
Ciências Biológicas

Angelo Miguel Brino Ferreira Dos Santos

**Investigação do potencial antibacteriano do
Ácido penicílico produzido pelo fungo
Penicillium sp. (CRM 1540)**



Rio Claro - SP
2025

Angelo Miguel Brino Ferreira Dos Santos

Investigação do potencial antibacteriano do Ácido penicílico produzido pelo fungo
Penicillium sp. (CRM 1540)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Bacharel e
Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Profa. Dra. Daiane Cristina Sass

Rio Claro - SP
2025

S237i

Santos, Angelo Miguel Brino Ferrerira dos

Investigação do potencial antibacteriano do Ácido penicílico produzido pelo fungo *Penicillium* sp. (CRM 1540 / Angelo Miguel Brino Ferrerira dos Santos. -- Rio Claro, 2025

13 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Daiane Cristina Sass

1. Microbiologia medica. 2. Metabólitos. 3. Resistência a antibióticos. I. Título.

Angelo Miguel Brino Ferreira Dos Santos

Investigação do potencial antibacteriano do Ácido penicílico produzido
pelo fungo *Penicillium* sp. (CRM 1540)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Bacharel e
Licenciado em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Daiane Cristina Sass

Prof. Dr. Henrique Ferreira

Dr. Vitor Rodrigues Marin

Aprovado em: 06 de Junho de 2025

Assinatura do discente

Assinatura do(a) orientador(a)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à Rosilene Aparecida Brino, minha mãe, cujo apoio foi fundamental para que eu pudesse acessar e me manter em uma instituição pública de ensino superior. Expresso minha gratidão à Profa. Dra Daiane Cristina Sass, pela orientação e pela oportunidade de desenvolver este e outros projetos em seu Laboratório, o LAQBIM, assim como a todos os colegas de laboratório, dos quais o auxílio foi essencial ao longo desses anos de aprendizado. Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro a este trabalho por meio da bolsa PIBIC nº 6323. Por fim, agradeço ao Instituto de Biociências da UNESP, campus de Rio Claro, por me proporcionar uma formação ampla, permitindo a reflexão sobre minha futura atuação profissional.

RESUMO

O uso excessivo de antibióticos na saúde e na agricultura, juntamente com o gerenciamento de resíduos inadequado, contribuiu para um aumento substancial da resistência antimicrobiana (RAM) nos últimos anos. Fato esse que gera uma preocupação global, devido às implicações sanitárias e econômicas geradas pelo aumento de microrganismos resistentes. Dessa forma, a busca de novas moléculas bioativas, com potencial antimicrobiano, se tornou indispensável, sendo os produtos naturais, tais como metabólitos secundários, expoentes na busca por novos tratamentos. O objetivo do presente trabalho foi investigar o potencial de bioatividade do ácido penicílico, produzido pelo fungo *Penicillium* sp. (CRM 1540), isolado da Antártica, contra as bactérias de importância clínica: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, ambas gram negativas, e *Bacillus subtilis*, gram positiva. Com base nos dados obtidos foi possível determinar a atividade antibacteriana do ácido penicílico, o qual apresentou inibição do crescimento bacteriano para as três bactérias testadas. O ácido penicílico se mostrou capaz de inibir as três bactérias, em especial a *E. coli*, apresentando inibição de 90% de crescimento bacteriano até 25ug/mL, evidenciando seu potencial para (co)tratamento e abrindo horizonte para novos estudos.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana (RAM); Biomoléculas; Bioatividade

