

Artículo original

Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação

Josy C. da Silva^a, Ormezinda C. C. Fernandes^b, Michel da S. Martins^a, Armando da C. Rodrigues Jr^c, Maria Francisca S. Teixeira^{a,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Diversidade Biológica – UFAM/Micologia; Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

^bILMD/ FIOCRUZ – Laboratório de Biodiversidade. ^cCentro de Excelência; Ambiental da Petrobras – CEAP.

Recibido 20 de julio de 2009; aceptado 15 de marzo de 2010

Resumo: Neste trabalho foi investigada a viabilidade e atividade antimicrobiana de 60 *Penicillium* spp. preservados sob óleo mineral e água destilada esterilizada. Os fungos foram reativados em meios de cultura seletivos e autenticados conforme as características macro e micromorfológicas. A atividade antimicrobiana foi determinada pela técnica do bloco de gelose e bioautografia contra bactérias Gram positivas, bactérias Gram negativas, leveduras e *Mycobacterium smegmatis*. A viabilidade das culturas correspondeu a 46,7% para os preservados em água destilada e 43,3% para os preservados sob óleo mineral. Os testes de atividade antimicrobiana em meio sólido revelaram que *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* foram os mais susceptíveis aos compostos bioativos enquanto que *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis*, os mais inativos. Por bioautografia está demonstrando a atividade antimicrobiana dos constituintes químicos das espécies de *Penicillium*, resultado que abre novas possibilidades para identificação de compostos com potencial antifúngico e antibacteriano.

Palavras chave: *Penicillium*, preservação, viabilidade, atividade antimicrobiana

Actividad antimicrobiana de especies de *Penicillium* mantenidas bajo dos condiciones de preservación

Resumen: En este trabajo se investigó la viabilidad y la actividad antimicrobiana de 60 *Penicillium* spp. conservados en aceite mineral y en agua destilada estéril. Los hongos fueron reactivados en medios de cultivos selectivos y verificados conforme a sus características macro y micromorfológicas. La actividad antimicrobiana fue determinada por las técnicas del bloque de agar y bioautografía contra bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, levaduras y *Mycobacterium smegmatis*. La viabilidad de los cultivos correspondió a 46,7% para aquellos conservados en agua destilada y a 43,3% para los conservados en aceite mineral. Las pruebas de actividad antimicrobiana en medio sólido revelaron que *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* fueron los más susceptibles a los compuestos bioactivos mientras que *Escherichia coli* y *Mycobacterium smegmatis*, los más inactivos. Se demostró por bioautografía la actividad antimicrobiana de los componentes químicos de las especies de *Penicillium*, resultado que abre nuevas posibilidades para la identificación de compuestos con potencial antifúngico y antibacteriano.

Palabras clave: *Penicillium*, preservación, viabilidad, actividad antimicrobiana

Antimicrobial activity of *Penicillium* species kept under two preservation methods

Abstract: In this study, we investigated the viability and antimicrobial activity of 60 *Penicillium* spp. conserved under mineral oil and sterile distilled water. The fungi were reactivated in specific culture media and verified according to their macro and micromorphologic characteristics. Their antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, yeasts, and *Mycobacterium smegmatis* was determined by the agar block and bioautography techniques. Viability of cultures corresponded to 46.7% for those conserved in distilled water and 43.3% for those conserved in mineral oil. The antimicrobial activity in solid media revealed that *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* were the most susceptible to the bioactive components, while *Escherichia coli* and *Mycobacterium smegmatis* the most inactive. The antimicrobial activity of the chemical components of the *Penicillium* species was demonstrated through bioautography; these results open new possibilities for the identification of components with antifungal and antibacterial potential.

Keywords: *Penicillium*, preservation, viability, antimicrobial activity

* Correspondencia:

E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

Introdução

Penicillium constituem um grupo de microrganismos que sintetizam elevada quantidade de metabólitos secundários, atingindo em certos casos, uma produção 73% superior a de outras classes de microrganismos [1]. Estes fungos anamorfos são representados por aproximadamente 225 espécies com 347 sinonímias, além dos teleomorfos, *Eupenicillium* (45 espécies) e *Talaromyces* (24 espécies) [2-4].

Espécies de *Penicillium* têm uma alta diversificação, tanto morfológica quanto de metabólitos secundário, a exemplo de antibióticos, micotoxinas, antioxidantes, anticancerígenos, inseticidas, herbicidas, enzimas e fungicidas [5-8].

