



FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE
BIOLÓGICA ó PPG-MDB

**PERFIL DA VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE *Penicillium* DO
ACERVO DA COLEÇÃO DE CULTURAS DPUA**

JOSY CALDAS DA SILVA

MANAUS
2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE
BIOLÓGICA - PPG-MDB**

JOSY CALDAS DA SILVA

**PERFIL DA VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE *Penicillium* DO
ACERVO DA COLEÇÃO DE CULTURAS DPUA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, em cumprimento as exigências para obtenção do grau de Mestre em Diversidade Biológica, área de concentração Biodiversidade Amazônica.

Orientadora: Prof^ª Doutora Maria Francisca Simas Teixeira

MANAUS
2008



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

CALDAS DA SILVA

PERFIL DA VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE *Penicillium* DO ACERVO DA COLEÇÃO DE CULTURAS DPUA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, em cumprimento as exigências para obtenção do grau de Mestre em Diversidade Biológica, área de concentração Biodiversidade Amazônica.

Aprovado em 20 de fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE: Maria Francisca Simas Teixeira (UFAM)

TITULAR Ana Lúcia Figueiredo Porto (UFRPE)

TITULAR Maria Ivone Lopes da Silva (UFAM)

TITULAR Ana Lúcia Basílio Carneiro (UFAM)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Dedico este trabalho *in memorium*:

Rondon Cleto Caldas da Silva

Sofia Caldas da Silva

GRADECIMENTOS

À minha orientadora Francisca Simas Teixeira, por ser um exemplo de trabalho, por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar este estudo, e por possuir uma consistência científica impressionante. Devo a ela grande parte da qualidade deste trabalho e muito de meu amadurecimento como profissional.

Agradeço acima de tudo a família Rodrigues, pela compreensão, apoio e amor durante todo o desenvolvimento deste trabalho. E ao meu tio Rudemberg Caldas da Silva, que mesmo sem saber contribuiu para realização desse trabalho.

Às professoras Omerzinda Fernandes, Ana Lúcia Basílio Carneiro, pela disposição em fornecer informações relevantes a este trabalho e me auxiliarem nos procedimentos de laboratório.

Ao meu noivo Armando da Costa Rodrigues Júnior, pela paciência, dedicação, compreensão e apoio que me deu para que eu pudesse finalizar este trabalho, acreditando em mim quando eu mesma duvidava. Amor da minha vida...

À Universidade Federal do Amazonas ó UFAM, FAPEAM, CAPES E RENNEBRA/CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Michel da Silva Martins e Hérlon Mota Athaide, com quem compartilhei uma infinidade de horas de trabalho no laboratório, pela paciência que sempre tiveram comigo desde a chegada no Laboratório de Micologia e, pelos excelentes momentos que passamos juntos nestes anos.

À Nély Vinhote, pois se não fosse a mesma, não estaria no Laboratório de Micologia, obrigada! e ao Elton Nunes Brito, por me ajudar na análise estatística dos dados desta pesquisa.

À Larissa Kirsch, que tornou-se uma amiga. Pela disposição em me ajudar sempre que precisei e claro pelas caronas que me dava para casa, me livrando de ficar horas esquecidas na parada de ônibus.



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Deus tem um plano na vida de cada um de nós, não adianta querermos apressar ou retardar as coisas, pois tudo acontecerá no seu devido tempo.

RESUMO

Penicillium são fungos anamorfos economicamente importantes por produzirem compostos para uso como suplemento ou melhoramento de produtos alimentícios e, também são utilizados em biorremediação para recuperação de ambientes. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo verificar a pureza, autenticidade, viabilidade e a atividade antimicrobiana de 60 culturas de *Penicillium* da região amazônica, preservadas sob água destilada esterilizada e óleo mineral, pertencentes ao acervo de Coleção de Cultura DPUA. Os microrganismos revisados foram reativados em Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA) e autenticados, com base nas características macro e micromorfológicas, em Ágar Extrato de Malte (MEA), Ágar Glicerol Nitrate 25% (p/v) [G25N] e Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA). Posterior a autenticação, as espécies foram submetidas à atividade antimicrobiana pelo Método do Bloco de Gelose. A atividade antimicrobiana foi realizada em meio de cultura seletivo, a 25 °C e 37 °C, frente aos seguintes microrganismos-teste, *Candida albicans* DPUA 1340, *Staphylococcus aureus* CCT 1352, *Escherichia coli* CCT 0547 e *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE-7. A atividade antimicrobiana foi avaliada medindo-se a área de inibição contra o microrganismo-teste. Para detecção de biocompostos por bioautografa, fragmentos das culturas dos *Penicillium* selecionados por difusão em ágar foram submetidos à extração em Acetato de Etila (6:4, v/v) utilizando-se como padrão Itraconazol e Rifampicina. Entre as culturas examinadas, 90% expressaram viabilidade, pureza e taxonomicamente confirmadas de acordo com a literatura especializada. Dessas, 46,66% apresentaram resultado positivo na atividade antimicrobiana por difusão em ágar e 25% nos ensaios bioautográficos. A partir dos resultados comprovou-se a eficiência dos métodos de preservação em água destilada esterilizada e óleo mineral, assim como o potencial de espécies de *Penicillium* na produção de biocomposto com atividade antimicrobiana.

Palavra chave: *Penicillium* ó viabilidade - antagonismo

ABSTRACT

Penicillium are anamorphics fungi economically important for producing composts for uses such as supplement or food products improvement and also are used in bioremediation for environments recovery. Therefore, this work had as objective to verify the purity, authenticity, viability and the antimicrobial activity of 60 cultures of *Penicillium* from the Amazon region preserved in distilled sterilized water and under mineral oil, deposited in DPUA Culture Collection. The revised microorganisms were reactivated in Czapek Yeast Extract Agar (CYA) and authenticated based on macro and micromorphological characteristics on Malt Extract Agar (MEA), Glicerol Nitrate Agar 25% (w/v) [G25N] and Czapek Yeast Extract Agar (CYA). After authentication, the cultures were submitted to antimicrobial activity by the Gelose Block Method. The antimicrobial activity was performed in selective culture medium at 25°C and 37°C against the following test microorganisms: *Candida albicans* DPUA 1340, *Staphylococcus aureus* CCT 1352, *Escherichia coli* CCT 0547 and *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE-7. The antimicrobial activity was evaluated by measuring the halo of inhibition against the test microorganisms. For biocomposts detection by bioautography plugs of cultures of *Penicillium* selected by diffusion in agar were submitted to the extraction in Ethyl Acetate (6: 4, v/v) using as standard Itraconazol and Riphampicine. Among the examined cultures, 90.0% expressed viability, purity and taxonomically confirmed in accordance with specialized literature. From these, 46.66% demonstrated positive result in the antimicrobial activity for diffusion in agar and 25.0% in the bioautographic assay. From the results it has proved preservation methods efficiency in distilled sterilized water and under mineral oil, as well as the *Penicillium* species potential in the biocomposts production with antimicrobial activity.

Key words: *Penicillium*, viability, antagonism

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 <i>Penicillium citrinum</i> Thom. Aspecto micromorfológico	13
Figura 2 Vista da Coleção de Cultura DPUA: culturas preservadas em água destilada	16
Figura 3 Vista da Coleção de Cultura DPUA: culturas preservadas sob óleo mineral	17
Figura 4 Espécies de <i>Penicillium</i> de maior atividade antimicrobiana selecionadas para os testes de bioautografia: preservados em água destilada e óleo mineral	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Espécies de <i>Penicillium</i> selecionadas para o estudo da viabilidade morfológica e determinação da atividade antimicrobiana, preservadas em água destilada esterilizada e sob óleo mineral na Coleção de Culturas DPUA	37
Tabela 2 Porcentagem da viabilidade de culturas de <i>Penicillium</i> preservadas em água destilada esterilizada e sob óleo mineral	38
Tabela 3 Atividade antimicrobiana por difusão em ágar das culturas viáveis preservadas sob óleo mineral e água destilada esterilizada	38
Tabela 4 Bioautografia de espécies de <i>Penicillium</i> selecionadas nos teste por difusão em ágar	39

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1. 1 O Gênero <i>Penicillium</i>	12
1. 2 Atividade antimicrobiana e bioautografia	14
1. 3 Coleções e conservação de microrganismos	15
1. 4 A Coleção de culturas DPUA	16
1. 5 Métodos propostos para preservação de microrganismos	17
2. OBJETIVOS	18
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3. 1 Microrganismos	19
3. 2 Reativação das culturas preservadas	20
3. 3 Autenticação das culturas em nível de espécie	20
3. 4 Determinação da atividade antimicrobiana	20
3. 5 Extração dos biocompostos para cromatografia em camada delgada (CCD)/bioautografia	20
3. 6 Cromatografia em camada delgada e Bioautografia	21
3. 7 Análise estatística	21
4. ARTIGO	22
REFERÊNCIAS	46

INTRODUÇÃO

1.1 O Gênero *Penicillium*

A denominação genérica *Penicillium* (do latim = *penicillus*) foi publicada, pela primeira vez, na obra de Link, denominada "Observações em Ordens Plantarum Natural", em 1809. A mesma refere-se à morfologia da estrutura conidiogênica, penicílio (do alemão *pinsel*), célula que se assemelha a um pincel. O penicílio, formado por hifas denominadas de esterigma, se apresenta em graus distintos de complexidade. Na colônia, ele está sustentado por estrutura filamentosa. Esta estrutura filamentosa tem origem a partir de outra fértil, que em conjunto com o penicílio constitui o conidióforo, figura 1 (RAPER; THOM, 1949; COMERIO, 2000).

