

RESUMO EXPANDIDO - PRODUTOS NATURAIS E BIOATIVOS DE
INTERESSE FARMACOLÓGICO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE *PENICILLIUM CITRINUM***

Marrieth Cutrim Silva Gonçalves (marrieth.goncalves@discente.ufma.br)

Marianna Evelyn Serejo Lima (mariannaserejo@gmail.com)

Stefanio Barreto (fs.barreto@ufma.br)

Maria Do Desterro Soares Brandao Nascimento (maria.desterro@ufma.br)

1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos constituem importantes fontes de compostos bioativos com potencial para aplicação no desenvolvimento de medicamentos. Dentre esses compostos, destacam-se os antibióticos, que atuam por diferentes mecanismos de ação sobre os ácidos nucleicos, a síntese proteica, e na função da membrana plasmática.

O primeiro medicamento considerado pioneiro no desenvolvimento de uma grande indústria para a descoberta e comercialização de novos antibióticos foi a penicilina, que demonstrou eficácia significativa no tratamento de doenças

infeciosas. No entanto, o uso indiscriminado de antibióticos convencionais tem contribuído para o aumento da resistência antimicrobiana ao longo do tempo, sendo um dos principais desafios para a saúde pública mundial.

Nesse sentido, os fungos do gênero *Penicillium* destacam-se como fontes promissoras de metabólitos bioativos. Dentre eles, *Penicillium citrinum* apresenta relevância biotecnológica devido à produção de compostos com atividade antimicrobiana pouco explorada frente a bactérias patogênicas de interesse clínico.

2 OBJETIVO

Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos extracelular e intracelular de *P. citrinum* frente às cepas Gram-positivas e Gram-negativas de interesse clínico, por meio da determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.

3 METODOLOGIA

Penicillium citrinum foi submetido à fermentação submersa em caldo Sabouraud por 28 dias para obtenção dos extratos extracelular e intracelular, os quais foram filtrados, concentrados e fracionados em acetato de etila.

A atividade antibacteriana foi avaliada utilizando cepas da American Type Culture Collection: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*. Os inóculos bacterianos foram padronizados para a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL seguindo as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020).

A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 poços, com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM). Em cada poço,

foram adicionados 100 µL dos extratos extracelular e intracelular de *P. citrinum*, preparados em caldo Mueller–Hinton contendo 0,1% de DMSO. As amostras foram testadas em concentrações variando de 1000 a 0,977 µg/mL, enquanto a gentamicina (32 a 0,5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Após incubação por 24 h, foram adicionados 20 µL de resazurina a 1% e as placas foram reincubadas por 4 h. A leitura foi realizada visualmente, considerando-se a coloração azul como ausência de crescimento bacteriano e a coloração rosa como presença de crescimento.

Para a determinação da CBM, alíquotas dos poços correspondentes à CIM e às concentrações superiores foram subcultivadas em placas de ágar padrão para contagem (PCA). Após incubação a 35 ± 2 °C por 24 h, a CBM foi definida como a menor concentração que apresentou = 20 UFC/mL.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato extracelular apresentou maior atividade inibitória frente a bactérias Gram-positivas, com valores de CIM de 10,40 µg/mL para *S. aureus* e 20,82 µg/mL para *E. faecalis*. No entanto, também foi observado efeito sobre a bactéria Gram-negativa *E. coli* (52,08 µg/mL). Em contraste, *P. aeruginosa* apresentou maior resistência, com CIM de 166,70 µg/mL, exigindo concentrações mais elevadas. O extrato intracelular apresentou atividade moderada em comparação ao extrato extracelular, com valores de CIM mais elevados, variando de 104,2 a 333,33 µg/mL para todas as cepas.

Em relação à CBM, os valores para o extrato extracelular variaram de 15,625 µg/mL para *S. aureus*, 31,25 µg/mL para *E. faecalis*, 62,5 µg/mL para *E. coli*, e 250 µg/mL para *P. aeruginosa*. Já o extrato intracelular exibiu valores mais elevados, variando de 125 a 500 µg/mL.

Para avaliação comparativa, a gentamicina foi utilizada. Como esperado, todas as cepas bacterianas mostraram-se sensíveis, com valores de CIM de 26,67 µg/mL para *E. coli*, 32 µg/mL para *P. aeruginosa*, 6,67 µg/mL para *S. aureus* e 13,33 µg/mL para *E. faecalis*. Em relação à CBM, as bactérias Gram-negativas

(*E. coli* e *P. aeruginosa*) apresentaram valores semelhantes (32 µg/mL), enquanto as Gram-positivas exibiram valores distintos, com 8 µg/mL para *S.aureus* e 15,625 para *E.faecalis*.

Os resultados evidenciaram maior atividade do extrato extracelular, principalmente contra bactérias Gram-positivas, com menor eficácia frente a *P. aeruginosa*, o que pode estar relacionado à maior complexidade estrutural de sua parede celular. Em comparação, a gentamicina apresentou maior atividade antimicrobiana em todas as cepas, confirmando sua eficácia. Ainda assim, os resultados reforçam o potencial de *P. citrinum* como fonte de bioativos antimicrobianos.

5 CONCLUSÃO

O extrato extracelular de *P. citrinum* exibiu amplo espectro de ação antibacteriana, inibindo tanto bactérias Gram positivas quanto Gram negativas.

