

Prospecção enzimática e atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* isoladas do Bioma Amazônico

Enzyme prospection and antimicrobial activity of *Penicillium* species isolated from the Amazon Biome

DOI:10.34117/bjdv7n7-603

Recebimento dos originais: 29/06/2021

Aceitação para publicação: 29/07/2021

Genésio Pontes Batista Junior

Bacharel em Biomedicina

Instituição: Faculdade Estácio do Amazonas

Endereço: Rua Av. Constantino Nery, 3693, Chapada, 69025-315, Manaus - AM

E-mail: genesiojr9@gmail.com

Kemily Nunes da Silva

Bacharel em Engenharia de Bioprocessos

Instituição: Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz Amazonas

Endereço: Rua Terezina, 476, Adrianópolis, 69057-070, Manaus - AM,

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7645-3098>

E-mail: kemilysilva23@hotmail.com

Paulo Alexandre Lima Santiago

Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia

Instituição: Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Endereço: Avenida da Amizade, 74, Centro, 69640-000, Tabatinga - AM

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-1940-7447>

E-mail: psantiago@uea.edu.br

Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago

Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia

Instituição: Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Endereço: Av. Carvalho Leal, 1777, Cachoeirinha, 69065-001, Manaus - AM

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-6943-8436>

E-mail: srhrael@hotmail.com

Ketlen Christine Ohse

Doutora em Biotecnologia

Instituição: Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz Amazonas

Endereço: Rua Terezina, 476, Adrianópolis, 69057-070, Manaus - AM

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7756-7724>

E-mail: ketlenohse@gmail.com

Salomão Rocha Martim

Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia

Instituição: Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz Amazonas/ Universidade Nilton Lins

Endereço: Rua Terezina, 476, Adrianópolis, 69057-070, Manaus – AM/ Av. Prof. Nilton Lins, 3259, Flores, 69058-030, Manaus - AM
Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0789-2411>
E-mail: salomao.martim@gmail.com

Priscila Ferreira de Aquino

Doutora em Bioquímica

Instituição: Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz Amazonas
Endereço: Rua Terezina, 476, Adrianópolis, 69057-070, Manaus - AM
Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-2344-0493>
E-mail: priscila.aquino@fiocruz.br

RESUMO

Os fungos são utilizados em processos fermentativos para obtenção de diferentes biocompostos. Espécies de *Penicillium* vêm se destacando por serem fontes de biocatalisadores e compostos antimicrobianos de interesse industrial. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de enzimas e antimicrobianos por três espécies de *Penicillium* pertencentes ao acervo da Coleção de Fungos da Amazônia, do Instituto Leônidas e Maria Deane. A autenticação das culturas de *P. citrinum* CFAM 47, *P. oxalicum* CFAM 1311 e *P. purpurogenum* CFAM214 foi feita com base nas características macro e micromorfológicas. A avaliação da síntese de amilase, celulase e protease foi realizada em meio de cultivo sólido. Os halos de degradação foram medidos com régua graduada e os resultados expressos em milímetros. A atividade enzimática foi determinada pelo índice de atividade enzimática (IAE). Para avaliação da síntese de antimicrobianos, os fungos foram cultivados nos seguintes meios líquidos: batata dextrose (BDL), extrato de levedura sacarose (YES), International Streptomyces Project 2 (ISP2) e Sabouraud (SB). O bioprocesso foi conduzido a 28 °C por 15 dias, em condições estacionárias. Os extratos obtidos do cultivo submerso foram testados contra leveduras (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*), bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). *Penicillium purpurogenum* CFAM214 foi o produtor significativo de amilase (54,30 mm). As três espécies sintetizaram proteases, sem diferença significativa entre os tamanhos dos halos de hidrólise. Nas condições avaliadas, as espécies de *Penicillium* não produziram celulases. *Penicillium citrinum* CFAM 47 apresentou IAE (1,24) significativo para amilase. Em relação à atividade proteolítica, não foi observada diferença significativa entre os IAE. O extrato de *P. purpurogenum* CFAM214 apresentou atividade contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *E. faecalis*. *Penicillium citrinum* CFAM 47 cultivado em SB e *P. oxalicum* CFAM 1311 mantido em ISP2 e YES também demonstraram ação contra *C. tropicalis*. Não foi observada atividade dos extratos frente a *E. coli* e *P. aeruginosa*. Logo, verifica-se que as espécies de *Penicillium* avaliadas demonstram ser fontes renováveis de enzimas e compostos antimicrobianos com potencial aplicabilidade industrial.

Palavras-Chave: Amazônia, Biocatalisadores, Compostos Bioativos, Fungos Filamentosos Anamórficos.