Entre os caracteres taxonômicos referidos nas monografias de maior importância nos últimos 50 anos sobre o gênero *Penicillium* têm destaque o conidióforo como estrutura taxonômica primária (COMERIO, 2000). Além dessa estrutura são relatadas a textura da colônia e a morfologia da célula conidiogênica (RAPER; THOM, 1949; PITT, 1985; COMERIO, 2000).

Na contextualização taxonômica, entre os trabalhos de relevância, a monografia de Raper e Thom (1949), *A Manual of the Penicillia* e de Pitt (1985), *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*, são obras clássicas sobre o gênero *Penicillium*. Na primeira obra, os autores propuseram o pioneiro sistema de classificação realmente prático e manejável. No manual publicado por Pitt, o conteúdo refere sobre a identificação de espécies comuns de *Penicillium* isoladas de diferentes substratos. Sabe-se, no entanto, que trata-se de fungos anamorfos considerados de difícil identificação (PITT, 1985; ASAN, 2000; DORGE; CARSTENSEN; FRISVAD, 2000). Outros trabalhos de destaque foram os de Samson, Stolk e Hadlok (1976) e Ramirez (1982) que também enfatizaram as características morfológicas do conidióforo como um caráter taxonômico primário na identificação de *Penicillium* spp. (COMERIO, 2000).

Historicamente, *Penicillium*, no Reino Fungi já foi classificado na Sub-Divisão Deuteromycotina, Classe Deuteromycetes. Posteriormente, estes passaram a ser denominados de fungos mitospóricos e na atualidade de fungos anamorfos. Segundo as citações de Guarro, Gené e Stchigel (1999), tornou-se dispensável conservar o termo deuteromycete, pelo menos

a terminologia foi oficialmente mantida, mas sem o reconhecimento desses fungos particularizado em uma classe, todavia o grupo deuteromycete representa a forma conidial dos Ascomycota e Basidiomycota.

O método tradicional e comumente usado para identificação de espécies de *Penicillium* ainda está sendo a visualização das características morfológicas das colônias (textura, cor e diâmetro da colônia), e estruturas de reprodução (tipos e tamanhos de conídios e conidioforo), além das técnicas de biologia molecular (OKUSHIMA et al., 2004).

Dentre os fungos filamentosos, *Penicillium* são importantes pela enorme capacidade de adaptação e colonização dos mais diversos meios, contendo acima de 300 espécies que podem causar efeitos benéficos e maléficos aos demais seres vivos (PITT, 2000; OKUSHIMA et al., 2004; ASAN, 2004).



Fonte: o autor

Figura 1 6 *Penicillium citrinum* Thom. Aspecto micromorfológico.

Entre os fungos, espécies de *Penicillium* são utilizadas na indústria e em processos de fermentação para melhoramento ou produção de alimentos, medicamentos, a exemplo da penicilina. Trata-se de fungos anamorfos que produzem biodeterioração de produtos *in natura* e/ou processados, como *P. expansum* que causa podridão na maçã e *P. sclerotigenum*, agente da podridão verde no inhame (*Dioscorea* spp.). No melhoramento de alimentos, *P. roquefort* é usado no processamento de queijo, embora existam linhagens que podem produzir patulina, micotoxina que é degradada pelas proteínas do leite as quais contêm enxofre na molécula (OLIVEIRA et al., 2007).

Penicillium spp. são também envolvidos em processos alérgicos, inclusive podem ser agentes de micotoxicoses, patologia causado ao homem e demais animais devido a ingestão contínua de micotoxinas. Além desses biocompostos, muitas espécies tornam-se valiosas

imentos, enzimas e outros compostos com atividade hipocolesterolêmica, anticancerígenos, antitumoral, antioxidantes, inibidores da -glucosidase, inseticidas, herbicidas e fungicidas (PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004; RASMUSSEN et al., 2005; ELIAS et al., 2006).

Os metabólitos secundários também são usados como critérios na quimiotaxonomia para classificação de espécies de *Penicillium* que têm conidióforo com ramificações terciárias, os denominados de terverticilados (SANTOS et al., 2002).

1. 2 Atividade Antimicrobiana e Bioautografia

Do ponto de vista histórico, os microrganismos têm sido fonte inestimável para a produção de compostos naturais com atividade biológica importantes para a humanidade (OLIVEIRA, et al., 2006). O sucesso dos processos biotecnológicos está diretamente relacionado à diversidade dos microrganismos e às moléculas que eles produzem como resultado do metabolismo primário e secundário, bem como com a conservação dos recursos genéticos fornecidas por eles (CEVERA, 1998; UZUNOVA-DONEVA; DONEV, 2005; ROKEM; LANTZ; NIELSEN, 2007).

Durante os últimos anos, produtos derivados de metabólitos secundários têm sido usados nas áreas médicas, industrial e agrícola, como os antibióticos, drogas anticarcinogênicas, agentes imunossupressores, enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas, dentre outros (BAKER et al., 2006).

Dos biocompostos de importância industrial produzidos por fungos, os antimicrobianos constituem o grupo de maior valor econômico, entre os produtos obtidos por fermentação. Atualmente, existem mais de 5.000 tipos diferentes de antibióticos conhecidos, e, a maior contribuição provém das penicilinas e cefalosporinas (BENNETT, 1998; SANTOS et al., 2002).

O crescente aparecimento mundial de bactérias multirresistentes, bem como a falta de antibióticos para combater tais agentes patogênicos continua a ser a grande preocupação da comunidade médica. Dessa forma, a constante evolução de microrganismos anti-bioresistentes está proporcionando o desenvolvimento de pesquisas em busca por novos fármacos de origem da diversidade microbiana (AHMAD; BEG, 2001; DUARTE et al., 2002; KITOUNI et al., 2005; CONTI et al., 2007).

A atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar e bioautografia são métodos utilizados para localizar substâncias com ação antibiótica, que seja capaz de inibir o

os. Essas técnicas, devido suas vantagens, rapidamente se difundiram (FERNANDES et al., 2005).

Nos últimos anos, com o desenvolvimento desses métodos, grande tem sido a oportunidade de aplicação na busca de novas substâncias responsáveis por atividade antimicrobiana de origem natural (FERNANDES et al., 2005).

1.3 Coleções e Conservação de Microrganismos

As coleções de culturas são centros de conservação cujo acervo está constituído por microrganismos vivos de interesse para diversos ramos científicos, inclusive podem ser suporte de processos biotecnológicos, condição que impõe a necessidade de preservação das espécies de modo a manter a vitalidade, a especificidade, a atividade, a imunogenicidade e outras propriedades, em condições *ex situ* (FIGUEIREDO, 2001; BRASIL, 2002; UZUNOVA-DONEVA; DONEV, 2005; TEIXEIRA, 2006).

Coleções *ex situ* podem ser classificadas como coleções de pesquisa, coleções de serviço e coleções industriais as quais têm importância de destaque na conservação e exploração da diversidade genética e metabólica de microrganismos. Esse grupo de coleções presta serviço segundo a necessidade do usuário e tem como objetivo o atendimento de demanda prioritariamente para pesquisa, ensino, manutenção, distribuição de estoques genéticos processos e produtos biotecnológicos e proteger o acervo da empresa e regular as linhagens microbianas (CANHOS, 2003; TEIXEIRA et al., 2007).

Outro tipo de coleção, as de referências, são fontes de culturas puras para utilização em atividades de ensino, estudos taxonômicos, identificação de patógenos e testes de controle de qualidade de produtos e materiais. Dessa forma, o material biológico conservado por métodos adequados em coleções de culturas tem uma gama de aplicações nas áreas de saúde, agropecuária, indústria e meio ambiente (CANHOS, 2000, 2003).

Atualmente, existe no cenário internacional um conjunto de ameaças concretas ao trânsito de material biológico e, portanto, a devida preservação e fornecimento de material biológico certificado por Coleções de Serviço e/ou Centros de Recursos Biológicos tornou-se de grande relevância para o desenvolvimento biotecnológico no Brasil (FIGUEIREDO, 2001; RYAN et al., 2003; BORMAN et al., 2006).

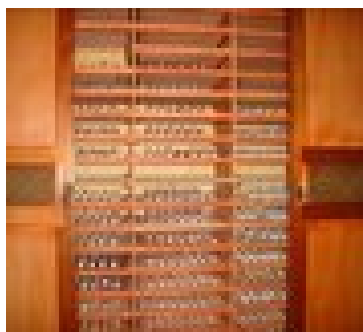
Dada a importância das coleções, o gerenciamento desses centros de serviço exige capacitação técnica especializada e infra-estrutura específica, além de cuidados especiais com relação às práticas de controle de qualidade das culturas preservadas, biossegurança e

s (SETTE, 2005). Contudo, no Brasil, país detentor de cerca de 20% da diversidade global, as coleções têm pouco reconhecimento, mesmo existindo capacitação institucional.