ABSTRACT

The excessive use of antibiotics in health and agriculture, together with inadequate waste management, has contributed to a substantial increase in antimicrobial resistance (AMR) in recent years. This fact has generated global concern due to the health and economic implications generated by the increase in resistant microorganisms. Thus, the search for new bioactive molecules with antimicrobial potential has become essential, with natural products, such as secondary metabolites, being exponents in the search for new treatments. The objective of this study was to investigate the bioactivity potential of penicillic acid, produced by the fungus *Penicillium* sp. (CRM 1540), isolated from Antarctica, against the clinically important bacteria: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, both gram-negative, and *Bacillus subtilis*, gram-positive. Based on the data obtained, it was possible to determine the antibacterial activity of penicillic acid, which showed inhibition of bacterial growth for the three bacteria tested. Penicillic acid proved capable of inhibiting all three bacteria, especially *E. coli*, showing 90% inhibition of bacterial growth at concentrations up to 25 µg/mL. This highlights its potential for (co)treatment and opens new avenues for further research..

Keywords: Antimicrobial resistance; Biomolecule; Bioactivity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 MATERIAIS E MÉTODOS	10
2.1 Avaliação da atividade antibacteriana e bactericida contra <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>B. subtilis</i> .	10
2.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM):	12
2.3 Efeito do ácido penicílico na produção de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> .	12
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1 Avaliação antibacteriana do ácido penicílico contra <i>Bacillus subtilis</i>	14
3.2 Avaliação antibacteriana do ácido penicílico contra <i>E. coli</i> :	16
3.3 Avaliação antibacteriana do Ácido Penicílico contra <i>P. aeruginosa</i>	19
3.4 Avaliação do efeito do Ácido Penicílico na produção de biofilme por <i>P. aeruginosa</i> :	21
4 CONCLUSÃO	24

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana vem causando o aumento de infecções em ambientes hospitalares e complicações socioeconômicas generalizadas, sendo considerada uma ameaça global por representar um desafio de alta prioridade para a saúde pública. Suas amplas implicações epidemiológicas e econômicas, são agravadas não apenas pela diminuição da eficácia dos agentes antimicrobianos atualmente disponíveis, mas também pelo desenvolvimento limitado de novas moléculas genuinamente eficazes (Wu *et al.*, 2013; Ferrara *et al.*, 2024). A capacidade de adaptação microbiana ligada ao uso excessivo de antibióticos na saúde e na agricultura, juntamente com o gerenciamento inadequado de resíduos e tratamento ambiental, levou a um aumento substancial de microrganismos multirresistentes a diversas classes de medicamentos (Nadimpalli *et al.*, 2020; Schrader *et al.*, 2020). Além disso, durante a pandemia de 2020, tivemos o aumento massivo no uso de antibióticos como (co)tratamento de COVID-19 em todo o mundo (Getahun *et al.*, 2020; Oldenburg e Doan, 2020), fato que pode corroborar com o surgimento de mais bactérias resistentes (Rawson *et al.*, 2020). O alto número de infecções secundárias, muitas vezes associadas a bactérias multirresistentes, são observadas especialmente em pacientes hospitalizados e naqueles com o sistema imunológico já comprometido (Zhou *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020), estima-se que pelo menos 700.000 pessoas em todo o mundo morram a cada ano como resultado de infecções resistentes a medicamentos, e isso pode aumentar para até 10 milhões em 2050 (Miethke *et al.*, 2021).

Infelizmente, como já citado, o aumento mundial de patógenos bacterianos resistentes a agentes antibacterianos não pode ser contrabalançado pelo baixo ritmo de desenvolvimento de terapias com novos modos de ação (Miethke *et al.*, 2021; Ferrara *et al.*, 2024), cerca de 30 a 40 novos compostos antibacterianos estão atualmente nas fases de desenvolvimento de ensaios clínicos e, notavelmente, os candidatos direcionados a patógenos prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS) são derivados de classes existentes (Beyer & Paulin, 2020). Além disso, grandes empresas farmacêuticas vêm abandonando a pesquisa de medicamentos antibacterianos, transferindo a responsabilidade para pequenas startups e empresas

de biotecnologia, o que influencia no investimento e direcionamento de novas pesquisa focada nesse tipo de produto (Ferrara *et al.*, 2024)