ABSTRACT

Fungi are used in fermentative processes to obtain different biocompounds. *Penicillium* species have been highlighted as sources of biocatalysts and antimicrobial compounds of industrial interest. The objective of this work was to evaluate the production of enzymes

and antimicrobials by three species of *Penicillium* belonging to the Amazon Fungi Collection of the Leonidas and Maria Deane Institute. The authentication of *P. citrinum* CFAM 47, *P. oxalicum* CFAM 1311 e *P. purpurogenum* CFAM214 cultures was done based on macro and micromorphological characteristics. The evaluation of amylase, cellulase and protease synthesis was performed in solid culture medium. The degradation halos were measured with a graduated ruler and the results expressed in millimeters. The enzymatic activity was determined by the Enzyme Activity Index (EAI). To evaluate the synthesis of antimicrobials, the fungi were cultivated in the following liquid media: potato dextrose (BDL), sucrose yeast extract (YES), International Streptomyces Project 2 (ISP2) and Sabouraud (SB). The bioprocess was conducted at 28 °C for 15 days under stationary conditions. The extracts obtained from the submerged culture were tested against yeasts (*Candida albicans* and *Candida tropicalis*), Gram-positive bacteria (*Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). *Penicillium purpurogenum* CFAM214 was the significant producer of amylase (54.30 mm). The three species synthesized proteases, with no significant difference between the sizes of the hydrolysis halos. Under the conditions evaluated, *Penicillium* species did not produce cellulases. *Penicillium citrinum* CFAM 47 showed significant EAI (1.24) for amylase. Regarding proteolytic activity, no significant difference was observed between the EAIs. The extract of *P. purpurogenum* CFAM214 showed activity against *C. albicans*, *C. tropicalis* and *E. faecalis*. *Penicillium citrinum* CFAM 47 cultivated in SB and *P. oxalicum* CFAM 1311 maintained in ISP2 and YES also demonstrated action against *C. tropicalis*. No activity of the extracts was observed against *E. coli* and *P. aeruginosa*. Thus, the evaluated *Penicillium* species show to be as renewable sources of enzymes and antimicrobial compounds with potential industrial applicability.

Keywords: Amazon, Biocatalysts, Bioactive Compounds, Anamorphic Filamentous Fungi.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Penicillium* é constituído por mais de 400 espécies de fungos microscópicos que são encontrados no solo, na vegetação, no ar, em produtos alimentícios e em ambientes marinhos (YIN et al., 2017; GONÇALVES et al., 2019). Na natureza, esses microfungos possuem atuação significativa na decomposição de materiais orgânicos (VISAGIE et al., 2014).

Espécies de *Penicillium* vêm sendo amplamente utilizadas em processos biotecnológicos porque são microrganismos de ocorrência frequente, possuem facilidade para se adaptar e crescer em diferentes meios de cultivo, além de sintetizarem biocompostos com aplicações em diferentes setores industriais (PARK et al., 2019). *Penicillium* sp. também são usadas na produção de biogás, vitaminas, álcool, pigmentos, queijos e em processos de biorremediação (ALI et al., 2016).

A síntese de diferentes enzimas constitui outra importante aplicação biotecnológica desses fungos (FAÚNDEZ et al., 2019). Entre os biocatalisadores de interesse industrial sintetizados por *Penicillium* destacam-se amilase, celulase e protease que são comumente utilizadas nas indústrias de laticínios, panificação, bebidas, detergentes, papel e celulose (SINGH et al., 2016). *Penicillium citrinum* e *Penicillium oxalicum* são fontes naturais de celulase e proteases (ORWA et al., 2020) e, *P. purpurogenum* sintetiza enzimas amilolíticas em meio de cultivo sólido (SALEEM; EBRAHIM, 2014).

Penicillium também possui importância histórica na área de medicamentos. A penicilina sintetizada por *Penicillium notatum* constituiu em um avanço significativo no tratamento de diversas doenças de origem bacteriana (JAKUBCZYK; DUSSART, 2020). O crescimento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* foi inibido por *Penicillium purpurogenum* MM (SHAABAN; EL-METWALLY; LAATSCH, 2016). *Penicillium verruculosum* MKH7 sintetizou compostos bioativos contra *C. albicans* (TALUKDAR et al., 2016) e *P. citrinum* apresentou atividade inibitória contra *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Aeromonas hydrophila* (KUMARI et al., 2021).

De acordo com Cavalcante, Campos e Lima (2020), microfungos isolados da Amazônia são fontes promissoras de compostos bioativos de interesse industrial. Para suprir a demanda comercial por biocatalisadores e a necessidade crescente por antibióticos ativos contra patógenos multirresistentes, pesquisas são necessárias para encontrar novas fontes desses biocompostos. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a produção de enzimas e antimicrobianos de interesse industrial por espécies de *Penicillium* isoladas do bioma amazônico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS

Nesta pesquisa foram utilizados *P. citrinum* CFAM 47, *P. oxalicum* CFAM 1311 e *P. purpurogenum* CFAM 214, e que foram isolados de diferentes ambientes Amazônicos (solos e água de consumo). Estas espécies foram cedidas pela Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM), do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Manaus, Amazonas, Brasil.