1. 4 A Coleção de Culturas DPUA

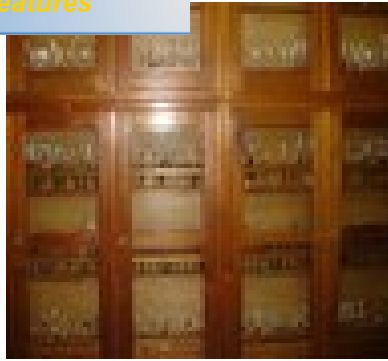
Dentre as coleções brasileiras de microrganismos, a Coleção de Cultura DPUA, da Universidade Federal do Amazonas (DPUA) (Figura 2 e 3), constitui-se em um patrimônio de significância científica por tratar-se de um acervo no qual estão preservados microrganismos da Amazônia. Entre esses, no acervo, estão preservados fungos filamentosos, leveduras e actinomicetos, principalmente, os produtores de substâncias para aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica e limpeza de efluentes.

A Coleção DPUA está filiada ao World Data Centre for Microorganisms (WDCM) também credenciada sob o nº 715, como fiel depositário de amostras do patrimônio genético oriundo do solo, água, resíduo vegetal e bebidas indígenas fermentadas ou doados por Instituições nacionais e internacionais.



Fonte: o autor

Figura 2 Vista da Coleção de Cultura DPUA: culturas preservadas em água destilada



Fonte: o autor

Figura 3 Vista da Coleção de Cultura DPUA: culturas preservadas sob óleo mineral

1. 5 Métodos propostos para preservação de microrganismos

A manutenção de microrganismos em coleções de culturas tornou-se de fundamental importância para estudos retrospectivos e prospectivos, que enfoque a biologia, etiologia e aspectos epidemiológicos. Entretanto, para uma satisfatória análise fenotípica e genotípica, a longo prazo, é necessária a escolha adequada do método de preservação (GIRÃO et al., 2004; NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004; MORGAN et al., 2006).

Entre os métodos alternativos propostos para preservação de fungos os comumente utilizados nas coleções de microrganismos são água destilada (CASTELLANI, 1939), óleo mineral (SHERF, 1943), esporos em areia (FOSTER; WOODRUFF; MCDANIEL, 1943), liofilização (RAPER; ALEXANDER, 1945), nitrogênio líquido (FENNEL, 1960) e sílica gel (SMITH; ONIONS, 1983). Entretanto o método a ser adotado depende da espécie a ser preservada e dos recursos que dispõem na coleção (LIMA; BORBA, 2001).

A preservação de *Penicillium* spp., viáveis em coleções, proporciona a realização de estudos taxonômicos, o conhecimento da diversidade de espécies, assim como a possibilidade de prospecção dos compostos de importância industrial para a área de saúde, química, alimentícia e ambiental. Assim sendo, as coleções de cultura de fungos são fontes alternativas para exploração de microrganismos produtores de compostos naturais em biotecnologia.

2.1 Geral

Verificar a pureza, autenticidade, viabilidade fisiológica e a atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* preservadas sob água destilada esterilizada e óleo mineral pertencentes ao acervo de Coleção de Cultura DPUA, da Universidade Federal do Amazonas.

2.2 Específicos

- Verificar a viabilidade fisiológica, pureza de 60 culturas de espécies de *Penicillium* estocadas na Coleção de Culturas DPUA e autenticar as espécies viáveis com base na visualização das características morfológicas das colônias e estruturas de reprodução;
- Caracterizar qualitativamente diferentes espécies de *Penicillium* quanto a atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis*;
- Selecionar por métodos bioautográficos substâncias com ação antifúngica e antibacteriana.

3.1 Microrganismos

Foram utilizadas 60 culturas de *Penicillium* spp. mantidas 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 (Tabela 1) foram reativadas por diferentes métodos.

Tabela 1 Espécies de *Penicillium* selecionadas para o estudo da viabilidade morfofisiológica e determinação da atividade antimicrobiana, preservadas em água destilada esterilizada e sob óleo mineral na Coleção de Culturas DPUA

Culturas preservadas em água destilada	Culturas preservadas sob óleo mineral
ESPÉCIE	ESPÉCIE
<i>P. aurantiogresium</i> DPUA 428	<i>P. aurantiogriseum</i> DPUA 268
<i>P. aurenicola</i> DPUA 798	<i>P. chysogenum</i> DPUA 420
<i>P. chrysogenum</i> DPUA 305	<i>P. citrinum</i> DPUA 507
<i>P. chrysogenum</i> DPUA 582	<i>P. citrinum</i> DPUA 563
<i>P. chrysogenum</i> DPUA 921	<i>P. citrinum</i> DPUA 620
<i>P. citrinum</i> DPUA 620	<i>P. commune</i> DPUA 298
<i>P. citrinum</i> DPUA 693	<i>P. decumbens</i> DPUA 483
<i>P. decumbens</i> DPUA 559	<i>P. decumbens</i> DPUA 559
<i>P. esclerotiorum</i> DPUA 802	<i>P. decumbens</i> DPUA 517
<i>P. expansum</i> DPUA 546	<i>P. esclerotiorum</i> DPUA 599
<i>P. glabrum</i> DPUA 1435	<i>P. fellutanum</i> DPUA 595
<i>P. janczewskii</i> DPUA 577	<i>P. glabrum</i> DPUA 1136
<i>P. janczewskii</i> DPUA 304	<i>P. implicatum</i> DPUA 479
<i>P. janthinellum</i> DPUA 1381	<i>P. janczewskii</i> DPUA 577
<i>P. melinii</i> DPUA 1391	<i>P. janthinellum</i> DPUA 426
<i>P. miczniskii</i> DPUA 1406	<i>P. janthinellum</i> DPUA 487
<i>P. minioluteum</i> DPUA 598	<i>P. janthinellum</i> DPUA 531
<i>P. montanence</i> DPUA 1533	<i>P. janthinellum</i> DPUA 572
<i>P. olsonii</i> DPUA 263	<i>P. janthinellum</i> DPUA 645
<i>P. paxilii</i> DPUA 793	<i>P. melini</i> DPUA 634
<i>P. paxilii</i> DPUA 938	<i>P. janczewskii</i> DPUA 304
<i>P. pulberulum</i> DPUA 1146	<i>P. olsonii</i> DPUA 263
<i>P. purpurogenum</i> DPUA 1275	<i>P. oxalicum</i> DPUA 584
<i>P. rugulosum</i> DPUA 543	<i>P. paxilii</i> DPUA 226
<i>P. simplicissimum</i> DPUA 1379	<i>P. raistrickii</i> DPUA 485
<i>P. simplicissimum</i> DPUA 567	<i>P. simplicissimum</i> DPUA 567
<i>P. spinulosum</i> DPUA 499	<i>P. steckii</i> DPUA 306
<i>P. steckii</i> DPUA 306	<i>P. steckii</i> DPUA 573
<i>P. waksmanii</i> DPUA 530	<i>P. variabile</i> DPUA 309
<i>P. waksmanii</i> DPUA 623	<i>P. waksmanii</i> DPUA 623

vadas

Das culturas preservadas em água destilada esterilizada e sob óleo mineral foram retiradas frações e transferidas para tubo de ensaio contendo meio de cultura inclinado Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA), ou Caldo Glicosado (CG). Os cultivos foram mantidos a 25 °C por sete dias.

3.3 Autenticação das culturas em nível de espécie

Para confirmação das características macroscópicas, fragmento de cultura dos *Penicillium* crescidas em CYA e CG pura foram repicadas para Ágar Extrato de Malte (MEA), Ágar Glicerol Nitrato 25% (p/v) [G25N] e Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA), em placa de Petri (90 mm x 15 mm), mantendo-se os cultivos a 25 °C, durante sete dias. As microestruturas foram observadas em lâmina obtidas por microcultivo. Para o reconhecimento em nível de espécie foram utilizados trabalhos descritos por Pitt (1985).

3.4 Determinação da atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana pelo Método do Bloco de Gelose por difusão em ágar, os microrganismos-teste foram cultivadas em Ágar Sabouraud, a 25 °C por 48 horas (*Candida albicans* DPUA 1340) e em Ágar Müeller-Hinton, 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 a Escala de MacFarland nº1. De cada suspensão, 100 µL foi retirado para ser semeado na superfície Ágar Sabouraud e Ágar Müeller-Hinton, em placa de Petri (90 mm x 15 mm), formando uma camada uniforme. Nesses cultivos foram sobrepostos três fragmentos retirados da área central das culturas de CYA medindo 5 mm de diâmetro. As placas foram incubadas a 25 °C e 37 °C por 24 e 48 horas, respectivamente. Como padrão foi utilizado Itraconazol e Rifampicina (0,005 mg/mL). A atividade antimicrobiana foi avaliada medindo-se o halo de inibição contra o microrganismo-teste.