Rancic e col. [9] reportam que existe um grande número de extratos de fungos e/ou produtos extracelulares com atividade antimicrobiana, sobretudo de espécies de *Penicillium* sp. Entre outros, *P. brevicompactum*, *P. carneus*, *P. citrinum*, *P. chrysogenum*, *P. dipodomyis*, *P. flavigenum*, *P. funiculosum*, *P. griseofulvum*, *P. nalgiovense*, *P. nordicum*, *P. persicinum* são espécies relatadas como fontes de antibióticos, especialmente de penicilina e griseofulvina [2,3,10,11].

Portanto, apesar da disponibilidade de um grande número de antibióticos de última geração, torna-se fundamental a investigação dos compostos que possam atuar como novos antimicrobianos no tratamento de doenças infecciosas que causam um número considerável de mortes. Além disso, o aumento da quantidade de pessoas que têm doenças imunossupressoras ou metabólicas, o fenômeno crescente da resistência bacteriana e efeitos colaterais de certos medicamentos antimicrobianos, contribuem para efetivação de estudos que direcionem à descoberta de novos antimicrobianos [12-15].

Dado o crescente estabelecimento dos microrganismos no desenvolvimento de compostos de importância industrial, a conservação em coleções de culturas torna-se uma alternativa essencial para manutenção de sua integridade metabólica, condição fundamental para que estes sejam disponibilizados como material de referência para estudos futuros, inclusive para prospecção de compostos metabólicos de interesse biotecnológico [16,17].

Entre os métodos propostos para conservação os comumente utilizados, nas coleções de microrganismos, são óleo mineral [18], água destilada [19], esporos em areia [20], sílica gel [21], por liofilização [22] e em nitrogênio líquido [23]. Entretanto, o método a ser adotado depende da espécie a ser preservada e dos recursos que dispõe na coleção [24].

Nesse contexto esta pesquisa teve como objetivo verificar a viabilidade morfológica e a atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* da Coleção de Cultura DPUA, preservadas sob óleo mineral e em água destilada esterilizada.

Material e métodos

Microrganismos: Para este estudo analisaram-se 60 culturas de *Penicillium* (Tabela 1), representadas por 30 espécies preservadas por 3 a 17 anos, em água destilada esterilizada (n=30) e óleo mineral (n=30), estocadas na Coleção de Culturas DPUA, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

Reativação das culturas preservadas: Das culturas preservadas em água destilada esterilizada foram retiradas frações e transferidas para tubo de ensaio contendo meio de cultura inclinado ágar extrato de levedura Czapek (CYA), ou caldo glicosado (CG) [25]. Os cultivos foram mantidos a 25°C por sete dias.

Autenticação das culturas em nível de espécie: Para confirmação das características macroscópicas, fragmento de cultura das espécies de *Penicillium* crescidas em meio de cultura CYA e CG pura, foram transferidas para ágar extrato de malte (MEA), ágar glicerol nitrato 25% (p/v) (G25N) e CYA, em placa de Petri (10 mm x 90 mm), mantendo-se os cultivos a 25°C, por sete dias. As microestruturas foram observadas em lâmina obtidas por microcultivo. Para o reconhecimento das características da espécie foram utilizadas metodologias descritas por Pitt [26].

Determinação da atividade antimicrobiana: A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método do bloco de gelose por difusão em ágar. Os microrganismos testados foram cultivados em ágar Sabouraud (VETEC, Brasil), a 25°C por 48 horas (*Candida albicans* DPUA 1340) e em ágar Mueller-Hinton (MERK, Alemanha), a 37°C por 24 horas (*Staphylococcus aureus* CCT 1352, *Escherichia coli* CCT 0547 e *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE-71). Nesses cultivos foi preparada uma suspensão celular de concentração semelhante à coluna nº1 da escala de MacFarland. De cada suspensão, 100 µL foram retirados para serem semeados na superfície ágar Sabouraud e ágar Mueller-Hinton, em placa de Petri (10 mm x 90 mm), formando uma camada uniforme. Nesses cultivos foram sobrepostos três discos com 5 mm de diâmetros retirados da área central das culturas de *Penicillium* crescidas em CYA [27]. As placas foram incubadas em estufa a 25°C e 37°C por 24 e 48 horas, respectivamente. Como padrão foi utilizado Itraconazol e Rifampicina [MERCK, Alemanha (0,005 mg/mL)]. A atividade antimicrobiana foi avaliada medindo-se o halo de inibição.

