorimétrico do Metiltetrazolium

Para a determinação da citotoxicidade das amostras foi realizado o método colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT) (Mosmann 1983). Macrófagos da linhagem J774 foram mantidos em garrafas de cultura em 10 ml de meio Rosswel Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10 % em estufa de dióxido de carbono (CO₂). No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB.

Os macrófagos foram colocados em placas de 96 poços com uma densidade de 2 x 10⁵ células por poço cultivados em meio Dulbecco Mem (DMEM) suplementado com 10 % de SFB. Cada poço foi preenchido com 200 µl do meio com as células.

As células foram tratadas com os extratos da planta e do caldo de cultivo fermentado de *Penicillium* sp. nas concentrações de 100, 10 e 1 µg/ml por 48 h e mantidas em estufa a 5,0% de CO₂. Uma hora antes de adicionar o MTT, as células de três poços foram lisadas com 2 µl de Triton 100X para comparação de morte celular.

Como controle positivo foram utilizados poços com células mortas e como controle negativo células cultivadas crescidas do diluente DMSO. Após o período de incubação total (48 h), o sobrenadante foi descartado e em cada cavidade foi adicionado 100 µl de uma solução de MTT (500 µg/ml) e reincubadas por 1 hora em estufa a 37,0 °C e a 5,0% de CO₂. Após esse período o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado com 100 µl de DMSO.

Para a quantificação do sal tetrazólio reduzido a cristais de formazan, as placas foram lidas com o auxílio de um leitor de microplacas no comprimento de onda 550 nm. Para obtenção dos resultados, a média das absorbâncias e diferenças estatísticas entre os grupos tratados e os de controle foram avaliados pelo teste Dunnett e ANOVA e identificados por um, dois ou três asteriscos (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001) os níveis de significância em comparação com o grupo controle.

RESULTADOS

Fungo endofítico isolado

Após o crescimento micelial em meio sólido, procedeu-se o isolamento do material microbiológico por vários repiques até o isolamento de um único micro-organismo fúngico. Como resultado, foi obtido um micro-organismo endofítico isolado de *P. pyramidalis*, e para assegurar que o fungo estava isolado, foram realizados sucessivos repiques a fim de eliminar qualquer micro-organismo contaminante e obter o fungo objeto deste estudo purificado na placa para seguir com o preparo dos extratos.

Identificação macroscópica e microscópica

O fungo endofítico isolado de *P. pyramidalis* macroscopicamente apresentou colônias filamentosas pulverulentas de coloração verde acinzentado em sua região central e bordas de coloração verde escura (Figura 1).

À microscopia, o mesmo fungo apresentou conidióforos ramificados e conídios distribuídos sobre as fiáides em forma de cadeias (Figura 2), possibilitando desta forma a identificação do gênero do fungo endofítico *Penicillium* sp. (Onions 1987), quando comparado com a literatura especializada. Pequenos fragmentos contendo hifas foram depositados em lâminas, coradas com azul de lactofenol algodão e examinados ao microscópio óptico (160x).

Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT

Ao analisar o gráfico da citotoxicidade quando comparadas às células tratadas com DMSO (grupo controle), o extrato do fungo endofítico isolado da *P. pyramidalis*, apresentou-se atóxico



Figura 1. Fungo endofítico isolado de *Poincianella pyramidalis*.