3.5 Extração de biocompostos para cromatografia em camada delgada (CCD)/biautografia

Os *Penicillium* foram cultivados em Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA), a 25 °C. Após sete dias foram retirados fragmentos do centro da colônia para extração a frio dos biocompostos em Hexano. Ao término dessa extração, no resíduo remanescente foi adicionado Acetato de Etila, repetindo-se o procedimento com Etanol 95%. Os extratos

btidos em 48 horas foram filtrados em papel Whatman nº 30 e submetidos à concentração. Os extratos orgânicos foram redissolvidos com o solvente extrativo (500 µL) para determinação do perfil cromatográfico e atividade antimicrobiana.

3.6 Cromatografia em camada delgada e Bioautografia

Nos ensaios bioautográficos, em cada placa de cromatografia de camada delgada (CCD) marca MERCK, foram aplicados com capilar o padrão [Itraconazol e Rifampicina (0,005 mg/mL)] e os extratos orgânicos. Os cromatogramas foram desenvolvidos no sistema de eluição: Hexano/Acetato de Etila (6:4 v/v), secos ao ar e observados sob luz ultravioleta para determinadas classes de metabólitos secundários. Os respectivos R_f foram determinados nas bandas visualizadas. Para determinação da atividade antimicrobiana por bioautografia, em condições assépticas, 20 mL dos meios a 40 °C, (ágar Müller-Hinton ou Ágar Sabouraud), suplementados com 500 µL de suspensão celular de cada microgarnismos-teste e 500 µL de Cloreto de Trifeniltetrazoliun -TCC 1,0 % (p/v) foi vertido no cromatograma 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 (Schmourlo et al., 2005; Ahmad e Beg, 2001; Balinova, 1995).

3.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise estatística descritiva no Programa Excel Versão 7.0 e a seleção das espécies para os ensaios bioautográficos pela análise de cluster , método de Ward's e a distância de City-blocks (Manhattan), aos valores do diâmetro médio do halo de inibição em milímetros das espécies estudadas (Valentin, 2000).

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

Josy C. da Silva*, Michel da S. Martins*, Teresa A. Castillo.**, Armando da C. Rodrigues
Jr***, Maria Francisca S. Teixeira**

*Programa de Pos-graduación en Diversidad Biológica-UFAM. **Laboratorio de Micología;
Universidad Federal Del Amazonas-UFAM; 3000, General Rodrigo Octávio Jordão Ramos
Av., Aleixo; CEP 69.000-070; Manaus-Amazonas-Brasil, ***Centro de Excelência;
Ambiental da Petrobras ó CEAP Av. Rio Mar, 185, Ed. Saddik Ale, 1º andar Conj. Vieiralves
- Bairro N. Sra. das Graças CEP: 69053-180; Manaus - Am.

*Josy Caldas da Silva - E-mail: caldas_josy@ufam.edu.br/caldas_josy@yahoo.com.br

La actividad antimicrobiana de especies de *Penicillium* mantenidas bajo dos condiciones de preservación

Resumen

En este trabajo se verificó la viabilidad y la potencialidad antimicrobiana de 60 cultivos de *Penicillium* preservados bajo aceite mineral y en agua destilada esterilizada. Los hongos fueron reactivados en medios de cultivo selectivos y autenticados conforme las características morfológicas. La actividad antimicrobiana fue determinada por la técnica del bloque de Gelosa y bioautobiografía contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* y *Escherichia coli*. De los cultivos reactivados 90% expresaron viabilidad, de estos 52% presentaron actividad antimicrobiana frente a los microorganismos tests. *P. puberulum* DPUA 1146 (halo= 28 mm) y *P. paxilii* DPUA 793 (halo= 28,3 mm) fueron los de mayor espectro antimicrobiano en los tests de difusión en agar. Los tests bioautográficos confirmaron la antibiosis de los cultivos testados destacandose *P. paxilii* DPUA 793, comprobandose así la viabilidad y la potencialidad antimicrobiana dos *Penicillium*.

Palabras-Clave: *Penicillium*, preservación, viabilidad, antagonismo.

***Penicillium* species preserved under two conservation conditions**

Abstract

In this work it was verified the viability and the antimicrobial potentiality of 60 cultures of *Penicillium* preserved under mineral oil and in distilled sterilized water. The fungus were reactivated in a selective medium and authenticated in accordance with morphological features. The antimicrobial activity was determined by the gelose block and bioautography against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* and *Escherichia coli*. From the 60 reactivated cultures 90% expressed viability and 52% of them expressed antimicrobial activity against microorganisms tested. *P. puberulum* DPUA 1146 (inhibition zone=28 mm) and *P. paxilii* DPUA 793 (inhibition zone =28,3 mm) were the species with wide spectrum antimicrobial in the agar diffusion method. The bioautographic tests confirmed the tested cultures antibiosis emphasized in *P. paxilii* DPUA 793, confirming the viability antimicrobial of *Penicillium* species.

Key words: *Penicillium*, conservation, viability, antagonism.

Penicillium son hongos anamorfos representados por más de 300 especies, existiendo entre esas las oportunistas, agentes de patologías humana y de otros animales, predominando las especies productoras de metabolitos secundarios de interés económico. Entre los metabolitos secundarios, *Penicillium* produce antibióticos, micotoxinas, enzimas, anticancerígenos, antioxidantes, insecticidas, herbicidas y fungicidas (1-4).

La constante evolución de microorganismos antibioresistentes está proporcionando el desarrollo de investigaciones científicas en busca de nuevos y eficaces fármacos de diversa origen microbiana. El creciente apareamiento mundial de bacterias multiresistentes, la carencia de antibióticos para combatir tales agentes patógenos continua siendo una gran preocupación de la comunidad médica (5, 6).

Dada la importancia industrial del género *Penicillium* como fuente de alimentos, medicamentos y en la bioremediación, métodos de preservación fueron desarrollados para el mantenimiento *in vitro* de microorganismos, pues la permanencia en medios de cultivo exige una serie de cuidados debido al consumo rápido de nutrientes y a la realización de subcultivos frecuentes, factores que contribuyen para la contaminación y alteración del potencial fisiológico y genético (7-10).

Entre los métodos alternativos propuestos para conservación de hongos los comúnmente utilizados, en las colecciones de microorganismos, son aceite mineral (11), agua destilada (12), esporas en arena (13), sílica gel (14), por liofilización (15) y en nitrógeno líquido (16). Entretanto, el método a ser adoptado depende de la especie a ser preservada y de los recursos que dispone la colección (17). En ese contexto esta investigación tuvo como objetivo verificar la viabilidad morfológica, fisiológica y la potencialidad antimicrobiana de especies de *Penicillium* de la Colección de Cultivo DPUA, preservadas bajo aceite mineral y en agua destilada esterilizada.

Microorganismos

Para este estudio se utilizó 60 culturas de *Penicillium* (Tabela 1), preservadas en agua destilada esterilizada (n=30) y aceite mineral (n=30), almacenadas en la Colección de Cultivo DPUA, del Departamento de Parasitología de la Universidad Federal del Amazonas-UFAM.

Reactivación de los cultivos preservados

De los cultivos preservados en agua destilada esterilizada fueron retiradas fracciones y transferidas para tubo de ensayo conteniendo medio de cultivo inclinado Agar Extrato de Levadura Czapek (CYA) o Caldo Glicosado (CG). Los cultivos fueron mantenidos a 25 °C por siete días.

Autenticación de los cultivos en nivel de especie

Para confirmación de las características macroscópicas, fragmento de cultivo de las especies de *Penicillium* crecidas en medio de cultivo CYA y CG puro fueron transferidos para Agar Extrato de Malta (MEA), Agar Glicerol Nitrato 25% (p/v) [G25N] y Agar Extrato de Levadura Czapek (CYA), en placa de Petri (10 mm x 90 mm), manteniéndose los cultivos a 25 °C, por siete días. Las microestructuras fueron observadas en lámina obtenidas por microcultivo. Para el reconocimiento de las características de la especie fueron utilizadas metodologías descritas por Pitt (18).

Determinación de la actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana fue realizada por el Método del Bloque de Gelosa por difusión en agar. Los microorganismos tests fueron cultivados en Agar Sabouraud, a 25 °C por 48 horas (*Candida albicans* DPUA 1340) y en Agar Müeller-Hinton, a 37 °C por 24 horas (*Staphylococcus aureus* CCT 1352, *Escherichia coli* CCT 0547 y *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE-71). En esos cultivos fue preparado una suspensión celular de concentración semejante a la columna nº1 de la Escala de MacFarland. De cada suspensión,

do en la superficie de Agar Sabouraud y Agar Müeller-Hinton, en placa de Petri (10 mm x 90 mm), formando una camada uniforme. En esos cultivos fueron sobrepuestos tres discos con 5 mm de diámetro retirados del área central de los cultivos de *Penicillium* crecidos en CYA. Las placas fueron incubadas en estufa a 25 °C y 37 °C por 24 y 48 horas, respectivamente. Como padrón fue utilizado Itraconazol y Rifampicina (0,005 mg/mL). La actividad antimicrobiana fue evaluada mediéndose el halo de inhibición.