Extração dos biocompostos: Os *Penicillium* foram cultivados em CYA, a 25 °C, e após sete dias foram retirados discos do centro da colônia para extração a frio dos biocompostos em hexano. Ao término dessa extração, no resíduo remanescente foi adicionado em acetato de etila, repetindo-se o procedimento com etanol 95%. Os extratos obtidos após 48 horas de extração foram filtrados em papel Whatman nº 30 e submetidos à concentração e redissolvidos

Tabela 1. Espécies de *Penicillium* selecionadas para o estudo da viabilidade, preservadas por diferentes períodos de estocagem em água destilada esterilizada e sob óleo mineral na Coleção de Culturas DPUA.

Ano de estocagem	Tempo de Estocagem (anos)	Espécies preservadas em água destilada	Espécies preservadas sob óleo mineral
1992	15	<i>P. aurantiogriseum</i> DPUA 428	<i>P. aurantiogriseum</i> DPUA 268
1992	15	<i>P. aurenicola</i> DPUA 798	<i>P. chrysogenum</i> DPUA 420
1992	15	<i>P. chrysogenum</i> DPUA 305	<i>P. citrinum</i> DPUA 507
1993	14	<i>P. chrysogenum</i> DPUA 582	<i>P. citrinum</i> DPUA 563
1991	16	<i>P. chrysogenum</i> DPUA 921	<i>P. citrinum</i> DPUA 620
1992	15	<i>P. citrinum</i> DPUA 620	<i>P. commune</i> DPUA 298
1993	14	<i>P. citrinum</i> DPUA 693	<i>P. decumbens</i> DPUA 483
1995	12	<i>P. decumbens</i> DPUA 559	<i>P. decumbens</i> DPUA 559
1991	16	<i>P. esclerotiorum</i> DPUA 802	<i>P. decumbens</i> DPUA 517
1992	15	<i>P. expansum</i> DPUA 546	<i>P. janthinellum</i> DPUA 645
1993	14	<i>P. glabrum</i> DPUA 1435	<i>P. fellutanum</i> DPUA 595
1993	14	<i>P. janczewskii</i> DPUA 577	<i>P. glabrum</i> DPUA 1136
1991	16	<i>P. janczewskii</i> DPUA 304	<i>P. implicatum</i> DPUA 479
1993	14	<i>P. janthinellum</i> DPUA 1381	<i>P. janczewskii</i> DPUA 577
2004	3	<i>P. melinii</i> DPUA 1391	<i>P. janthinellum</i> DPUA 426
2002	5	<i>P. miczniskii</i> DPUA 1406	<i>P. janthinellum</i> DPUA 487
1992	15	<i>P. minioluteum</i> DPUA 598	<i>P. janthinellum</i> DPUA 531
2005	2	<i>P. montanense</i> DPUA 1533	<i>P. sclerotiorum</i> DPUA 599
1994	14	<i>P. olsonii</i> DPUA 263	<i>P. janthinellum</i> DPUA 572
1993	14	<i>P. paxilii</i> DPUA 793	<i>P. melini</i> DPUA 634
1995	12	<i>P. paxilii</i> DPUA 938	<i>P. janczewskii</i> DPUA 304
1993	14	<i>P. pulberulum</i> DPUA 1146	<i>P. olsonii</i> DPUA 263
2002	5	<i>P. purpurogenum</i> DPUA 1275	<i>P. oxalicum</i> DPUA 584
1992	15	<i>P. rugulosum</i> DPUA 543	<i>P. paxilii</i> DPUA 226
1993	14	<i>P. simplicissimum</i> DPUA 1379	<i>P. raistrickii</i> DPUA 485
1995	12	<i>P. simplicissimum</i> DPUA 567	<i>P. simplicissimum</i> DPUA 567
1993	14	<i>P. spinulosum</i> DPUA 499	<i>P. steckii</i> DPUA 306
1991	16	<i>P. steckii</i> DPUA 306	<i>P. steckii</i> DPUA 573
1995	12	<i>P.waksmanii</i> DPUA 530	<i>P. variabile</i> DPUA 309
1993	14	<i>P.waksmanii</i> DPUA 623	<i>P. waksmanii</i> DPUA 623

com o solvente extrativo (500 µL) para determinação do perfil cromatográfico e atividade antimicrobiana.