2.2 AUTENTICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Das culturas preservadas em água destilada esterilizada, as espécies de *Penicillium* foram transferidas para ágar extrato de malte (MEA), em placas de Petri. Os cultivos foram mantidos a 28 °C Após sete dias, foi realizada a autenticação das espécies com base nas características morfológicas (PITT, 1991; SOUZA et al., 2015).

2.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL EM MEIO SÓLIDO

Para obtenção do inóculo, as espécies de *Penicillium* foram subcultivadas em ágar BDA, em placas de Petri (90 mm x 15 mm), a 28 °C por oito dias. Após este período, discos miceliais (8 mm de diâmetro) de cada cultivo foram inoculados na superfície de placas de Petri contendo meios específicos para determinação de amilase, celulase e protease, elaborados conforme as metodologias descritas por Teixeira et al. (2011) com modificações e Kasana et al. (2008) (Tabela 1).

Tabela 1. Meios de cultura específicos para determinação enzimática.

Meios de cultura	enzima
Ágar-amido (g/L): ágar nutriente (18), amido (10)	Amilase
Ágar-celulase (g/L): ágar (17), NaNO ₃ (2), K ₂ HPO ₄ (1), MgSO ₄ (0,5), KCl (0,5), carboximetilcelulose (2), peptona (0,2)	Celulase
Ágar-leite (g/L): ágar (18), leite desnatado (10), gelatina (5)	Protease

A síntese de enzimas foi evidenciada pela formação de halos translúcidos ao redor das colônias, após 48h de incubação a 28 °C. Para visualizar a ação de celulases, foi utilizado o corante Lugol de Gram (KASANA et al., 2008). Na avaliação da atividade amilásica foi usada solução de iodo 2% (p/v). A atividade proteásica foi observada sem a necessidade de substâncias reveladoras (TEIXEIRA et al., 2011). Os halos foram medidos diametralmente com auxílio de régua graduada e os resultados expressos em milímetros. A atividade enzimática foi determinada pelo índice de atividade enzimática (IAE), calculado de acordo com a equação 1 (HYSENI et al., 2020; PRADO et al., 2021).

$$\text{Equação 1. IAE} = \frac{\text{diâmetro do halo (mm)}}{\text{diâmetro do poço (mm)}}$$

2.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

2.4.1 Produção De Compostos Antimicrobianos Em Meio Líquido

Na avaliação da atividade antimicrobiana por espécies de *Penicillium* foi utilizado meio líquido descritos na tabela 2. Um quantitativo de 25 mL de cada meio foi distribuído em Erlenmeyer de 25 mL, seguido de esterilização a 121 °C, por 15 minutos.

Tabela 2. Composição dos meios de cultivo utilizados para cultivo dos fungos em meio líquido.

Meios de cultivo	Composição (g/L)
Batata dextrose (BDL)	Batata (200), dextrose (20), extrato de levedura (4)
Extrato de levedura sacarose (YES)	Sacarose (150), extrato de levedura (20),
International Streptomyces Project 2 (ISP2)	Amido (10), extrato de levedura (4), glicose (10), extrato de malte (4)
Sabouraud (SB)	Glicose (20), peptona (10)

2.4.2 Preparação Do Inóculo E Condições De Fermentação

Para obtenção do inóculo, foi adicionado 1 mL de água destilada esterilizada em cada cultura das espécies de *Penicillium*, mantidas em tubos de ensaio contendo ágar BDA, por sete dias. O micélio foi desprendido com alça de níquel cromo, em seguida, essa suspensão celular foi agitada. Uma alíquota de 50 µL desta suspensão foi inoculada nos meios de cultivos líquidos e a fermentação conduzida a 28°C por 15 dias, em condições estacionárias.

2.4.3 Recuperação Do Extrato Bruto E Extração Dos Compostos Antimicrobianos

Ao término do bioprocessamento, os extratos brutos foram separados da massa micelial por filtração a vácuo. Para extração dos compostos antimicrobianos, os extratos brutos foram mantidos em acetato de etila por 48 horas. Após este período, o solvente foi evaporado e os extratos armazenados a 4°C para uso nos testes de avaliação da atividade antimicrobiana.

2.4.4 Determinação Da Atividade Antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana, os extratos orgânicos de *P. purpurogenum*, *P. oxalicum* e *P. citrinum* foram testados frente aos seguintes patógenos adquiridos da Cefar Diagnóstica (CCCD): *Staphylococcus aureus* (S 007), *Escherichia coli* (E 004), *Pseudomonas aeruginosa* (P 004), *Enterococcus faecalis* (E 002), *Candida albicans* (CC 001) e *C. tropicalis* (CC 002). As bactérias foram reativadas em caldo Mueller Hinton (MH) e as leveduras em caldo Sabouraud (SB). Em seguida, as leveduras

e as bactérias foram incubadas a 37°C por 24 horas e 48 horas, respectivamente. Nos testes de atividade antimicrobiana, em microplaca de 96 poços, foram utilizadas concentrações finais de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL para leveduras (CLSI, 2002) e 5×10^5 UFC/mL para bactérias (CLSI, 2003).