Extracción de los biocompuestos

Los *Penicillium* fueron cultivados en Agar Extrato de Levadura Czapek (CYA), a 25 °C, y después de siete días fueron retirados discos del centro de la colonia para extracción a frío de los biocompuestos en Hexano. Al término de esa extracción, en el residuo remanente fue adicionado Acetato de Etilo, repitiéndose el procedimiento con Etanol 95%. Los extractos obtenidos después de 48 horas de extracción fueron filtrados en papel Whatman n° 30, sometidos a la concentración y rediluidos con el solvente extractivo (500 µL) para determinación del perfil cromatográfico y actividad antimicrobiana.

Cromatografía en camada delgada (CCD) y Bioautografía

En los ensayos bioautográficos, en cada placa de cromatografía de camada delgada (CCD), marca MERCK, fueron aplicados con capilar el padrón [Itraconazol y Rifampicina (0,005 mg/mL)] y los diferentes extractos orgánicos. Las placas fueron colocadas en el sistema de elución: Hexano/Acetato de Etilo (6:4 v/v), secadas al aire y la revelación de los biocompuestos fue realizada bajo luz ultravioleta para identificación de los metabolitos secundarios y los respectivos R_f fueron determinados en las bandas visualizadas.

Para determinación de la actividad antimicrobiana por bioautografía, en condiciones asépticas, 20 mL (Agar Müeller-Hinton o Agar Sabouraud), mantenidos a 40 °C conteniendo 500 µL de suspensión celular de cada microorganismo test y 500 µL de Cloruro de

) fueron vertidos en la cromatoplaca acondicionadas en placa de Petri mediendo (120 mm x 9 mm). Después de la solidificación del medio, las placas fueron incubadas a 25 °C y 37 °C por 24 y 48 horas, respectivamente. La actividad antimicrobiana fue evaluada visualizandose el área de inhibición (5, 19, 20).

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a análisis estadístico descriptivo en el Programa Excel Versión 7.0 y la selección de las especies para los ensayos bioautográficos por análisis de cluster, método de Ward's y la distancia de City-blocks (Manhattam), a los valores del diámetro medio del halo de inhibición en milímetros de las especies estudiadas (21).

La Tabla 2 está demostrando los datos referentes a la viabilidad de 60 cultivos de *Penicillium*, depositados en la Colección de Cultivo DPUA, preservados en agua destilada esterilizada y bajo aceite mineral, del total de preservados en agua destilada esterilizada, 46,7% y 43,3% demostraron crecimiento cuando subcultivados en CYA, respectivamente. Aquellos que no fueron recuperados oriundos de la preservación de agua destilada totalizaron en 3,3%, entre los preservados por 14 a 16 años y 6,7% de aceite mineral, de los preservados por 12 a 16 años.

El análisis de los cultivos viables ($n = 54$) obtenidos en CYA, MEA, G25N y de los microcultivos en CYA demostraron las características peculiares del género *Penicillium*, fundamentándose en la tasa de crecimiento, en la morfología de la colonia, de las microestructuras y demás caracteres comparados a la llave de clasificación propuesta por Pitt (18). De los 60 cultivos de *Penicillium*, representadas por 30 especies, los que no presentaron crecimiento, en las condiciones experimentales fueron *P. citrinum* DPUA 620, *P. citrinum* DPUA 507, *P. janthinellum* DPUA 645, *P. variable* DPUA 309, preservados bajo aceite mineral y *P. esclerotiorum* DPUA 802, *P. olsonii* DPUA 263, preservados en agua destilada esterilizada. Las especies que crecieron, pero no presentaron esporulación fueron *P. citrinum* DPUA 620, *P. janczewskii* DPUA 304 y *P. steckii* DPUA 306, todas preservadas en agua destilada esterilizada.

De los 54 cultivos viables que fueron sometidos al test de actividad antimicrobiana, 42,87% preservados bajo aceite mineral y 57,13% en agua destilada, expresaron halo de inhibición frente a los microorganismos test (Tabla 3).

De los hongos preservados bajo aceite mineral (Tabla 3), *P. aurantiogriseum* DPUA 268 (halo= 11,6 mm), *P. chrysogenum* DPUA 420 (halo= 11,3 mm), *P. citrinum* DPUA 563 (halo= 11,6 mm), *P. commune* DPUA 296 (halo= 16,6 mm), *P. janthinellum* DPUA 531

PUA 304 (halo= 17,0 mm), *P. olsonii* DPUA 263 (halo= 10,0 mm), *P. simplicissimum* DPUA 567 (halo= 11,6 mm), expresaron actividad bactericida frente a *Staphylococcus aureus* CCT 1352.

La actividad fungistática frente a *Candida albicans* DPUA 1340 fue observada en los tests realizados con *P. citrinum* DPUA 573 (halo= 1,0 mm), *P. decumbens* DPUA 483 (halo= 19 mm), *P. janthinellum* DPUA 487 (halo= 1,0 mm) y *P. steckii* DPUA 306 (halo= 2,0 mm), también preservados en aceite mineral.

Cuanto a los *Penicillium* preservados en agua destilada esterilizada, la producción de metabolito secundario con actividad antimicrobiana presentó amplio espectro de acción inhibitoria uno o mas microorganismos tests (Tabla 3). Selectivamente, las especies que inhibieron el crecimiento de tres de los microorganismos testados fueron *P. janczewskii* DPUA 304, *P. steckii* DPUA 306, *P. paxilii* DPUA 793, *P. puberulum* DPUA 1146, siendo que la intensidad de la actividad inhibitoria exhibió variación en el diámetro de los halos (7,0 mm a 28,0 mm), Tabla 3.

De los 28 cultivos que inhibieron el crecimiento de microorganismos tests, siete cultivos que demostraron mayores halos fueron sometidos a los ensayos de bioautografía, siendo cuatro de los preservados en agua destilada (halo× 24,6 mm) y tres en aceite mineral (halo× 16,6 mm), figura 1. Los resultados de esos análisis revelaron la presencia de compuestos bioactivos en los extractos Acetato de Etilo de *P. commune* DPUA 296, *P. miczynskii* DPUA 1406, *P. rugulosum* DPUA 543, *P. paxilii* DPUA 793, *P. puberulum* DPUA 1146 y *P. janczewskii* DPUA 304 frente, a por lo menos, uno de los microorganismo test. Dentro de estos, *Candida albicans* DPUA 1340 (Ca) y *Staphylococcus aureus* CCT 1352 (Sa) presentaron mayor sensibilidad a las biomoléculas activas presentes en los extractos Acetato de Etilo de las especies de *Penicillium* (Tabla 4).

Ca) fue sensible a los biocompuestos producidos por extractos Acetato de Etilo de *P. miczynskii* DPUA 1406 (*Rf* 0,69, 0,81 e 0,92), *P. decumbens* DPUA 483 (*Rf* 0,92), *P. paxillii* DPUA 793 (*Rf* de valores 0,65, 0,81 e 0,84) y *P. puberulum* DPUA 1146 (*Rf* 0,64, 0,78 e 0,89).

Escherichia coli CCT 0547 (Ec) mostró sensibilidad a dos únicas biomoléculas detectadas en los extractos Acetato de Etilo de *P. rugulosum* DPUA 543 (*Rf* 0,57 y 0,65), mientras que *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE-71 (Ms) presentó sensibilidad a tres biomoléculas de los extractos Acetato de Etilo de *P. paxillii* DPUA 793 (*Rf* 0,65, 0,70 y 0,76) (Tabla 4). *S. aureus* CCT 1352 presentó sensibilidad a tres biomoléculas producidas por extractos Acetato de Etilo de *P. paxillii* DPUA 793 (*Rf* 0,65, 0,69 y 0,78), *P. puberulum* DPUA 1146 (*Rf* 0,50, 0,69 y 0,80), *P. janczewskii* DPUA 304 (*Rf* 0,47, 0,65 y 0,72) y *P. commune* DPUA 296 (*Rf* 0,47, 0,64 e 0,72), Tabla 4.

Las citas disponibles en la literatura acerca de los métodos empleados en la preservación y los respectivos efectos en la diversidad de hongos demostraron que no existe una técnica estándar la cual sea capaz de preservarlos de forma adecuada y generalizada (10, 17, 22, 23). Por lo tanto, al escoger un método para preservación de un determinado grupo de hongo, debe ser llevado en consideración la capacidad de mantenimiento de las características fenotípicas, genotípicas y patógenas de los cultivos almacenados (14, 24).

Los resultados obtenidos en este estudio de evaluación de las características morfofisiológicas para conocer los posibles efectos causados por los métodos de preservación en agua destilada esterilizada y bajo aceite mineral mostraron que entre los 60 cultivos de *Penicillium* examinados, 90% mantuvieron las características morfológicas y fisiológicas, semejantes a descripciones de Pitt (18). Estos datos corroboran con los obtenidos por otros autores (7, 22, 24-28, 39) en los estudios realizados con hongos anamorfos preservados en agua destilada y bajo aceite mineral.