Cromatografia em camada delgada (CCD) e bioautografia:

Nos ensaios bioautográficos, em cada placa de CCD, (MERCK, Alemanha), foram aplicados com capilar para o padrão (itraconazol e rifampicina, 0,005 mg/mL) e os diferentes extratos orgânicos. As placas foram desenvolvidas no sistema de eluição -hexano/acetato de etila (Nuclear, Brasil 6:4 v/v)-, e secas; a revelação dos biocompostos foi realizada sob luz ultravioleta para identificação dos metabólitos secundários e os respectivos *R_f* foram determinados nas bandas visualizadas.

Para determinação da atividade antimicrobiana por bioautografia, em condições assépticas, 20 mL (ágar Müeller-Hinton ou ágar Sabouraud), mantidos a 40°C contendo 500 µL de suspensão celular de cada microrganismo testado e 500 µL de cloreto de trifeniltetrazolium-TCC 1% p/v (MERCK, Alemanha) foi vertido na cromatoplasca acondicionadas em placa de Petri medindo 120 mm x 9 mm. Após solidificação do meio, as placas foram incubadas a 25°C e 37°C por 24 e 48 horas, respectivamente. A atividade antimicrobiana foi avaliada visualizando-se a área de inibição [14,27,28].

Análise estatística: Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva no Programa Excel Versão 7.0. A seleção das espécies para os ensaios bioautográficos foi avaliada pela análise de cluster (Método de Ward), e a

distância de City-Blocks (Manhattan Distância), foi usada para avaliar os valores do diâmetro médio do halo de inibição em milímetros das espécies estudadas [29]. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Resultados

A tabela 1 apresenta os dados referentes à viabilidade de 60 culturas de *Penicillium* preservadas em água destilada esterilizada e sob óleo mineral, do acervo da Coleção de Cultura DPUA. Do total de fungos examinados, as taxas de viabilidade foram de 46,7% (28/30) para aqueles preservados em água destilada e 43,3% (26/30) sob óleo mineral. A inviabilidade das preservadas em água destilada foi observada somente nas culturas com 14 e 16 anos (2/30, 3,3%) e em óleo mineral, naquelas estocadas por 12 (1/30, 1,7%), 15 (2/30, 3,3%) e 16 anos (1/30, 1,7%).

Os aspectos macro e micromorfológico das culturas viáveis (54/60, 90%) evidenciaram as distintas características do gênero *Penicillium* quando foram comparadas com a chave de classificação proposta por Pitt [26]. Dos 60 *Penicillium*, representadas por 30 espécies, aqueles preservados sob óleo mineral, que não apresentaram crescimento nas condições experimentais foram *P. citrinum* DPUA 620, *P. citrinum* DPUA 507, *P. janthinellum* DPUA 645, *P. variabile* DPUA 309, e, entre os preservados em água destilada esterilizada, apenas *P. esclerotiorum* DPUA 802 e *P. olsonii* DPUA 263. As espécies que cresceram, mas não apresentaram estrutura

de reprodução foram *P. citrinum* DPUA 620, *P. janczewskii* DPUA 304 e *P. steckii* DPUA 306, todas preservadas em água destilada esterilizada.

Os resultados da atividade antimicrobiana em meio sólido revelaram que 42,9% e 57,1% dos *Penicillium* (28/54) preservados sob óleo mineral e em água destilada esterilizada, respectivamente, expressaram halo de inibição contra um a três dos microrganismos-teste. Nos resultados citados na tabela 2, entre os preservados sob óleo mineral (12/28), a área de inibição foi observada somente em *S. aureus* CCT 1352 e *C. albicans* DPUA 1340.

Quanto aos *Penicillium* preservados em água destilada esterilizada (16/28) (Tabela 2), as espécies que inibiram *C. albicans*, *M. smegmatis*, *S. aureus* foram *P. janczewskii*

Tabela 2. Atividade antimicrobiana, por difusão em ágar, de espécies de *Penicillium* preservadas sob óleo mineral e água destilada.