Os extratos orgânicos foram diluídos em solução aquosa de Dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (v/v) até a concentração final de 2 mg/mL. Itraconazol (2 mg/mL) e Amoxicilina (2mg/mL) foram utilizados como controle negativo para as leveduras e bactérias, respectivamente. Os ensaios foram incubados a 35 °C por 24 h. Após esse período, foi adicionado 10 µL de TTC [(2,3,5-cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio)] a 1% (p/v) em cada poço da microplaca. Em caso positivo de ação antimicrobiana, a coloração dos poços não é alterada na presença do revelador (PRADO et al., 2017; YENN et al., 2017).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

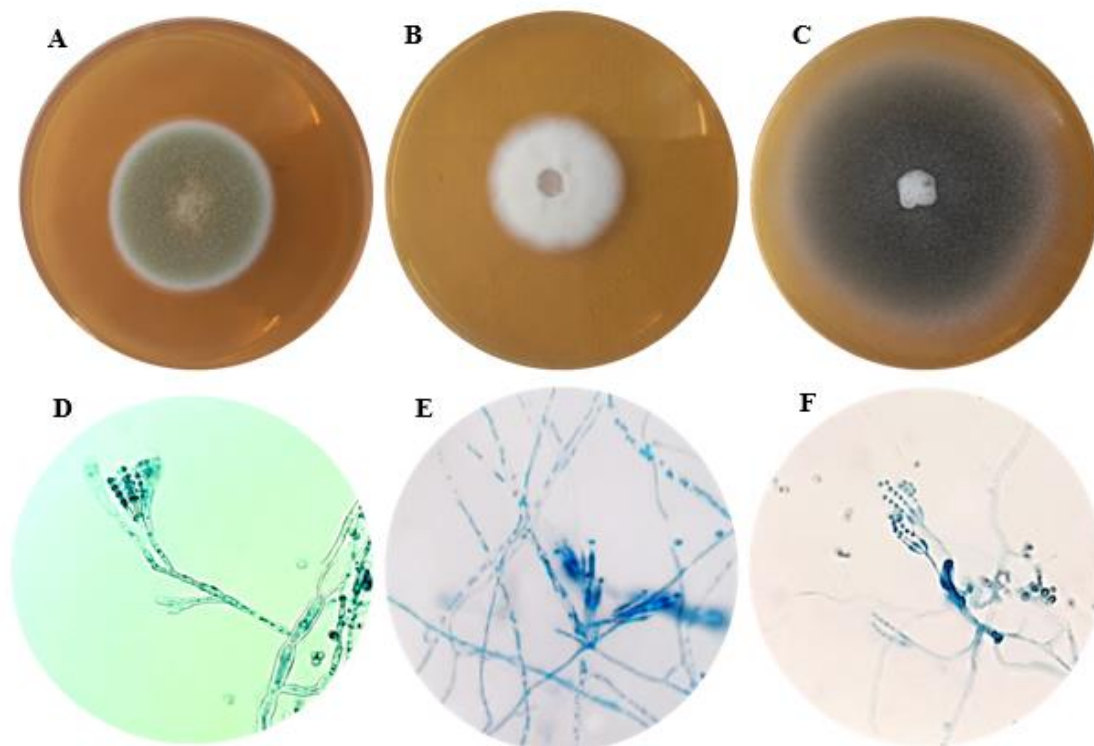
Os dados obtidos nesse ensaio foram analisados em ANOVA com teste de Tukey a 5 % de significância, utilizando o programa Minitab 18.0 (MINITAB, 2017).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AUTENTICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Penicillium*

A avaliação das características morfológicas é importante nas etapas de identificação e determinação da viabilidade de fungos. Neste sentido, a utilização de culturas puras e viáveis em bioprocessos é essencial para garantir resultados confiáveis em estudos que avaliam o potencial biotecnológico desses microrganismos (SENANAYAKE et al., 2020). As características macro e micromorfológicas de *P. citrinum* CFAM 47, *P. oxalicum* CFAM 1311 e *P. purpurogenum* CFAM 214 estão demonstradas na figura 1. Nas condições avaliadas, todas as espécies apresentaram características morfológicas como cor, textura, tamanho e conidióforo compatíveis com as descrições de Pitt (1991), Noman et al. (2018) e Saif et al. (2020).

Figura 1. Características morfológicas de espécies de *Penicillium* em MEA, a 28 °C, durante sete dias. Morfologia das colônias: *P. citrinum* CFAM 47 (A), *P. oxalicum* CFAM 1311 (B) e *P. purpurogenum* CFAM 214 (C); Morfologia microscópica: conidióforos de *P. citrinum* CFAM 47 (D), *P. oxalicum* CFAM 1311 (E) e *P. purpurogenum* CFAM 214 (F).