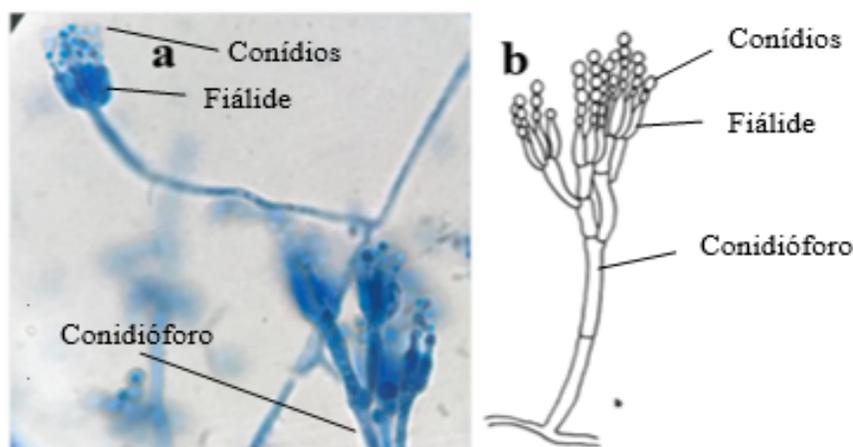


Figura 2. Microscopia óptica do fungo endofítico *Penicillium* sp. (160 x) corado com azul de lactofenol algodão, isolado de *Poincianella pyramidalis* em comparação com literatura especializada. Fonte: a) Autora, 2018; b) Adaptado de Onions (1987).

(Figura 3). Não se observou efeitos deletérios nas células tratadas, nas três concentrações testadas, com viabilidade celular de 122,66%, 133,73% e 177,53% nas concentrações de 100, 10 e 1 µg/ml, respectivamente. Frente a estes resultados considera-se que este extrato exibiu acentuada proliferação celular.

O extrato da planta *P. pyramidalis* não apresentou citotoxicidade significativa quando testado frente aos macrófagos J774, de modo que na concentração de 100 µg/ml apresentou viabilidade celular de 98,62%, e nas concentrações de 10 e 1 µg/ml apresentou viabilidade celular de 116,80% e 92,94%, respectivamente.

DISCUSSÃO

Aproximadamente, estima-se que mais de um milhão de estirpes fúngicas endofíticas

diferentes habitam cerca de 300 mil espécies de plantas diversas. A hiperdiversidade dos fungos endofíticos deriva de que cada espécie de planta individual pode ser colonizada com uma ou mais cepas de fungos (Huang et al. 2007). No presente estudo foi isolado um fungo endofítico da planta medicinal *P. pyramidalis*.

O fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado a partir de *P. pyramidalis*, macroscopicamente apresentou-se como colônias filamentosas pulverulentas de coloração verde acinzentado e à microscopia óptica apresentou conidióforos ramificados e conídios distribuídos sobre as fiálides em forma de cadeias, características pertencentes a esse gênero de fungos, de acordo com os manuais de identificação para *Penicillium* descritos por Pitt (2000) e Pitt e Hocking (1997). No entanto, não foi possível realizar a identificação da espécie do presente endofítico somente com

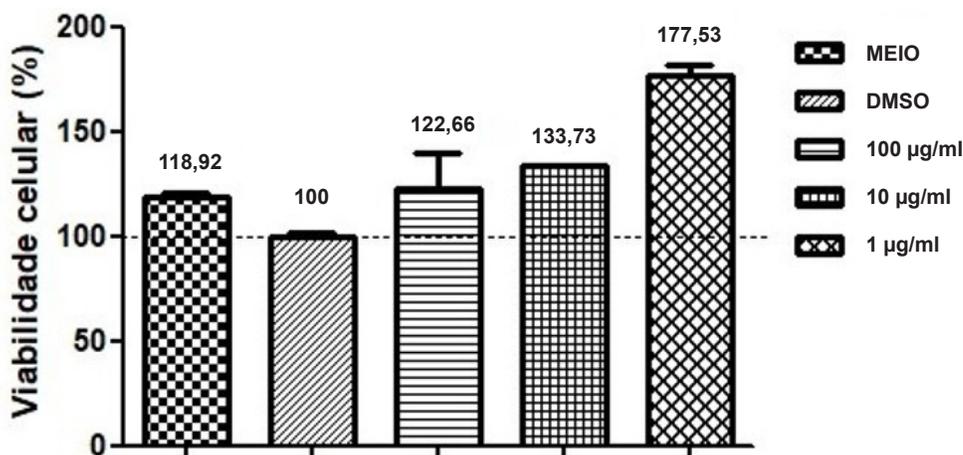


Figura 3. Viabilidade celular do extrato em acetato de etila de *Penicillium* sp. isolado de *Poincianella pyramidalis*. Legenda: Os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis em comparação ao grupo controle. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Dunnet, (controle vs. tratamento).