Modo de preservação	Espécie	Diâmetro do halo (mm)			
		Ca	Ec	Ms	Sa
Óleo mineral (n=12)	<i>P. aurantiogriseum</i> DPUA 268	I	I	I	11,6
	<i>P. chrysogenum</i> DPUA 420	I	I	I	11,3
	<i>P. citrinum</i> DPUA 563	I	I	I	11,6
	<i>P. citrinum</i> DPUA 573	1,0	I	I	I
	<i>P. decumbens</i> DPUA 483	19,0	I	I	I
	<i>P. commune</i> DPUA 296	I	I	I	16,6
	<i>P. janczewskii</i> DPUA 304	I	I	I	17,0
	<i>P. janthinellum</i> DPUA 531	I	I	I	13,0
	<i>P. janthinellum</i> DPUA 487	1,0	I	I	I
	<i>P. olsonii</i> DPUA 263	I	I	I	10,0
	<i>P. simplicissimum</i> DPUA 567	I	I	I	11,6
	<i>P. steckii</i> DPUA 306	2,0	I	I	I
Água destilada (n=16)	<i>P. aurantiogriseum</i> DPUA 428	I	I	7,6	I
	<i>P. chrysogenum</i> DPUA 305	I	I	14,6	7,0
	<i>P. chrysogenum</i> DPUA 921	9,6	I	I	I
	<i>P. decumbens</i> DPUA 559	I	14,0	I	I
	<i>P. glabrum</i> DPUA 1435	9,3	I	I	I
	<i>P. janczewskii</i> DPUA 304	20,6	I	7,6	7,0
	<i>P. janthinellum</i> DPUA 1381	I	I	7,3	8,6
	<i>P. melinii</i> DPUA 1391	I	I	8,0	12,0
	<i>P. miczynskii</i> DPUA 1406	27,0	I	I	I
	<i>P. montanenses</i> DPUA 1533	I	12,0	I	I
	<i>P. paxilii</i> DPUA 793	28,3	I	7,5	7,0
	<i>P. paxilii</i> DPUA 938	I	11,3	I	8,0
	<i>P. puberulum</i> DPUA 1146	28,0	I	13,3	9,3
	<i>P. rugulosum</i> DPUA 543	24,6	15,0	I	I
	<i>P. steckii</i> DPUA 306	16,6	I	9,0	10,6
	<i>P. waksmanii</i> DPUA 623	10,0	I	I	I

Ca: *Candida albicans* DPUA 1340; Ec: *Escherichia coli* CCT 0547; Ms: *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE-71; Sa: *Staphylococcus aureus* CCT 1352; I=inativo (não houve desenvolvimento do halo de inibição).

DPUA 304, *P. steckii* DPUA 306, *P. paxilii* DPUA 793, *P. puberulum* DPUA 1146, sendo que o diâmetro dos halos apresentou variação de $\pm 7,0$ mm a $\pm 28,0$ mm. Neste contexto, *E. coli* CCT 0547 (Ec) foi sensível somente a

quatro espécies de *Penicillium* (*P. decumbens* DPUA 559, *P. montanenses* DPUA 1533, *P. paxilii* DPUA 938 e *P. rugulosum* DPUA 543).

Das culturas (28/54) submetidas aos testes de antibiose, sete [três de óleo mineral (halo $\geq \pm 16,6$ mm) e quatro preservadas em água destilada (halo $\geq \pm 24,6$ mm)] que demonstram os maiores halos foram selecionadas para os ensaios de bioautografia. Entre os extratos brutos (hexano, aceto de etila e etanol 95%), a melhor definição das bandas foi observada no extrato acetato de etila, proporcionado pelo sistema de eluição hexano/acetato de etila 6:4. *C. albicans* DPUA 1340 foi sensível aos biocompostos presentes nos extratos acetato de etila de *P. miczynskii* DPUA 1406 (*Rf* 0,69, 0,81 e 0,92), *P. decumbens* DPUA 483 (*Rf* 0,92), *P. paxilii* DPUA 793 (*Rf* 0,65, 0,81 e 0,84) e *P. puberulum* DPUA 1146 (*Rf* 0,64, 0,78 e 0,89) (Tabela 3).

A tabela 3 também está mostrando que os compostos de *P. rugulosum* DPUA 543 (*Rf* 0,57 e 0,65) inibiram *E. coli* CCT 0547; *P. paxilii* DPUA 793 (*Rf* 0,65, 0,69, 0,70, 0,76

Tabela 3. Bioautografia de espécies de *Penicillium* que apresentaram maiores halos de inibição nos testes por difusão em ágar.