3.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL

Nas condições avaliadas, a hidrólise amilolítica significativa foi determinada nos cultivos de *P. purpurogenum* CFAM 214 que demonstrou halo de degradação superior em 35% e 53,40% quando comparado com os halos de *P. citrinum* CFAM 47 e *P. oxalicum* CFAM 1311, respectivamente. As três espécies sintetizaram e excretaram proteases, não havendo diferença entre os valores dos halos. Entretanto, não foi verificada a síntese de celulases pelas espécies de *Penicillium* estudadas (Tabela 3). A Figura 2 mostra os halos de degradação resultantes da atividade de amilase e protease obtidos dos cultivos de *P. purpurogenum* CFAM 214 e *P. citrinum* CFAM 47, respectivamente. Saleem e Ebrahim (2014) observaram halos (25 mm) resultantes da presença de amilases produzidas por *P. purpurogenum*. Orwa et al. (2020) relataram halos de hidrólise (0,1 a 3mm) que evidenciaram a produção de amilase e protease por *P. oxalicum*. Griebeler et al. (2015) também constataram a síntese de enzimas proteolíticas por *Penicillium* sp.

Os resultados do presente estudo evidenciam que as espécies de *Penicillium* oriundas da Amazônia sintetizam amilases e proteases, hidrolases utilizadas em diferentes

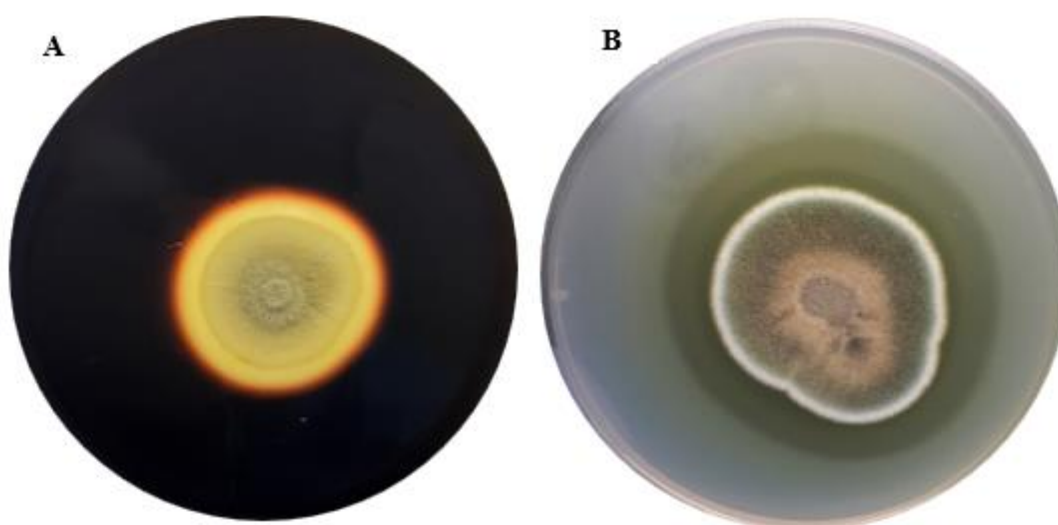
setores industriais, tais como, alimentício e farmacêutico, além de terem ampla aplicabilidade no beneficiamento do couro, papel e celulose (ALVES et al., 2014).

Tabela 3. Produção de enzimas por espécies de *Penicillium*.

Espécies de <i>Penicillium</i>	Diâmetro do halo (mm)		
	Amilase	Celulase	Protease
<i>P. citrinum</i> CFAM 47	35,30 ± 0,20 ^b	ND	53,30 ± 0,63 ^a
<i>P. oxalicum</i> CFAM 1311	25,30 ± 0,20 ^c	ND	50 ± 0,81 ^a
<i>P. purpurogenum</i> CFAM 214	54,30 ± 0,20 ^a	ND	50 ± 0,26 ^a

ND = não determinado. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo método de Tukey ($\rho > 0,05$).

Figura 2. Halos de degradação enzimática em meio sólido demonstrando a atividade enzimática de *P. citrinum* CFAM 47: A= atividade amilásica; B= atividade proteásica.



A atividade enzimática das espécies de *Penicillium*, expressa pelo IAE, está demonstrada na Tabela 4. *Penicillium citrinum* CFAM 47 apresentou IAE (1,24) significativo para amilase. Em relação à atividade proteolítica, os valores variaram de 1,33 a 1,06, não sendo observada diferença significativa entre os IAE. Verma e Verma (2018) determinaram IAE de amilase similar para *Penicillium funiculosum*. Shubha e Srinivas (2017) e Sukmawati et al. (2019) relataram atividade enzimática de 1,32 e 1,06 para *P. purpurogenum* e *P. chrysogenum*, respectivamente.

Tabela 4. Índice de atividade enzimática (IAE) de espécies de *Penicillium*.