En los resultados de reactivación de los cultivos preservados en agua destilada esterilizada y aceite mineral (12) se verificó que estos fueran métodos eficientes en el mantenimiento de la viabilidad y preservación de las características morfofisiológicas de los *Penicillium*. Probablemente, la predominancia de la viabilidad de los cultivos esté relacionada a la ausencia de subcultivo y a la permanencia del micelio en estado de latencia, condiciones que auxilian en la disminución de mutaciones (29).

Esos resultados están en consonancia con los citados en la literatura a ejemplo de especies de *Fusarium* que sobrevivieron de 4 a 35 años (17) y *Penicillium* y *Aspergillus*, 32 años (14). Otros autores también relatan la eficacia de esos métodos de preservación, pero destacan que se trata de un proceso laborioso, exigiendo la supervisión constante de forma a evitar efectos que pueden alterar los cultivos preservados (14, 17, 31, 32).

ón evaluados en este estudio son los mas prácticos, económicamente viables y han sido usados para diferentes microorganismos, aunque haya riesgo de contaminación y la estabilidad genética pueda ser comprometida (14, 31).

En 1993, Taniwaki (33), cita que diversas investigaciones han sido realizadas para viabilizar métodos destinados al mantenimiento de hongos por largos períodos, con toda la mayoría de las técnicas han procurado extender la longevidad de los cultivos, de forma a mantener las características fisiológicas, incluyendo patogenicidad y producción de sustancias de interés comercial (enzimas, aflatoxinas, polisacáridos, pigmentos, etc).

Además de los análisis acerca de la acción de los métodos de preservación sobre *Penicillium* fue realizado el *screening* de especies productoras de sustancias con actividad antimicrobiana. El resultado mostró que de los 54 cultivos de *Penicillium* viables, mantenidos en agua destilada (n = 28) o bajo aceite mineral (n = 26), 52% presentó efecto inhibitorio contra uno o mas microorganismos tests. Y entre esos cultivos, 22,0 % fueron oriundos de aceite mineral y 32,0% de agua destilada, observandose así, el efecto de esos métodos a la producción de biocompuestos con actividad antagónica, sin desconsiderar las condiciones nutricionales, ambientales y la naturaleza de los hongos fundamentales en la producción de metabolitos secundarios, pues son raras las especies que demuestran el metabolismo secundario (34-36). En 2005, Bérdy (37), también describe la potencialidad de *Penicillium* y *Aspergillus* en la producción de metabolitos antimicrobianos, como fuentes de 1000 antibióticos. Resalta también que los hongos y los actinomicetos son de igual importancia en relación a la producción de biocompuestos para uso medicinal.

La actividad antimicrobiana también fue detectada por biauotografia/cromatografia en camada delgada (CCD) que fue realizada con siete extractos orgánicos de *Penicillium* para identificar los constituyentes responsables por la actividad antimicrobiana contra los microorganismos tests. En estos análisis, se utilizó solamente los extractos con Acetato de

res resultados en relación a la extracción con los demás

solventes (Hexano y Etanol).

Se observó que la mayoría de los extractos presentó actividad para bacterias Gram-positiva, Gram-negativa y *Candida albicans*. La actividad observada para los tres grupos de microorganismos puede ser atribuída a la presencia de compuestos con actividad antibiótica de amplio espectro (38).

Para explotar el potencial de esos extractos como prototipos de nuevos fármacos en la terapia de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos multi-resistentes a drogas se hace necesaria la realización de estudios adicionales sobre constituyentes activos que expresaron actividad antimicrobiana.



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Se comprobó que los métodos de preservación estudiados son eficientes para garantizar la viabilidad, pureza y autenticidad de los cultivos preservados en agua destilada esterilizada y aceite mineral durante largos períodos de tiempo y la potencialidad antimicrobiana de especies de *Penicillium*.



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Agradecemos el apoyo financiero de la CAPES, FAPEAM, UFAM y RENNEBRA/CNPq.

- (1) Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA: Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies Mycol*, 49: 201-241, 2004.
- (2) Okushima L, Saito M, Sase S, Ling P, Ishii M: Spectral characteristics of *Penicillium* species using a frequency controlled liquid crystal filter. *Biosystems Engineering*, 88(3): 265-269, 2004.
- (3) ASAN A: *Aspergillus*, *Penicillium* and related species reported from Turkey. *Mycotaxon*, 89(1): 155-17, 2004.
- (4) Samson RA, PITT JI: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* e *Aspergillus* classification. Harwood Academic Publishrs. Singapore, 2000. p. 510.
- (5) Ahmad I, Beg AZ: Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacology*, 74: 113-123, 2001.
- (6) 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 orthóeast of Algeria. *J Medical Mycol*, 15(1): 45-51, 2005.
- (7) Diogo HC, Sarpieri, A, Pires MC: Preservação de fungos em água destilada. *An_Bras Dermatol*, 80(6): 591-594, 2005.
- (8) Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey A: Presentation of micro-organisms by drying; A review. *J Microbiol Methods*, 66: 183-193, 2006.
- (9) Nakasone KK, Peterson SW, Jong SC: Presevation and distribution of fungal cultures. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS. *Biodiversity of fungi: Inventory and Monitoring Methods*. 37-47pp, 2004.

- z CS: Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Rev Inst Med Trop*, 34: 159-165, 1992.
- (11) Sherf AF: A method for maintaining *Phytomonas sepedonica* in culture for long periods without transfer. *Phytopathology*, 33: 330-332, 1943.
- (12) Castellani A: Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J Trop Med Hyg*, 42: 225-226, 1939.
- (13) Foster JW, Woodruff HB, Mcdaniel LE: Microbial aspects of penicillin. III. Production of penicillin in surface cultures of *Penicillium notatum*. *J Bacteriol*, 46: 421-433, 1943.
- (14) Smith D, Onions AHS: The preservation and maintenance of living fungi. Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lone, Kew, Richmaond Surrey Twi 34F, England - Commonwealth Agricultural Bureaux 1983.
- (15) Raper KB, Alexander DF: Presevation of molds by the lyophil process. *Mycology*, 37: 499-525, 1945.
- (16) Fennel D: Conservation of fungus cultures. *Rev Bot*, 26: 79-141, 1960.
- (17) Lima RF, Borba CM: Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Rev Iberoam Micol*, 18: 191-196, 2001.
- (18) Pitt JI: A laboratory guide to Common *Penicillium* species, Australia: CSIRO, 1985, 182 p.
- (19) 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*, 96: 563-568, 2005.
- (20) Balinova A: Extension of the bioautograph technique for multiresidue determination of fungicide residues in plants and water. *Analytic Chimica Acta* 1995; 311(3) 423-427.
- (21) Valentin JL: *Ecologia Numérica: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos*. Editora Interciência. Rio de Janeiro. 2000, 117p.

Viability and sporulating capability of Coelomycetes

- preserved under a range of different storage regimes. *Rev Iberoam Micol*, 17: 142-145, 2000.
- (23) Bueno L, Gallardo R: Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol*, 15: 166-168, 1998.
- (24) 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.
- (25) Mendoza M, Alvarado P, Torres ED, Lucena L, Albornoz MC: Comportamiento fisiológico y de sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Sporothrix schenkii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación. *Rev Iberoam Micol*, 22: 151-156, 2005.
- (26) 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. *Mycopathol*, 161: 361-368, 2006.
- (27) Capriles CH, Mata S, Middelveen M: Presevation of fungi in water (CASTELLANI): 20 years. *Mycopathol*, 106(2): 73-79, 1989.
- (28) Deshmukh SK: The maintenance and presevation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. *Mycoses*, 46: 203-207, 2003.
- (29) 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*, São Paulo 2004, 71: 1-749.
- (30) Lima RF, Borba CM: Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Rev Iberoam Micol*, 18: 191-196, 2001.
- (31) Figueredo MB: Métodos de Preservação de Fungos Patogênicos. *Biológico*, 63(1/2): 73-82, 2001.

Anabiosis and conservation of microorganisms. J Culture

Collection, 4: 17-28, 2005.

(33) Taniwaki II: Variabilidade de produção de aflotoxinas por linhagens de *Aspergillus flavus* em diferentes tempos de conservação. Sc agric Piracicaba 1993, 50 (1): 140-150.

(34) Larpent JP, Sanglier JJ: Biotechnologie des antibiotiques. Paris: MASSON, 1989, 496 p.

(35) Griffin DH: Fungal physiology. 2 ed. Wiley-Liss, NY. 1993, 458 p.

(36) Deacon JW: Modern mycology. 3 ed. Blackwell Science, Oxon- NY. 1997, 303 p.

(37) Bérdy J: Bioactive Microbial Metabolites. J Antibiot, 58 (1): 1-26, 2005.

(38) 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*. Fitopatologia Brasileira, 31: 94-98, 2006.

(39) Panizo MM, Reviakina V, Montes W, González G: Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. Rev. Soc. Ven. Microbiol., jan, 25 (1): 35-40. ISSN 1315-2556, 2005.