Dessa forma, visto o cenário global do aumento de microrganismos resistentes, há uma grande demanda de estudos com novas moléculas potenciais candidatas a medicamentos antibacterianos, neste sentido, os produtos naturais são muito importantes na busca por novas moléculas que sejam biologicamente ativas (Strohl, 2000). Nesse horizonte, estudos com metabólitos bioativos de microrganismos vêm crescendo nas últimas décadas, com um enfoque evidente nos metabólitos secundários de fungos, fato esse que pode ser explicado pela grande diversidade de espécies e de metabólitos secundários bioativos presente nesse grupo de organismos (Billsl e Gloer, 2016).

Em trabalhos anteriormente realizados por nosso grupo de pesquisa, foram encontrados fungos, isolados de diversos habitat, produtores de compostos com atividade contra bactérias que causam doenças no campo, como bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*, sendo isolados e identificados alguns destes produtos naturais bioativos. Dentre estes está o ácido penicílico, produzido pelo fungo *Penicillium* sp. (CRM 1540), isolado de sedimentos marinhos da Antártica. Em nossos estudos contra a bactéria *Xanthomonas citri* este composto apresentou 90% de inibição bacteriana em 25 µg/mL (Vieira *et al.*, 2022). Além disso, verificamos que o ácido penicílico reduziu a formação de biofilme em *X. citri*, indicando que o ácido penicílico provavelmente age como um inibidor de *Quorum Sensing* atuando como composto anti-biofilme (Rasmussen *et al.*, 2005; Liaqat *et al.*, 2014).

Dado os resultados relevantes que o ácido penicílico apresentou em *Xanthomonas*, neste trabalho foi avaliado o potencial deste composto contra bactérias de interesse clínico/farmacêutico. Dessa forma, investigou-se a ação do ácido penicílico em bactérias patogênicas que assim como *X. citri* são Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Escherichia coli é uma das principais bactérias presentes nas microbiotas intestinais, tanto do homem quanto de outros animais (Campos e Trabulsi, 2002), possui diversos sorotipos e acredita-se que a maioria não apresenta virulência. No entanto, algumas cepas são responsáveis pela alta incidência de infecções entéricas bem como extraintestinais (Saidenberg, 2008; Saviolli, 2010). *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) é causadora de infecções em sítios cirúrgicos,

hospitalares em geral e infecções na corrente sanguínea. Esta bactéria assim como *X. citri* apresenta formação de biofilme e esta propriedade faz com que *P. aeruginosa* apresente capacidade de proliferação em equipamentos hospitalares, soluções antissépticas, desinfetantes, dentre outros (Thi *et al.*, 2020). Além disso, a ação do ácido penicílico foi investigada contra *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), que é considerado microrganismo modelo de bactéria Gram-positiva (Matias e Beveridge, 2005; Pinho *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2016).

2 MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Avaliação da atividade antibacteriana e bactericida contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*.

A avaliação da atividade antibacteriana do ácido penicílico foi realizada por meio do bioensaio de microdiluição utilizando o corante resazurina como bioindicador (Resazurin microtiter assay – REMA) (Silva, 2013). Para o bioensaio, foi preparada uma solução estoque do composto suspenso em dimetilsulfóxido (DMSO) 1%. Em seguida a solução estoque foi diluída em meio de cultura de acordo com a bactéria utilizada, LB (1% Triptona; Cloreto de Sódio 1%; extrato de levedura 0,5%) para *B. subtilis* e *E. coli* e meio NA (1% Peptona; Cloreto de Sódio 1%; extrato de carne 0,5%) para *P. aeruginosa*, diretamente na placa de 96 poços. Na sequência, foram adicionados os inóculos bacterianos padronizados, incubados a 36°C e 200rpm por 2h, a fim de chegar a aproximadamente as seguintes densidades ópticas (DO600nm): 0,4 (*B. subtilis*) e 0,2 (*E. coli* e *P. aeruginosa*) previamente cultivados. As D.O's utilizadas têm como referência a fase *log* de crescimento bacteriano.