Espécies de <i>Penicillium</i>	Índice de atividade enzimática (IAE)		
	Amilase	Celulase	Protease
<i>P. citrinum</i>	1,24 ± 0,02 ^a	ND	1,33 ± 0,10 ^a
<i>P. oxalicum</i>	1,08 ± 0,03 ^b	ND	1,17 ± 0,23 ^a
<i>P. purpurogenum</i>	1,06 ± 0,00 ^b	ND	1,06 ± 0,00 ^a

Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo método de Tukey ($\rho > 0,05$).

3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Nas condições avaliadas, foi verificado que os extratos das espécies de *Penicillium* apresentaram maior ação frente às leveduras, com destaque para *P. purpurogenum* CFAM 214 que apresentou atividade de 75% e 50% contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente. *Penicillium citrinum* CFAM 47 cultivado em SB e *P. oxalicum* CFAM 1311 mantido em ISP2 e YES também demonstraram ação contra *C. tropicalis*. Em relação às bactérias Gram-positivas somente *E. faecalis*, foi sensível aos extratos obtidos dos cultivos de *P. purpurogenum* CFAM 214 em SB e YES. Não foi observada atividade dos extratos frente a *E. coli* e *P. aeruginosa*. Yenn et al. (2017) verificaram que os extratos de *P. purpurogenum* ED76 nas concentrações de 125 µg/mL e 250 µg/mL apresentaram atividade frente a *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente. Miranda et al. (2019) relataram que extrato de *Penicillium* sp. (31,25 mg/mL) foi ativo contra *E. faecalis*. Talukdar et al. (2016) verificaram significativa atividade candidida por *P. verrucosum* MKH7 e associaram esta ação antimicrobiana à presença de substâncias contendo anéis de lactona e grupos carbonila no extrato analisado.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium*.

Espécies de <i>Penicillium</i>	Meios de cultivo	Microrganismos					
		CA	CT	EF	SA	EC	PA
<i>P. citrinum</i>	BDL	+	-	-	-	-	-
	ISP2	-	-	-	-	-	-
	SB	+	+	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-	-
<i>P. oxalicum</i>	BDL	+	-	-	-	-	-
	ISP2	+	+	-	-	-	-
	SB	-	-	-	-	-	-
	YES	-	+	-	-	-	-
<i>P. purpurogenum</i>	BDL	-	-	-	-	-	-
	ISP2	+	+	-	-	-	-
	SB	+	+	+	-	-	-
	YES	+	-	+	-	-	-

BDL= batata dextrose; ISP2= International Streptomyces Project 2; SB= Sabouraud; YES= extrato de levedura sacarose; CA= *Candida albicans*; CT= *Candida tropicalis*; EF= *Enterococcus faecalis*; SA= *Staphylococcus aureus*; EC= *Escherichia coli*; PA= *Pseudomonas aeruginosa*. += não houve mudança de cor do meio reacional; - = houve mudança de cor do meio reacional.

A produção de antimicrobianos por *Penicillium* é influenciada por diversos parâmetros como tipo de bioprocesso, temperatura e a espécie (BARREIRO; MARTÍN; GARCIA-ESTRADA, 2012; ZERROUG et al., 2018). De acordo com Talukdar et al. (2016), a síntese de compostos bioativos por espécies de *Penicillium* com ação inibitória

contra microrganismos também é influenciada pela composição do meio de cultivo, com destaque para as fontes de carbono, nitrogênio e minerais.

4 CONCLUSÃO

Penicillium citrinum CFAM 47, *P. oxalicum* CFAM 1311 e *P. purpurogenum* CFAM 214 sintetizam amilase e protease, mas a atividade de celulase não foi observada em meio sólido. Esses fungos são fontes de compostos antimicrobianos ativos contra leveduras do gênero *Candida*, mas não produzem metabólitos inibidores do crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Adicionalmente, o extrato de *P. purpurogenum* CFAM 214 tem ação contra *E. faecalis*. Portanto, verifica-se que as espécies de *Penicillium* isoladas do bioma amazônico são fontes promissoras de biocompostos com potencial para uso nas indústrias de alimentos, medicamentos, de detergente e no beneficiamento de couro. Outras investigações são necessárias para identificar os metabólitos sintetizados por essas espécies de *Penicillium*.

AGRADECIMENTOS

À Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM), ao Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia), à Fundação de Apoio à Fiocruz (FIOTEC) através do programa PROEP-LABS/ILMD FIOCRUZ AMAZÔNIA, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através do convênio Fiocruz/CNPq - LabsAmazônia e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) através do programa de Infraestrutura para Jovens Pesquisadores – Programa Primeiros Projetos (PPP) pelo suporte e apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ALI, F. S.; MEHMOOD, K.; ANWAR, M.; AKBAR, A.; SAMIULLAH; BABER, J.; QASIM, S.; ALI, I. Biotechnology of Penicillium Genus. **Lasbela University Journal of Science and Technology**, v. 5, p. 201-207, 2016.