Tabla 1 Especies de *Penicillium* seleccionadas para el estudio de la viabilidad morfofisiológica y determinación de la actividad antimicrobiana, preservadas en agua destilada esterilizada y bajo aceite mineral en la Colección de Cultivos DPUA

Cultivos preservados en agua destilada	Cultivos preservados bajo aceite mineral
ESPECIE	ESPECIE
<i>P. aurantiogriseum</i> DPUA 428	<i>P. aurantiogriseum</i> DPUA 268
<i>P. aurenicola</i> DPUA 798	<i>P. chysogenum</i> DPUA 420
<i>P. chrysogenum</i> DPUA 305	<i>P. citrinum</i> DPUA 507
<i>P. chrysogenum</i> DPUA 582	<i>P. citrinum</i> DPUA 563
<i>P. chrysogenum</i> DPUA 921	<i>P. citrinum</i> DPUA 620
<i>P. citrinum</i> DPUA 620	<i>P. commune</i> DPUA 298
<i>P. citrinum</i> DPUA 693	<i>P. decumbens</i> DPUA 483
<i>P. decumbens</i> DPUA 559	<i>P. decumbens</i> DPUA 559
<i>P. esclerotiorum</i> DPUA 802	<i>P. decumbens</i> DPUA 517
<i>P. expansum</i> DPUA 546	<i>P. esclerotiorum</i> DPUA 599
<i>P. glabrum</i> DPUA 1435	<i>P. fellutanum</i> DPUA 595
<i>P. janczewskii</i> DPUA 577	<i>P. glabrum</i> DPUA 1136
<i>P. janczewskii</i> DPUA 304	<i>P. implicatum</i> DPUA 479
<i>P. janthinellum</i> DPUA 1381	<i>P. janczewskii</i> DPUA 577
<i>P. melinii</i> DPUA 1391	<i>P. janthinellum</i> DPUA 426
<i>P. miczniskii</i> DPUA 1406	<i>P. janthinellum</i> DPUA 487
<i>P. minioluteum</i> DPUA 598	<i>P. janthinellum</i> DPUA 531
<i>P. montanense</i> DPUA 1533	<i>P. janthinellum</i> DPUA 572
<i>P. olsonii</i> DPUA 263	<i>P. janthinellum</i> DPUA 645
<i>P. paxilii</i> DPUA 793	<i>P. melini</i> DPUA 634
<i>P. paxilii</i> DPUA 938	<i>P. janczewskii</i> DPUA 304
<i>P. pulberulum</i> DPUA 1146	<i>P. olsonii</i> DPUA 263
<i>P. purpurogenum</i> DPUA 1275	<i>P. oxalicum</i> DPUA 584
<i>P. rugulosum</i> DPUA 543	<i>P. paxilii</i> DPUA 226
<i>P. simplicissimum</i> DPUA 1379	<i>P. raistrickii</i> DPUA 485
<i>P. simplicissimum</i> DPUA 567	<i>P. simplicissimum</i> DPUA 567
<i>P. spinulosum</i> DPUA 499	<i>P. steckii</i> DPUA 306
<i>P. steckii</i> DPUA 306	<i>P. steckii</i> DPUA 573
<i>P. waksmanii</i> DPUA 530	<i>P. variabile</i> DPUA 309
<i>P. waksmanii</i> DPUA 623	<i>P. waksmanii</i> DPUA 623

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

os de *Penicillium* preservados en agua destilada esterilizada y
le estoque cuando subcultivadas en agar Czapek Extracto de

Levadura (CYA) a 25 °C/ 7días.

Año de presevación	Tiempo presevación (años)	Cultivos preservados en agua			Cultivos preservados bajo aceite mineral		
		Testados (%)	Recuperados (%)	Inviabiles (%)	Testados (%)	Recuperados (%)	Inviabiles (%)
2006	1	-	-	-	1,67	1,67	-
2005	2	1,67	1,67	-	-	-	-
2004	3	1,67	1,67	-	-	-	-
2002	5	3,33	3,33	-	-	-	-
1999	8	5,0	5,0	-	-	-	-
1997	10	-	-	-	1,67	1,67	-
1995	12	-	-	-	1,67	-	1,67
1994	13	1,67	1,67	-	1,67	1,67	-
1993	14	23,33	21,67	1,67	16,67	16,7	-
1992	15	8,33	8,33		18,33	15,0	3,33
1991	16	5,0	3,33	1,67	8,33	6,67	1,67
Total	-	30	28	2	30	26	4
(%)	-	50	46,7	3,3	50	43,3	6,7

ón en agar de los cultivos viables preservados bajo aceite mineral y

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

^sBacteriostático, ^bBactericida, ^cFungistático, ^dFungicida, Ca= *Candida albicans* DPUA 1340, Ec= *Escherichia coli* CCT 0547, Ms= *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE-71, Sa= *Staphylococcus aureus* CCT 1352, R=resistente (no hubo desarrollo del halo de inhibición).

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

Trichoderma reesei seleccionadas en los test por difusión en agar

Especies	R _f	Color (λ= 365 nm)	Actividad antimicrobiana			
			Ca	Ec	Ms	As
<i>P. commune</i> DPUA 296	0,47	Verde	R	R	R	S
	0,64	Verde	R	R	R	S
	0,72	Verde	R	R	R	S
<i>P. decumbens</i> DPUA 483	0,92	Verde	S	R	R	R
<i>P. miczynskii</i> DPUA 1406	0,69	Verde	S	R	R	R
	0,81	Verde	S	R	R	R
	0,92	Verde	S	R	R	R
<i>P. miczynskii</i> DPUA 304	0,47	Verde	R	R	R	S
	0,65	Verde	R	R	R	S
	0,72	Rosa	R	R	R	S
<i>P. paxilii</i> DPUA 793	0,65	Verde	S	R	R	R
	0,81	Verde	S	R	R	R
	0,84	Verde	S	R	R	R
	0,50	Verde	R	R	R	R
	0,69	Verde	R	R	R	S
	0,78	Verde	R	R	R	S
	0,65	Verde	R	R	S	S
	0,70	Verde	R	R	S	R
	0,76	Verde	R	R	S	R
<i>P. puberulum</i> DPUA 1146	0,50	Naranja	R	R	R	S
	0,69	Verde	R	R	R	S
	0,80	Verde	R	R	R	S
	0,64	Verde	S	R	R	R
	0,78	Verde	S	R	R	R
	0,89	Verde	S	R	R	R
<i>P. rugulosum</i> DPUA 543	0,57	Verde	R	S	R	R
	0,65	Verde	R	S	R	R

Ca= *Candida albicans* DPUA 1340, Ec= *Escherichia coli* CCT 0547;

Ms= *Mycobacterium smegmatis* PDUFPE-71;

Sa= *Staphylococcus aureus* CCT 1352, R=resistente (no hubo desarrollo del halo de inhibición),

S=sensible (hubo desarrollo del halo de inhibición)

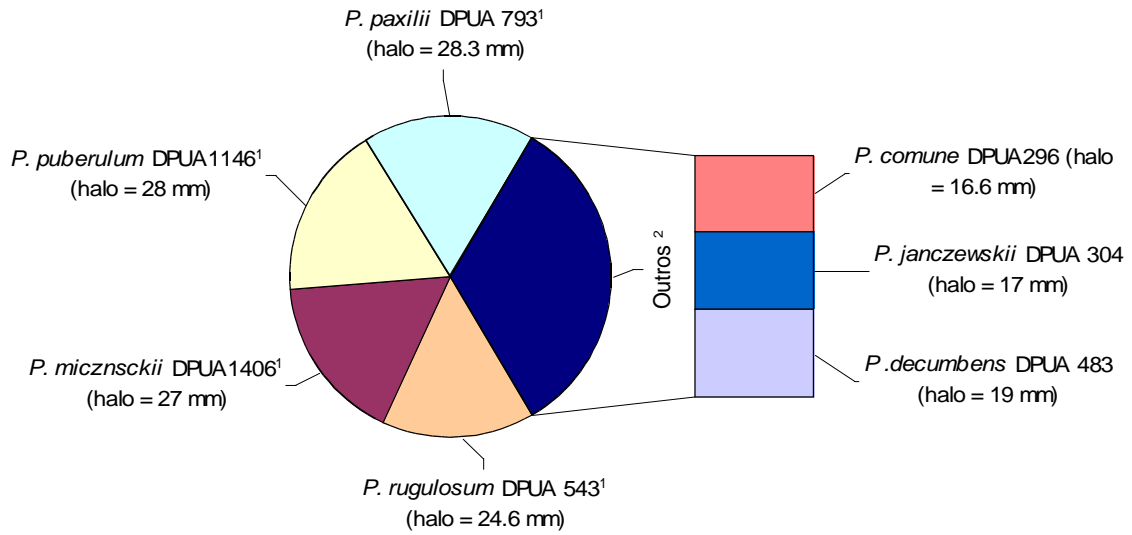


Figura 4 Especies de *Penicillium* de mayor actividad antimicrobiana seleccionadas para los tests de bioautografía.¹Preservados en agua destilada; ²Preservados bajo aceite mineral

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.113-123. 2001.

ASAN, A. *Aspergillus*, *Penicillium* and related species reported from Turkey. **Mycotaxon**, v. 89 n. 1, p. 155-17. 2004.

ASAN, A. Check list of *Aspergillus* and *Penicillium* species reported from Turkey. **Turk Journal Botanic**, v. 24, p. 151-167. 2000.