Espécies	<i>Rf</i> ($\lambda=365$ nm)	Atividade antimicrobiana			
		Ca	Ec	Ms	As
<i>P. commune</i> DPUA 296	0,47	I	I	I	S
	0,64	I	I	I	S
	0,72	I	I	I	S
<i>P. decumbens</i> DPUA 483	0,92	S	I	I	I
	0,69	S	I	I	I
<i>P. miczynskii</i> DPUA 1406	0,81	S	I	I	I
	0,92	S	I	I	I
	0,47	I	I	I	S
<i>P. janczewskii</i> DPUA 304	0,65	I	I	I	S
	0,72	I	I	I	S
	0,65	S	I	I	I
<i>P. paxilii</i> DPUA 793	0,81	S	I	I	I
	0,84	S	I	I	I
	0,50	I	I	I	I
	0,69	I	I	I	S
	0,78	I	I	I	S
	0,65	I	I	S	S
	0,70	I	I	S	I
0,76	I	I	S	I	
<i>P. puberulum</i> DPUA 1146	0,50	I	I	I	S
	0,69	I	I	I	S
	0,80	I	I	I	S
	0,64	S	I	I	I
	0,78	S	I	I	I
0,89	S	I	I	I	
<i>P. rugulosum</i> DPUA 543	0,57	I	S	I	I
	0,65	I	S	I	I

Ca: *Candida albicans* DPUA 1340; Ec: *Escherichia coli* CCT 0547; Ms: *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE-71; Sa: *Staphylococcus aureus* CCT 1352; I=inativo (não houve desenvolvimento do halo de inibição); S=sensível (houve desenvolvimento do halo de inibição).

e 0,78) para *M. smegmatis* PDUFPE-71 e *S. aureus* CCT 1352. Este último microrganismo-teste também foi inibido por compostos de *P. puberulum* DPUA 1146 (*Rf* 0,50, 0,69 e 0,80), *P. janczewskii* DPUA 304 (*Rf* 0,47, 0,65 e 0,72) e *P. commune* DPUA 296 (*Rf* 0,47, 0,64 e 0,72).

Discussão

As citações disponíveis na literatura acerca dos métodos empregados na preservação e os respectivos efeitos na diversidade de fungos mostraram que não existe uma técnica padrão a qual seja capaz de preservá-los de forma adequada e generalizada [24,30-32]. Portanto, na escolha de um método para preservação de um determinado grupo de fungo, deve ser levada em consideração a capacidade de manutenção das características fenotípicas, genotípicas e patogênicas das culturas estocadas [21,33].

Os resultados obtidos neste estudo da avaliação das características morfofisiológicas, para se conhecer os possíveis efeitos causados pelos métodos de preservação em água destilada esterilizada e sob óleo mineral, mostraram que, entre as 60 culturas de *Penicillium* examinadas, 90% mantiveram as características morfológicas, semelhantes às descrições de Pitt [26], além de excretarem substâncias com atividade antimicrobiana. Estes dados corroboram com os obtidos por outros autores [31,33-38] nos estudos realizados com fungos anamorfos preservados sob água destilada e óleo mineral.

Nos resultados da reativação das culturas preservadas em água destilada esterilizada e óleo mineral [19] verificou-se que estes foram métodos eficientes na manutenção da viabilidade e preservação das características macro e micromorfológicas dos *Penicillium*. Provavelmente, a predominância da viabilidade das culturas esteja relacionada à ausência de subcultivo, a idade do inóculo e à permanência do micélio em estado de latência, condições as quais auxiliam na diminuição de mutações [39].

Esses resultados estão em consonância com os citados na literatura a exemplo de espécies de *Fusarium* que sobreviveram de 4 a 35 anos [24] e *Penicillium* e *Aspergillus*, 32 anos [21]. Outros autores também relatam a eficácia desses métodos de preservação, mas destacam que se trata de um processo laborioso, exigindo a supervisão constante de forma a evitar efeitos que podem alterar as culturas preservadas [21,24, 40-41].

Os métodos de preservação avaliados neste estudo são os mais práticos, economicamente viáveis e têm sido usados para diferentes microrganismos, embora haja risco de contaminação e a estabilidade genética possa ser comprometida [21,40].

Em 2006, Borman e col. [36] citam que diversas pesquisas têm sido realizadas para viabilizar métodos para manutenção de fungos por longos períodos. Contudo, a maioria das técnicas tem procurado estender a longevidade das culturas, de forma a manter as características fisiológicas, incluído patogenicidade e produção de substâncias de interesses comerciais (enzimas, aflatoxinas, polissacarídeos, pigmentos, etc).

Além das análises acerca da ação dos métodos de preservação sobre *Penicillium*, foi realizado o *screening* de espécies produtoras de substâncias com atividade antimicrobiana. O resultado mostrou que das 54 culturas de *Penicillium* viáveis, mantidas em água destilada (n=28) ou

sob óleo mineral (n=26), 52% apresentou efeito inibitório contra um ou mais microrganismos testes. E entre essas culturas, 22% foram oriundas de óleo mineral e 32% de água destilada, observando-se assim o efeito desses métodos na produção de biocompostos com atividade antagônica, sem desconsiderar as condições nutricionais, ambientais e a natureza dos fungos fundamentais na produção de metabólitos secundários [42-45]. Em 2005, Bérdy [46], também descreve a potencialidade de *Penicillium* e *Aspergillus* na produção de metabólitos antimicrobianos, como fontes de 1000 antibióticos. Ressalta também que os fungos e os actinomicetos são de igual importância em relação à produção de biocompostos para uso medicinal.