A montagem da placa de REMA se deu inicialmente adicionando 90µL de meio em todos os poços, com exceção dos poços A5 a A8 e da coluna 10. A solução estoque de ácido penicílico foi diluída em meio de cultura de acordo com a bactéria utilizada diretamente na placa de 96 poços, com concentração inicial de 200µg/mL. Por fim, são adicionados os inóculos bacterianos com DO600nm padronizada, como anteriormente descrito, com diluição padronizada em meio para obtenção de 10⁵ unidades formadoras de colônia (UF) por poço

O controle positivo mudou de acordo com a bactéria, sendo utilizados os antibióticos Ampicilina, Gentamicina e Kanamicina para os testes com *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, respectivamente. As Soluções de estoque dos antibióticos foram feitas em água destilada (200 µg/mL), sendo diluídas para 20 µg/mL (50 µL da solução estoque em 450 µL de meio). Foram adicionados 100 µL deste controle nos poços A10, B10, C10 e D10. O controle negativo foi montado diretamente em placa, na coluna 11, consistindo de meio de cultivo com a adição de inóculo padronizado.

Após a montagem da placa, a mesma foi incubada por 6 horas à temperatura de 36°C, com 15 µL de uma solução de resazurina 0,01% (m/v) sendo aplicada na

sequência, para então a placa ser novamente incubada, na mesma temperatura, por aproximadamente 2 horas. O uso da resazurina no teste, de cor azul e de baixa fluorescências, se baseia em sua redução para resorufina, cor rosa e fluorescente, na presença do metabolismo oxidativo dos organismo presente, sendo a oxidação proporcional a respiração aeróbica, permitindo quantificar a viabilidade dos patógeno presente.

As avaliações das atividades da amostras contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B.subtilis* foram realizadas quantitativamente pelo espectrofotômetro de fluorescência Biotek Synergy H1MFD. A porcentagem de inibição do composto foi dada como base nas Unidades de Fluorescência (UF), aplicando a seguinte fórmula:

$$I \% = \frac{[(\text{Média UF controle negativo}) - (\text{Média UF Ac. penicílico})]}{(\text{Média UF controle negativo})} \times 100\%$$

O percentual de inibição (I%) corresponde à inibição observada em cada poço tratado em comparação ao crescimento bacteriano do controle negativo, sem tratamento. Com base no cálculo de I%, foram elaborados gráficos de Dose-Resposta para cada bioensaio, permitindo a obtenção da equação polinomial da curva resultante, que possibilitou a determinação da concentração inibitória mínima necessária para inibição de 90% do crescimento bacteriano (IC⁹⁰). A mesma equação, quando necessário, também foi usada para estimar a concentração inibitória mínima para 50% do crescimento (IC⁵⁰).

Ressalto que todas as placas do bioensaio foram feitas em triplicatas, em dias diferentes

2.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM):

O ácido penicílico também foi submetido ao bioensaio bactericida para a avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), com a inoculação do conteúdo da microplaca de 96 poços contendo as diluições do composto e as bactérias (após a primeira incubação e antes da adição de resazurina) em placa de Petri (150 x 15 mm) contendo meio de cultivo sólido, utilizando um replicador de colônias, sendo incubado por 24 horas a 36°C.