ALVES, P. D. D.; SIQUEIRA, F. F.; FACCHIN, S.; HORTA, C. C. R.; VICTÓRIA, J. M. N.; KALAPOTHAKIS, E. Survey of microbial enzymes in soil, water, and plant microenvironments. **The Open Microbiology Journal**, v. 8, p. 25-31, 2014. DOI: 10.2174/1874285801408010025

BARREIRO, C.; MARTÍN, J. F.; GARCIA-ESTRADA, C. Proteomics shows new faces for the old penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-15, 2012. DOI: 10.1155/2012/105109

CAVALCANTE, F. S. A; CAMPOS, M. C. C.; LIMA, J. P. S. Review article: studies of fungi in the state of Amazonas, Brazil in the last 10 years. **Ciência e Natura**, v. 42, e38, 2020. DOI: 10.5902/2179460X37758

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; Approved Standard - Second Edition. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 WestValley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

FAÚNDEZ, C.; PÉREZ, R.; RAVANAL, M. C.; EYZAGUIRRE, J. *Penicillium purpurogenum* produces a novel, acidic, GH3 beta-xylosidase: heterologous expression and characterization of the enzyme. **Carbohydrate Research**, v. 482, p. 1-7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.06.017>

GONÇALVES, M. F. M.; SANTOS, L.; SILVA, B. M. V.; ABREU, A. C.; VICENTE, T. F. L.; ESTEVES, A. C.; ALVES, A. Biodiversity of *Penicillium* species from marine environments in Portugal and description of *Penicillium lusitanum* sp. nov., a novel species isolated from sea water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, p. 3014-3021, 2019. DOI: 10.1099/ijsem.0.003535

GRIEBELER, N. E.; BORTOLI, V.; ASTOLFI, A. L.; DARONCH, N. A.; SCHUMANN, A. C.; SALAZAR, L. N.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T.; ZENI, J. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulasas e pectinases. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 13, p. 13-22, 2015. DOI:10.7213/academica.13.FC.AO01

HYSENI, B.; FERATI, F.; REXHEPI, F.; MORINA, R.; BALIU, Y.; HYSENI, S.; RUSHITI, A.; HAJDINI, S.; NIKEREL, E. Isolation and characterization of

microorganisms for protease production from soil samples from Kosovo and testing the enzymes in food industry application. **Journal of Environmental Treatment Techniques**, v. 8, n. 2, p. 687-693. 2020.

JAKUBCZYK, D.; DUSSART, F. Selected fungal natural products with antimicrobial properties. **Molecules**, v. 25, n. 911, p. 1-18, 2020. DOI: 10.3390/molecules25040911

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plate using Gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 503-507, 2008. DOI: 10.1007/s00284-008-9276-8

KUMARI, P.; SINGH, A.; SINGH, D. K.; SHARMA, V. K.; KUMAR, J.; GUPTA, V. K.; BHATTACHARYA, S.; KHARWAR, R. N. Isolation and purification of bioactive metabolites from an endophytic fungus *Penicillium citrinum* of *Azadirachta indica*. **South African Journal of Botany**, v. 139, p. 449-457, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.02.020>

MINITAB (2018). **Minitab statistical software**. LEAD Technologies, Inc. Version 18.0, 2017.

MIRANDA, M. C. M.; CARVALHO, C. M.; FARIA, F. S. E. D. V.; NOBREZA, A. M. S., PEREIRA, T. M.; PIVATTO, K.; COSTA, M. V. C.; GUEDES, O. A.; ESTRELA, C. R. A.; BORGES, Á. H. Antibacterial activity of phytochemical extracts and endophytic fungi of *Carapa guianensis* against *Enterococcus faecalis* in endodontic infections an in vitro study. **The Open Dentistry Journal**, v. 13, p. 249-254, 2019. DOI: 10.2174/1874210601913010249

NOMAN, E. A.; AL-GHEETHI, A. A.; RAHMAN, N. N. N. A.; HIDEYUKI, N.; TALIP, B. B. H. A.; MOHAMED, R. M. S. R.; KADIR, M. O. A. Phenotypic identification of *Penicillium* spp. isolated from clinical wastes based on microstructure characteristics. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 88-95, 2018. DOI: 10.21161/mjm.27918

ORWA, P.; MUGAMBI, G.; WEKESA, V.; MWIRICHIA, R. Isolation of haloalkaliphilic fungi from Lake Magadi in Kenya. **Heliyon**, v. 6, p. 1-10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02823>

PARK, M. S.; OH, S. Y.; FONG, J. J.; HOUBRAKEN, J.; LIM, Y. W. The diversity and ecological roles of *Penicillium* in intertidal zones. **Scientific Reports**, v. 9, n. 13540, p. 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49966-5>

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 2nd edition. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), Food research laboratory, North Ryde, Australia. 1991.