A atividade antimicrobiana também foi detectada por bioautografia, que foi realizada com sete extratos orgânicos de *Penicillium* para identificar os constituintes responsáveis, pela atividade antimicrobiana contra os microrganismos-teste. Nestas análises, utilizaram-se somente os extratos acetato de etila por ter apresentado o maior quantitativo e a melhor definição das bandas nos cromatogramas de referência em relação aos extratos hexano e etanol.

Nos bioautogramas, observou-se que a maioria dos extratos apresentou atividade para bactérias Gram-positivas, Gram-negativa e *C. albicans*. A atividade observada para os três grupos de microrganismos pode ser atribuída, entre outros fatores, a eficiência dos métodos na manutenção das espécies de *Penicillium* [47].

Para explorar o potencial desses extratos como protótipos de novos fármacos, na terapia de doenças infecciosas causadas por microrganismos multi-resistentes a drogas, é preciso realizar estudos adicionais sobre constituintes ativos que expressaram atividade antimicrobiana.

Conclusões

Comprovou-se que os métodos de preservação estudados são eficientes para garantir a viabilidade, pureza e autenticidade das espécies de *Penicillium*. Entre os métodos de avaliação da atividade antimicrobiana, os bioautográficos confirmam e revelam com eficácia os diferentes compostos extracelulares com atividade frente a *M. smegmatis*, *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.

Referências

1. Cafêu MC, Silva GH, Teles HL, Bolzani VS, Araújo AR. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). Quim. Nova. 2005; 28: 991-5.
2. Pitt JI. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: Academic Press. 2000.
3. Wang L, Zhou HB, Frisvad JC, Samson RA. *Penicillium persicinum*, a new griseofulvin, chrysogine, and roquefortine C producing species from Qinghai province, China. Antonie van Leeuwenhoek. 2004; 86: 173-9.
4. Silva MG, Furtado NAJC, Pupo MT, Fonseca MJV, Said S, Filho AAS, Bastos JK. Antibacterial activity from *Penicillium corylophilum* Dierckx. Microbiol Res. 2004; 159: 317-22.

5. Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies Mycol.* 2004; 49: 201-41.
6. Okushima L, Saito M, Sase S, Ling P, Ishii M. Spectral characteristics of *Penicillium* species using a frequency controlled liquid crystal filter. *Biosyst Eng.* 2004; 88: 265-9.
7. Asan A. *Aspergillus*, *Penicillium* and related species reported from Turkey. *Mycotaxon.* 2004; 89: 155-7.
8. Samson RA, Pitt JI. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Singapore, Harwood Academic Publishers. 2000.
9. Rancic A, Sokovic M, Karioti A, Vukojevic J, Skaltsa H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. *Env Tox Pharmacol.* 2006; 22: 80-4.
10. Lang G, Wiese J, Schmaljohann R, Imhoff JF. New pentaenes from the sponge-derived marine fungus *Penicillium rugulosum*: structure determination, and biosynthetic studies. *Tetrahedron.* 2007; 63: 11844-9.
11. Samson RA, Frisvad JC. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, and mycotoxins, and other extrolites. *Studies Mycol.* 2004; 49: 37-8.
12. Daffre S, Miranda A, Miranda MTM, Bulet P, Jr PIS, Machado A, Fogaça AC, Lorenzine DM, Pereira LS, Fázio MA, Esteves E, Burgierman MR. Peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 2001; 23: 48-55.
13. Lucas EMF, Castro MCM, Takahashi JA. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma. *Braz J Microbiol.* 2007; 38: 785-9.
14. Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol.* 2001; 74: 113-23.
15. Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, Reghioia S, Boughachiche F, Zerizer H, Hamdiken H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A, Boiron P. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J Med Mycol.* 2005; 15: 45-51.
16. Ryan MJ, Smith D, Bridge PD, Jeffries P. The relationship between fungal preservation method and secondary metabolite production in *Metarrhizium anisopliae* and *Fusarium oxysporum*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2003; 19: 39-44.
17. Teixeira MFS. Coleções de culturas: organização e contribuição aos processos biotecnológicos. 1º Workshop Meio Ambiente Ciência e Tecnologia de Mãos dadas para o futuro. 2006.
18. Sherf AF. A method for maintaining *Phytopomonas sepedonica* in culture for long periods without transfer. *Phytopathology.* 1943; 33: 330-2.
19. Castellani A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J Trop Med Hyg.* 1939; 42: 225-6.
20. Foster JW, Woodruff HB, McDaniel LE. Microbial aspects of penicillin. III. Production of penicillin in surface cultures of *Penicillium notatum*. *J Bacteriol.* 1943; 46: 421-33.
21. Smith D, Onions AHS. The preservation and maintenance of living fungi. Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lone, Kew, Richmond Surrey Twi 34F, England - Commonwealth Agricultural Bureaux; 1983.
22. Raper KB, Alexander DF. Preservation of molds by the lyophil process. *Mycology.* 1945; 37: 499-525.
23. Fennel D. Conservation of fungus cultures. *Rev Bot.* 1960; 26: 79-141.
24. Lima RF, Borba CM. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Rev Iberoam Micol.* 2001; 18: 191-6.
25. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vacarri EM, Melo NK. Tratado de Micologia Médica. 9 ed. São Paulo, Sarvier Press, 2002.
26. Pitt JI. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: CSIRO. 1985.
27. Schmourlo G, Mendonça-Filho RR, Alvino CS, Costa SS. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *J Ethnopharmacol.* 2005; 96: 563-8.
28. Balinova A. Extension of the bioautograph technique for multiresidue determination of fungicide residues in plants and water. *Anal Chimica Acta.* 1995; 311: 423-7.
29. Valentin JL. Ecologia numérica: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos. Rio de Janeiro, Editora Interciência. 2000.
30. Rodrigues, EG, Lirio RS, Lacaz CS. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Rev Inst Med Trop.* 1992; 34: 159-65.
31. Borba CM, Rodrigues KF. Viability and sporulating capability of Coelomycetes preserved under a range of different storage regimes. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17: 142-5.
32. Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol.* 1998; 15: 166-8.
33. Brilhante RSN. Estudo das dermatofitoses canina e felina: aspectos epidemiológicos e comportamento do *Microsporium canis* frente a diferentes métodos de estocagem. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE. 2002.
34. Diogo HC, Sarpieri, A, Pires MC. Preservação de fungos em água destilada. *An Bras Dermatol.* 2005; 80: 591-4.
35. Mendoza M, Alvarado P, Torres ED, Lucena L, Albornoz MC. Comportamiento fisiológico y de sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Sporothrix schenckii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación. *Rev Iberoam Micol.* 2005; 22: 151-6.
36. Borman AM, Szekely A, Campbell CK, Johnson EM. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water, and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia.* 2006; 161: 361-8.
37. Capriles CH, Mata S, Middelveen M. Presevation of fungi in water (CASTELLANI): 20 years. *Mycopathologia.* 1989; 106: 73-9.
38. Deshmukh SK. The maintenance and presevation of keratinophilic fungi, and related dermatophytes. *Mycoses.* 2003; 46: 203-7.
39. Passador M. M, Boro M. C, Figueiredo, M. B. Estudo sobre a patogenicidade de três culturas fúngicas preservadas pelo método de Castellani. *Arq Inst Biol.* 2004; 71: 1-9.
40. Figueredo MB. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico.* 2001; 63: 73-82.
41. Uzunova-Doneva T, Donev T. Anabiosis and conservation of microorganisms. *J Cult Col.* 2005; 4: 17-28.

42. Taniwaki II. Variabilidade de produção de aflatoxinas por linhagens de *Aspergillus flavus* em diferentes tempos de conservação. Sc Agric Piracicaba. 1993; 50: 140-50.
43. Larpent JP, Sanglier JJ. Biotechnologie des antibiotiques. Paris: Masson, 1989.
44. Griffin DH. Fungal physiology. 2 ed. NY. Wiley-Liss. 1993.
45. Deacon JW. Modern Mycology. Third ed. Oxon-NY, Blackwell Science. 1997; 303 p.
46. Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot. 2005; 58: 1-26.
47. Oliveira IS, Moura RM, Luz EDMN, Bezerra JL, Torres GR. C, Maia, LC. Severidade da podridão-verde em inhames e especialização fisiológica em *Penicillium sclerotigenum*. Fitopatol Bras. 2006; 31: 94-8.