Com base nos resultados de CBM, em comparação aos dados obtidos no REMA, pode-se aferir o carácter do composto, se o mesmo é bactericida ou bacteriostático

2.3 Efeito do ácido penicílico na produção de biofilme de *P. aeruginosa*.

A produção de biofilme por *P. aeruginosa* foi avaliada na presença do Ácido penicilínico. Para isto, as amostras foram avaliadas em placas de 96 poços usando método Cristal Violeta (CV) para quantificação de desenvolvimento de biofilme em superfície abiótica (Malamud *et al.*, 2011). Uma colônia de *P. aeruginosa* foi inoculada em 5 mL de meio NA líquido e as células incubadas à 36°C e 200 rpm overnight. A DO₆₀₀ do inóculo será ajustada para 0,4 (Espectrômetro UV/Vis UV-1650PC, Shimadzu) com meio mínimo (XVM2). Os concentrações com ações sinérgicas, obtidas no bioensaio Check board, foram diluídas em meio XVM2, para as concentrações que compreendam a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e concentrações inferiores, onde crescimento bacteriano é pouco ou não afetado, e alíquotas de 100 µL da suspensão bacteriana diluída 1:1000 em XVM2 foram adicionadas à placa de 96 poços, com volume final de 200 µL. O controle negativo consistiu em poços contendo XVM2 sem inóculo. A placa foi incubada a 36 °C por 5h e a DO₆₀₀ determinada em leitor de placas. O teste foi realizado em duplicata para cada concentração

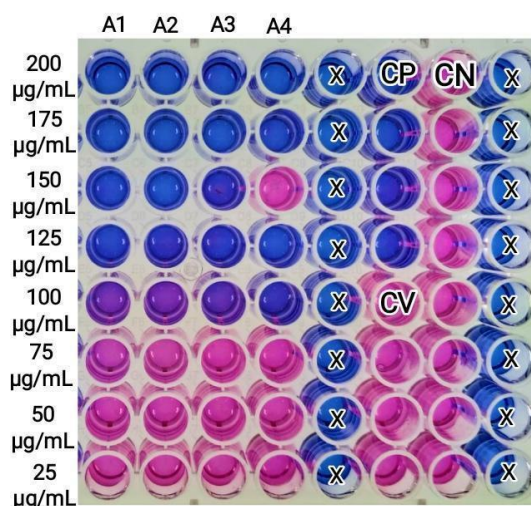
A quantificação do biofilme ligado à superfície foi feita pela remoção do meio de cultivo e lavagens cuidadosas da placa com água destilada, seguida de coloração com solução de CV a 0,1% e incubação por 30 min. Após incubação o CV não ligado foi removido e os poços lavados duas vezes com água destilada. O CV ligado em cada poço foi solubilizado com 270 µL de ácido acético (CH₃COOH) a 30% (v/v) e a absorbância (A) medida a 590 nm. Os dados foram normalizados seguindo a fórmula (A_{590}/OD_{600}) para comparação das médias no software JASP v. 0.14.1 (Team JASP, 2020).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação antibacteriana do ácido penicílico contra *Bacillus subtilis*

Ao final do bioensaio REMA obtivemos a placa da Figura 1, na qual é possível observar, visualmente, que houve uma inibição no crescimento bacteriano nas primeiras concentrações, 200 a 100µg/ml, com os poços apresentando a cor azul (um tom mais forte de início que vai gradualmente ficando mais rosado)

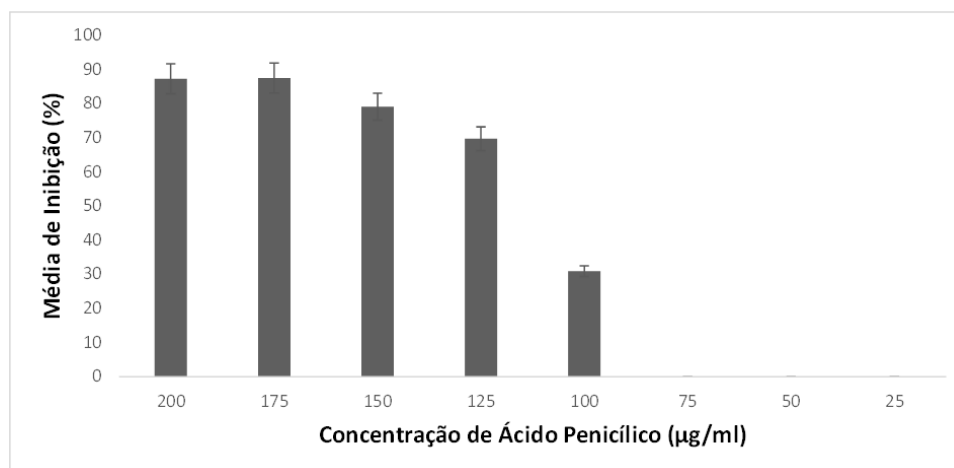
Figura 1. Placa de REMA, teste de ácido penicílico x *B. subtilis*. A esquadras as concentrações testadas em cada poço; A1 a A4: Tratamento com Ácido Penicílico; CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; X: poços não utilizados.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