PRADO, F. B.; BATISTA, S. C. P.; MARTIM, S. R.; TEIXEIRA, M. F. S. Viabilidade da produção de proteases por espécies de *Aspergillaceae* e triagem de coagulantes do leite bovino. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.2, p. 16356-16373, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n2-317

PRADO, F. B.; ROCHA, W. C.; MARTIM, S. R.; ALECRIM, M. M.; SILVA, L. P.; SILVA, L. S. C.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, M. F. S. Produção de compostos bioativos por *Aspergillus* mantidos sob duas condições de preservação. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, v. 12, n. 1, p. 37-47, 2017.

SAIF, F. A.; YASEEN, S. A.; ALAMEEN, A. S.; MANE, S. B.; UNDRE, P. B. Identification of *Penicillium* species of fruits using morphology and spectroscopic methods. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1644, 2020. DOI:10.1088/1742-6596/1644/1/012019

SALEEM, A.; EBRAHIM, M. K. H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal of Taibah University for Science**, v. 8, p. 90-97, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2013.09.002>

SENANAYAKE, I. C.; RATHNAYAKA, A. R.; MARASINGHE, D. S.; CALABON, M. S.; GENTEKAKI, E.; LEE, H. B.; HURDEAL, V. G.; PEM, D.; DISSANAYAKE, L. S.; WIJESINGHE, S. N.; BUNDHUN, D.; NGUYEN, T. T.; GOONASEKARA, I. D.; ABEYWICKRAMA, P. D.; BHUNJUN, C. S.; JAYAWARDENA, R. S.; WANASINGHE, D. N.; JEEWON, R.; BHAT, D. J.; XIANG, M. M. Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation. **Mycosphere**, v. 11, n. 1, p. 2678-2754, 2020. DOI:10.5943/mycosphere/11/1/20

SHAABAN, M.; EL-METWALLY, M. M.; LAATSCH, H. New bioactive metabolites from *Penicillium purpurogenum* MM. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 71, n. 4, p. 287-295, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1515/znb-2015-0185>

SHUBHA, J.; SRINIVAS, C. Diversity and extracellular enzymes of endophytic fungi associated with *Cymbidium aloifolium* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 48, p. 2248-2258, 2017. DOI: 10.5897/AJB2017.16261

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 174, p. 1-15, 2016. DOI: 10.1007/s13205-016-0485-8

SOUZA, T. C.; ARAÚJO, C. P. M.; RODRIGUES, J. C.; CRUZ FILHO, R. F.; FERNANDES, O. C. C. Análise quantitativa da produção de proteases por *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. da Coleção de Fungos da Amazônia - CFAM/FIOCRUZ- AM em Diferentes Condições de Cultivo. **Scientia Amazonia**, v. 4, n. 2, p. 107-113, 2015.

SUKMAWATI, D.; LARASATI, R. P.; KURNIATI, T. H.; ARMAN, Z.; ENSHASY, H. A. E. Molds isolated from chicken feed as potential amylase resources. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 8, n. 11, p. 188-196, 2019.

TALUKDAR, S.; TALUKDAR, M.; BURAGOHAIN, M.; YADAV, A.; YADAV, R. N. S.; BORA, T. C. Enhanced candidicidal compound production by a new soil isolate *Penicillium verruculosum* MKH7 under submerged fermentation. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 288, p. 1-12, 2016. DOI: 10.1186/s12866-016-0713-8

TEIXEIRA, M. F. S.; SILVA, T. A.; PALHETA, R. A.; CARNEIRO, A. L. B.; ATAYDE, H. M. (Org.). **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)**. Manaus: EDUA, 2011.

VERMA, P.; VERMA, R. K. Qualitative estimation of amylase enzyme activity of fungal species isolated from iron ore mined overburden soil. **Tropical Plant Research**, v. 5, n. 3, p. 396-404, 2018. DOI: 10.22271/tpr.2018.v5.i3.049

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S. B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.

YENN, T. W.; IBRAHIM, D.; CHANG, L. K.; RASHID, S. A.; RING, L. C.; NEE, T. W.; NOOR, M. I. B. M. Antimicrobial efficacy of endophytic *Penicillium purpurogenum* ED76 against clinical pathogens and its possible mode of action. **Korean Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 193-199, 2017. DOI: <https://doi.org/10.7845/kjm.2017.7022>

YIN, G.; ZHANG, Y.; PENNERMAN, K. K.; WU, G.; HUA, S. S. T.; YU, J.; JURICK, W. M.; GUO, A.; BENNETT, J. W. Characterization of blue mold *Penicillium* species isolated from stored fruits using multiple highly conserved loci. **Journal of fungi**, v. 3, n. 12, p. 1-10. DOI: 10.3390/jof3010012

ZERROUG, A.; SADRATI, N.; DEMIREL, R.; BAKLI, S.; HARZALLAH, D. Antibacterial activity of endophytic fungus, *Penicillium griseofulvum* MPR1 isolated from medicinal plant, *Mentha pulegium* L. **African Journal of Microbiology Research**, v. 12, n. 48, p. 1056-1066, 2018. DOI: 10.5897/AJMR2018.8887