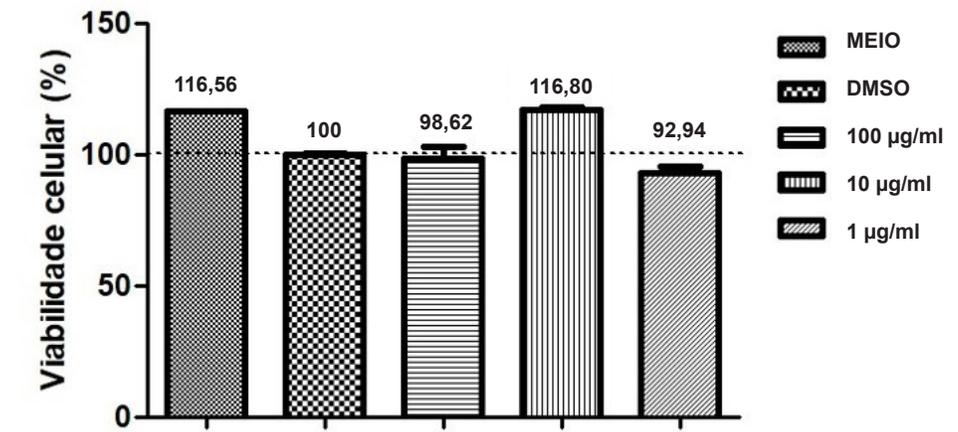


Figura 4. Viabilidade celular do extrato etanólico de *Poincianella pyramidalis*. Legenda: Os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis em comparação ao grupo controle. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Dunnet, (controle vs. tratamento).

base nas características morfológicas e chaves de identificação.

O gênero *Penicillium* abrange inúmeras espécies distintas, com características semelhantes, fato este que muitas vezes dificulta a identificação da espécie com precisão baseado apenas na caracterização morfológica e chaves de identificação. Visagie e colaboradores (2014), listaram as espécies descritas corretamente de *Penicillium* e até a data da publicação do estudo, o gênero *Penicillium* apresentava 354 espécies. Estudo realizado por Pereira (2016) isolou 68 espécies do gênero *Penicillium*, dentre essas espécies, 43 morfotipos de *Penicillium* não foram identificados com base nas características morfológicas, pois possuíam características muito distintas das encontradas nas chaves de identificação e artigos pesquisados. A exemplo disto, o complexo *Penicillium sclerotiorum* apresenta 29 espécies bastante semelhantes que podem aduzir possíveis erros na identificação (Rivera e Seifert 2011).

A dificuldade encontrada na identificação das espécies de *Penicillium* com base na morfologia torna necessária a busca de novas ferramentas que venham complementar a taxonomia clássica. Neste contexto, cada vez mais tem-se utilizado técnicas modernas tais como a microscopia eletrônica de varredura, que visualiza detalhes da estrutura reprodutora do fungo e a biologia molecular, considerada o “padrão de ouro” da taxonomia (Samson e Frisvad 2004). Na realidade, isto significa que é recomendável combinar a análise tradicional fenotípica com abordagens fisiológicas modernas e biologia molecular, a chamada taxonomia polifásica, para a identificação precisa das espécies (Rodrigues et al. 2011).

Espécies pertencentes ao gênero *Penicillium*

sp. têm sido utilizadas como modelo em estudos básicos, porém muitas pesquisas aplicadas têm demonstrado o seu enorme potencial biotecnológico, algumas espécies podem ser utilizadas no biocontrole (De Stefano et al. 1999; Guijarro et al. 2008; Mmbaga et al. 2008), micoparasitismo (Larena et al. 2003; Sabuquillo et al. 2006) e seus metabólitos secundários são de interesse para diversas indústrias, especialmente como fontes de novos fármacos para a indústria farmacêutica (Zeng et al. 2005; Nicoletti, 2008).