A partir de sua análise quantitativa pelo leitor de fluorescência, foi possível determinar a média de inibição de cada concentração testada obtendo o gráfico da Figura 2.

Figura 2. Médias de inibição em *B. subtilis* em diferentes concentrações de ácido penicílico (200 µg/mL a 25 µg/mL)

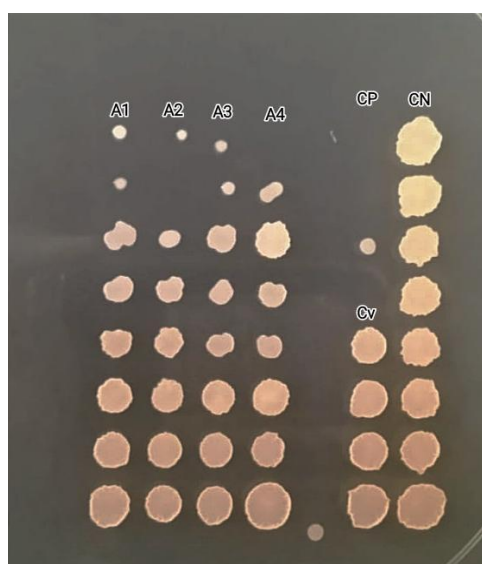


Fonte: Dados da pesquisa, 2025

Como observado na Figura 2, o composto apresentou inibição superior a 80% nas concentrações de 200 e 175 µg/mL, não atingindo 90% de inibição nestas concentrações, observou-se também um decaimento contínuo da atividade conforme a concentração do composto diminui até 100 µg/mL, não possuindo mais inibição significativa em 75 µg/mL em diante. O composto não atingiu valores acima de 90%, sendo assim optou-se por calcular sua IC_{50} , 110µg/ml ($R=0.97$).

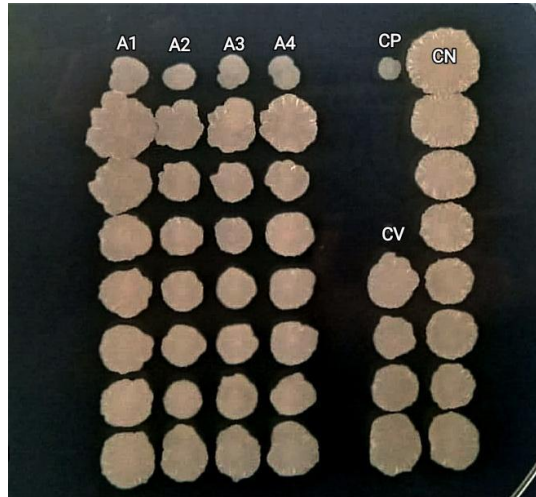
Além disso, com base no bioensaio bactericida apresentado nas Figura 3 e 4 e cruzando os dados obtidos e analisados no REMA, foi possível verificar que o ácido penicílico apresenta caráter bacteriostático, mesmo na maior concentração testada (200 µg/ml), apresentando crescimento bacteriano a partir de 12 horas da inoculação em placa (A1-3).