REFERÊNCIAS

ASHOKA, Gowdru Basanna; BYRAPPA SHIVANNA, Manchanahally. Antibacterial, antioxidant, and anticancer activities of *Penicillium citrinum* Thom. endophytic in *Jatropha heynei*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2022.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30. ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.

PRESCOTT, T. A. K.; HILL, R.; MAS-CLARET, E.; GAYA, E.; BURNS, E. Fungal drug discovery for chronic disease: history, new discoveries and new approaches. *Biomolecules*, v. 13, n. 6, p. 986, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13060986>.

1 INTRODUCTION

The secondary metabolites produced by filamentous fungi are important sources of bioactive compounds with potential for application in drug development. Among these compounds, antibiotics stand out, which act by different mechanisms of action on nucleic acids, protein synthesis, and plasma membrane function.

The first drug considered a pioneer in the development of a large industry for the discovery and commercialization of new antibiotics was penicillin, which demonstrated significant efficacy in the treatment of infectious diseases. However, the indiscriminate use of conventional antibiotics has contributed to the increase in antimicrobial resistance over time, being one of the main challenges for global public health.

In this sense, fungi of the genus *Penicillium* stand out as promising sources of bioactive metabolites. Among them, *Penicillium citrinum* has biotechnological relevance due to the production of compounds with antimicrobial activity little explored against pathogenic bacteria of clinical interest.

2 OBJECTIVE

To evaluate the antibacterial activity of extracellular and intracellular extracts of *P. citrinum* against Gram-positive and Gram-negative strains of clinical interest, by determining the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration.

3 METHODOLOGY

Penicillium citrinum was submitted to fermentation submerged in Sabouraud broth for 28 days to obtain extracellular and intracellular extracts, which were filtered, concentrated and fractionated in ethyl acetate.

The antibacterial activity was evaluated using strains from the American Type Culture Collection: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*. Bacterial inoculums were standardized to a concentration of 1.5×10^8 CFU/mL following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020).

The antibacterial activity was evaluated by the broth microdilution method, using 96-well plates, with determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC). In each well, 100 μ L of extracellular and intracellular extracts of *P. citrinum* were added, prepared in Mueller–Hinton broth containing 0.1% DMSO. The samples were tested at concentrations ranging from 1000 to 0.977 μ g/mL, while gentamicin (32 to 0.5 μ g/mL) was used as a positive control. After incubation for 24 h, 20 μ L of 1% resazurin were added and the plates were reincubated for 4 h. The reading was performed visually, considering blue color as the absence of bacterial growth and pink color as the presence of growth.

To determine the MBC, well aliquots corresponding to the MIC and higher concentrations were subcultured on standard agar plates for counting (PCA). After incubation at 35 ± 2 °C for 24 h, MBC was defined as the lowest concentration = 20 CFU/mL.

4 RESULTS AND DISCUSSION

The extracellular extract showed higher inhibitory activity against Gram-positive bacteria, with MIC values of 10.40 µg/mL for *S. aureus* and 20.82 µg/mL for *E. faecalis*. However, an effect on the Gram-negative bacterium *E. coli* (52.08 µg/mL) was also observed. In contrast, *P. aeruginosa* showed greater resistance, with MIC of 166.70 µg/mL, requiring higher concentrations. The intracellular extract showed moderate activity compared to the extracellular extract, with higher MIC values, ranging from 104.2 to 333.33 µg/mL for all strains.

Regarding MBC, the values for the extracellular extract ranged from 15.625 µg/mL for *S. aureus*, 31.25 µg/mL for *E. faecalis*, 62.5 µg/mL for *E. coli*, and 250 µg/mL for *P. aeruginosa*. The intracellular extract, on the other hand, showed higher values, ranging from 125 to 500 µg/mL.

For comparative evaluation, gentamicin was used. As expected, all bacterial strains were sensitive, with MIC values of 26.67 µg/mL for *E. coli*, 32 µg/mL for *P. aeruginosa*, 6.67 µg/mL for *S. aureus*, and 13.33 µg/mL for *E. faecalis*. Regarding MBC, the Gram-negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*) presented similar values (32 µg/mL), while the Gram-positive bacteria presented different values, with 8 µg/mL for *S. aureus* and 15.625 for *E. faecalis*.

The results showed greater activity of the extracellular extract, especially against Gram-positive bacteria, with lower efficacy against *P. aeruginosa*, which may be related to the greater structural complexity of its cell wall. In comparison, gentamicin showed greater antimicrobial activity in all strains, confirming its efficacy. Still, the results reinforce the potential of *P. citrinum* as a source of antimicrobial bioactives.

5 CONCLUSION

The extracellular extract of *P. citrinum* exhibited a broad spectrum of antibacterial action, inhibiting both Gram-positive and Gram-negative bacteria.

REFERENCES

ASHOKA, Gowdru Basanna; BYRAPPA SHIVANNA, Manchanahally. Antibacterial, antioxidant, and anticancer activities of *Penicillium citrinum* Thom. endophytic in *Jatropha heynei*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2022.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30. ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.

PRESCOTT, T. A. K.; HILL, R.; MAS-CLARET, E.; GAYA, E.; BURNS, E. Fungal drug discovery for chronic disease: history, new discoveries and new approaches. *Biomolecules*, v. 13, n. 6, p. 986, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13060986>

Palavras-chave: *penicillium citrinum*; antimicrobiano; metabólitos secundários; gentamicina.