Os metabólitos secundários produzidos por endofíticos podem ser idênticos ou semelhantes aos sintetizados por suas plantas hospedeiras. O primeiro caso foi relatado com a descoberta do composto anticancerígeno paclitaxel (taxol). O taxol, até então, era encontrado e extraído somente da planta *Taxus brevifolia* Nutt. (Ledwitch et al. 2013), até que Stierle et al. (1993) isolaram este composto de um endofítico desta planta, o fungo *Taxomyces andreanae*.

No que diz respeito à atividade citotóxica do extrato etanólico da planta *P. pyramidalis* e do extrato de acetato de etila do caldo fermentado de *Penicillium* sp., isolado da referida espécie vegetal não apresentaram efeitos deletérios frente aos macrófagos J774 nas três concentrações testadas (100, 10 e 1 µg/ml), quando tratados com as amostras do estudo, visualizando-se que quanto menor a concentração da amostra, maior o índice de proliferação celular.

Alvin et al. (2014) apontaram que as moléculas produzidas por endófitos são menos propensas a serem tóxicas para os eucariontes, pois não prejudicam o seu hospedeiro (a planta que o abriga), entretanto, também é possível que os compostos bioativos produzidos pelos fungos

endofíticos não prejudiquem a planta que os abriga pelo fato de a própria planta produzir esses mesmos compostos bioativos ou compostos similares, e, portanto, tais compostos são bem tolerados pelas mesmas. A partir dos resultados do presente estudo, é possível afirmar em relação a citotoxicidade, a planta medicinal *P. pyramidalis* e o seu fungo endofítico *Penicillium* sp. demonstraram resultados semelhantes, o que sugere que os mesmos produzam metabólitos secundários similares.