BAKER, C. J. O; SHABAN-NEJAD, A; SU, X; HAARSLEV, V; BULLER, G. Semantic web infrastructure for fungal enzyme biotechnologists. **Journal of Web Semantics**, v. 4, n.3, p. 168-180, 2006.

BALINOVA, A. Extension of the bioautograph technique for multiresidue determination of fungicide residues in plants and water. **Analytic Chimica Acta**, vol. 311, n° 3, p. 423-427, 1995.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 101-107, 1998

BORMAN, A. M.; SZEKELY, A.; CAMPBELL, C. K.; JOHNSON, E. M. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. **Mycopathol**, v. 161, p. 361-368. 2006.

BRASIL. Ministério da ciência e tecnologia. **Sistema de avaliação da conformidade de material biológico**. Brasília, SENAI/IDN, 2002. Disponível em: [www.mct.gov.br/ Temas/ Desenv/ MaterialBiologico. pdf](http://www.mct.gov.br/Temas/Desenv/MaterialBiologico.pdf).

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P Microbial resource cultures and Ex- Situ Conservation. In PRIEST, F. G; GOODFELLON, M. (Org.) **Applied microbial systematics**. Amsterdam: Klurs Academic Publishers, p. 421-446. 2000.

CANHOS, D. A. L.; CANHOS, V. P.; SOUZA, S. Coleção biológica e Sistema de Informação. In: CANHOS, V. P.; PEIXOTO, A. L.; BARBOSA, M. R. V.; MENEZES, M.; MAIA, L. C.; VAZOLLER, R. F.; MARINONNI, L.; CANHOS, A. L. (Org.) **Diretrizes e estratégias para modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade**. 1 ed. Brasília, DF: Ministério da Ciência e Tecnologia, p. 241-311. 2006

CANHOS, V. P. Centros de recursos biológicos: suporte ao desenvolvimento científico e inovação tecnológica. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 27-29. 2003.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 42, p. 225-226. 1939.

COMERIO, R. M. Nefrotoxinas y Especies nefrotóxicas del género *Penicillium* Link. **Revista Iberoamericana Micology**, v. 17, p. 82-89. 2000.

CONTI, R.; CUNHA, I. G. B.; SIQUEIRA, V. M.; SOUZA-MOTTA, C. M.; AMORIM, E. L. C.; ARAÚJO, J. M. Diversity and antimicrobial activity of endophytic Actinobacteria and fungi from *Borreria verticillata* (L.) G. F. W. Meyer. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2007.

DORGE, T.; CARSTENSEN, J. M.; FRISVAD, J. C. Direct identification of pure *Penicillium* species using image analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 41, p. 121-133. 2000

DUARTE, E. R.; LACHANCE, M.; HAMDAN, J. S. Identification of atypical strains of *Malassezia* spp from cattle and dog. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 749-752. 2002.

ELIAS, B. C.; SAID, S.; ALBUQUERQUE, S.; PUPO, M. T. The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. **Microbiological Research**, v. 161, n. 3, p. 273-280. 2006.

FENNEL, D. Conservation of fungus cultures. **Revist Botanic**, v. 26, p. 79-141. 1960.

FERNANDES, O. C. C.; CASTILLO, T. A.; LIMA, A. R. S.; PEIXOTO, J.; MACHADO, M.; BRITO, E.; ROCHA, W. C.; SILVA, A. B.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Produção de biocompostos com atividade antimicrobiana em fermentação semi-sólida por *Penicillium implicatum* 297 isolado de solo da região Amazônica-Brasil. In: SINAFERM - XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005, Recife-PE. CD-ROM SINAFERM - XV Simpósio Nacional de Bioprocessos. Recife-PE: SINAFERM - XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, v. 1. 2005.

FIGUEREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **Biológico**, v.63, n. 1/2, p. 73-82. 2001.

FOSTER, J. W.; WOODRUFF, H. B.; MCDANIEL, L. E., Microbial aspects of penicillin. III. Production of penicillin in surface cultures of *Penicillium notatum*. **Journal Bacteriology**, v. 46, p. 421-433. 1943.

GIRÃO, M. D.; PADRO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viability of *Malassezia pachydermatis* strains maintained in various storage mediums. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 229-233. 2004.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, M. A. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500. 1999

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current opinion in Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 278-285. 1998.

KITOUNI, M.; BOUDEMAGH, A.; OULMI, L.; REGHIOUA, 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

Algeria. **Journal of Medical Mycology** v. 15, n 1, p. 45-

31. 2005.

LIMA, R. F.; BORBA, C. M.. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. **Revist Iberoamericana Micology** v. 18, p. 191-196. 2001.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, PA.; VESEY, A. Preservation of microorganisms by drying; A review. **Journal Microbiology Methods**, v. 66, p. 183-193. 2006.

NAKASONE, K. K.; PETERSON, S. W.; JONG, S. C. Presevation and distribution of fungal cultures. In: MUELLER, GM., BILLS, GF e FOSTER, MS. **Biodiversity of fungi: Inventory and Monitoring Methods**. p. 37-47. 2004.

OKUSHIMA, L.; SAITO, M.; SASE, S.; LING, P.; ISHII, M. Spectral characteristics of *Penicillium* species using a frequency controlled liquid crystal filter. **Biosystems Engineering**, v. 88, n. 3, p. 265-269. 2004.

OLIVEIRA, I. S.; LUZ, E. D. M. N.; MOURA, R. M.; MAIA, L. C. Distribuição geográfica e diversidade morfológica de culturas de *Penicillium sclerotigenum* em Inhames no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 131-136. 2007a.

OLIVEIRA, I. S.; MOURA, R. M.; LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L.; TORRES, G. R. C.; MAIA, L. C. Severidade da podridão-verde em inhames e especialização fisiológica em *Penicillium sclerotigenum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 94-98. 2006b

PATERSON, M. R. R.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Solution to *Penicillium* crucial to mycotoxin research and health. **Biosystems Engineering**, v. 88, p. 265-269, 2004

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**, Australia: CSIRO, 182 p. 1985.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important?. **Medical Mycology**, v. 38, n. 1, p. 17-22. 2000.

RAPER, K. B.; ALEXANDER, D. F. Presevation of molds by the lyophil process. **Mycology**, v. 37, p. 499-525. 1945.

RAPER, K. B.; THOM, C. **A manual of the *Penicillia***. Baltimore: The Williams & Wilkins company, 847 p, 1949.

RASMUSSEN, T. B.; SKINDERSOE, M. E.; BJARNSHOLT, T.; PHIPPS, R. K.; CHRISTENSEN, K. B.; JENSEN, P. O.; ANDERSON, J. B.; KOCH, B; LARSEN, T. O.; HENTZER, M.; EBERL, L.; HOIBY, N.; GIVSKOV, M. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. **Journal Bacteriology**, v. 187, p. 1799-1814. 2005.

ROKEM, J. S.; LANTZ, A. E.; NIELSEN, J. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. **Natural Product Reports Articles**, v. 24, p.1262-1287. 2007.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

GE, P. D.; JEFFRIES, P. The relationship between preservation methods and secondary metabolite production in *Metarhizium anisopliae* and *Fusarium oxysporum*, **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 19, p. 839-844. 2003;

SAMSON, R. A.; STOLK, A. C.; HADLOK, R. Revision of the subsection Fasciculata of *Penicillium* and some allied species. **Study Mycology** (Baarn) v. 11, p. 1-47. 1976.

SANTOS, I. M.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 272-275. 2002.

SCHMOURLO, G.; MENDOÇA-FILHO, R. R.; ALVINO, C. S.; COSTA, S. S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal Ethnopharmacol**, vol. 96, p. 563-568, 2005.

SETTE, L. D. Nota técnica: Recursos humanos e infra-estrutura para coleções microbiológicas. Disponível em : www.cria.org.br/cgee/documentos/infraestrutura.doc 2005.

SHERF, A. F. A method for maintaining *Phytophthora sepedonica* in culture for long periods without transfer. **Phytopathology**, v. 33, p. 330-332, 1943.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi**. Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lane, Kew, Richmond Surrey TW20 34F, England - Commonwealth Agricultural Bureaux. 1983.

TEIXEIRA, M. F. S. Coleções de culturas: Organização e contribuição aos processos biotecnológicos. In: Workshop meio ambiente, ciências e tecnologia de mãos dadas para o futuro, I. 2006, Recife. **Anais I Workshop Meio Ambiente, Ciências e Tecnologia de mãos dadas para o futuro**. Recife: UFPE, 2006. 1 CD-ROM

TEIXEIRA, M. F. S.; MACHADO, A. R. G.; CALDAS, J.; TEIXEIRA, C. E. S.; CASTILLO, T. A.; CARNEIRO, A. L. B.; FERNANDES, O. C. C. Coleção de Culturas DPUA-UFAM: Identificação, incorporação e fornecimento de culturas em 2007. In: 5 Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife-PE. Programas e Resumos: 5 Congresso Brasileiro de Micologia. Recife-PE: Ed Universitária da UFPE, 2007.

UZUNOVA-DONEVA, T.; DONEV, T. Anabiosis and conservation of microorganisms. **Journal of Culture Collections**, v. 4, p. 17-28. 2005.