AGRADECIMENTOS

À botânica Rosângela Pereira de Lyra Lemos pela identificação botânica do material vegetal. À agência colaboradora Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos a Joice Fragoso Oliveira de Araujo.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- Alvin A, Miller KI, Neilan BA (2014) Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiol Res* 169(7-8):483-495. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.12.009>.
- Aversi-Ferreira TA, Ribeiro PP, Silva NC, Brandão LD, Gratão LH, Nyamdavaa E, Aversi-Ferreira RA, Nishio H, Nascimento GNL (2013). Confrontation between ethnopharmacology and scientific results of the herbal medicaments from Brazil to be applied in primary health care. *J Med Plants Res* 7(14):845-856. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.392>
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Ahmed SA, Al-Hatmi AMS, Figueras MJ, Vitale RG (2000) Atlas of clinical fungi. Utrecht: Centraalbureau voor schimmelcultures. 1126p.
- De Stefano S, Nicoletti R, Milone A, Zambardino, S (1999) 3-O-Methylfunicone, a fungitoxic metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum*. *Phytochemistry* 52:1399-1401. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00320-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00320-9)
- Dobranic JK, Johnson JA, Alikhan QR. (1995). Isolation of endophytic fungi from eastern larch (*Larix laricina*) leaves from New Brunswick, Canada. *Can J Microbiol* 41:194-198. <https://doi.org/10.1139/m95-026>
- Domsch KH, Gams W, Traute-Heidi A (1980) Compendium of Soil Fungi. New York: APS Press. 859p.
- Gallo MBC, Chagas FO, Almeida MO et al. (2009). Endophytic fungi found in association with *Smilax sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. *J Basic Microb* 49:142-151. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800093>
- Guerin P (1898) Sur la presence d'un champignon dans l'ivraie. *Journal Botanique* 12:230-238.
- Guijarro B, Melgarejo R, Torres P, Lamarca N, Usall J, De Cal A (2008) *Penicillium* frequentans population dynamics on peach fruits after its applications against brown rot in orchards. *J Appl Microbiol* 104:659-671. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03596.x>
- Gunatilaka AAL (2006) Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J Nat Prod* 69:509-526. <https://doi.org/10.1021/np058128n>
- Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, Cork H, Sun M (2007) Endophytic fungi from *Nerium oleander* (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1253-1263. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9357-z>
- Kusari S, Hertweck C, Spiteller M (2012) Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chem Biol* 19:792-798. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004>
- Larena P, Sabuquillo P, Melgarejo A, De Cal J (2003) Biocontrol of *Fusarium* and *Verticillium* wilt of Tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field conditions. *Phytopathology* 151:507-512. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00762.x>
- Leal IR, Tabarelli M, Silva JMC, Barros MLB (2003) Ecologia e conservação da caatinga. Recife:Ed. Universitária da UFPE. 822 p.
- Ledwith K, Ogburn R, Cox J, Graham R, Fritzsche A, Gosnell D, Manning T (2013) Taxol: efficacy against oral squamous cell carcinoma. *Mini Rev in Med Chem* 13(4):509-521. <https://doi.org/10.2174/1389557511313040004>
- Martinez-Klimova E, Rodríguez-Peña K, Sánchez S (2017) Endophytes as sources of antibiotics. *Biochem Pharmacol* 134:1-17. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.010>
- Mmbaga MT, Sauve RJ, Mrema FA (2008) Identification of microorganisms for biological control of powdery mildew in *Cornus florida*. *Biol Control* 44:67-72. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.10.018>
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Nicoletti R, Buommino E, De Filippis A, Lopez-Gresa MP, Manzo E, Carella A, Petrazzuolo M, Tufano MA (2008) Bioprospecting for antagonistic *Penicillium* strains as a resource of new antitumor compounds. *World J Microbiol Biotechnol* 24:189-195. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9455-y>
- Oliveira RC (2013) List of Angiosperm species of the riparian vegetation of the Apodi-Mossoró river, Rio Grande do Norte, Brazil. *Check List* 9:740-751. <https://doi.org/10.15560/9.4.740>
- Pereira VM (2016) Diversidade, riqueza e composição dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* de solos do quadrilátero ferrífero. 222 p. Thesis (PhD - Concentration area in Agricultural Microbiology) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais, Brazil.
- Pitt JI (2000) A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC, 197 p.
- Pitt JI, Hocking AD (1997) Fungi and food spoilage. 2nd

- ed. London: Blackie Academic and Professional. 540 p.
- Riddell RW (1950) Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia* 1(42):265-270. <https://doi.org/10.1080/00275514.1950.12017830>
- Rivera KG, Seifert KA (2011) A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. *Stud Mycol* 70:139-158. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.03>
- Rodrigues, P, Santos C, Venâncio A, Lima N (2011) Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *J Appl Microbiol* 111:877-892. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05116.x>
- Sabuquillo P, De Cal P, Elgarejo MA (2006) Biocontrol of tomato wilt by *Penicillium oxalicum* formulations in different crop conditions. *Biol Control* 37:256-265. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.02.009>
- Samson RA, Frisvad JC (2004) Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud Mycol* 49:1-174.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D (1993) Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260:214-216. <https://doi.org/10.1126/science.8097061>
- Strobel GA, Hess WM, Ford E, Sidhu RS, Yang X (1996) Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. *J Ind Microbiol Biot* 17:417-423. <https://doi.org/10.1007/BF01574772>
- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Varga J, Yaguchi T, Samson RA (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol*, 78:343-371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Wang LW, Zhang YL, Lin FC, Hu YZ, Zhang CL (2011) Natural products with antitumor activity from endophytic fungi. *Mini Rev Med Chem* 11:1056-1074. <https://doi.org/10.2174/138955711797247716>
- Zeng SR, Xu QW, Ye BT, Ke Y, Fang BY, Huang XM (2005) Isolating of endophytic fungi from five medicinal plants and screening of their antibacterial activities. *J Fung Res* 3:24-26.