Figura 3. Placa de CBM, 12h, teste de ácido penicílico x *B. subtilis*. A1 a A4: Tratamento com Ácido Penicílico; CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

Figura 4: Placa de CBM, 24h, teste de ácido penicílico x *B. subtilis*. A1 a A4: Tratamento com Ácido Penicílico; CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo

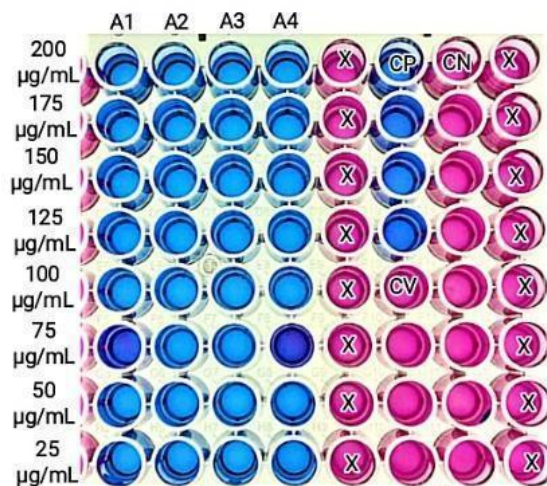


Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

3.2 Avaliação antibacteriana do ácido penicílico contra *E. coli*:

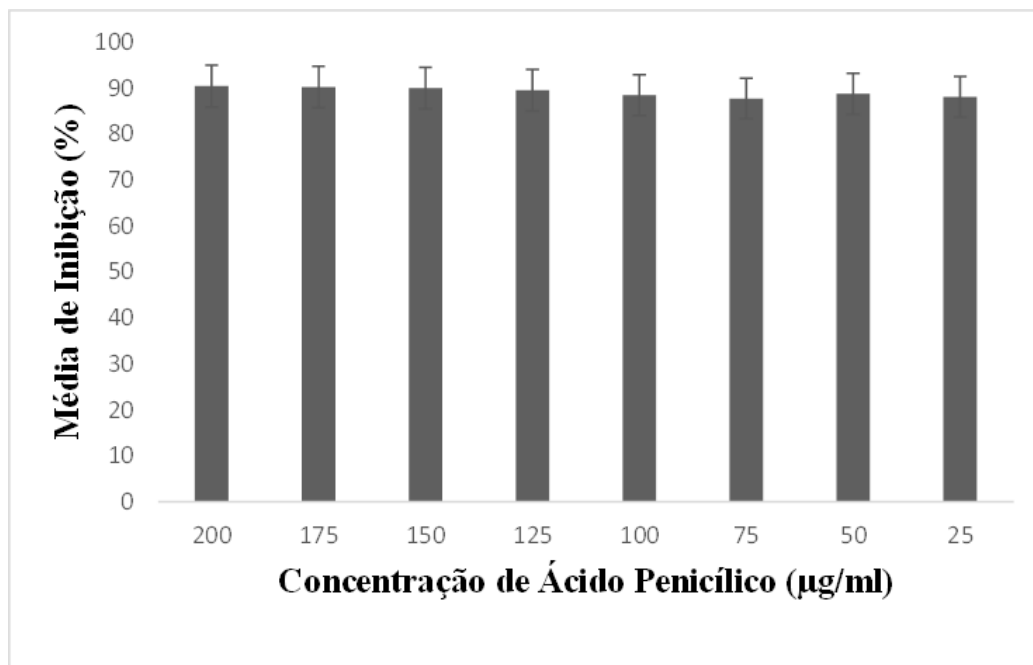
Nos bioensaios realizados em *E. coli*, o REMA, Figura 5, apresentou uma inibição visual até 25µg/ml e, ao analisar quantitativamente a placa, obteve-se o gráfico de Dose Resposta (Figura 6), no qual é verificado uma média de inibição de 89% entre 200 e 25µg/ml

Figura 5: Placa de REMA, teste de ácido penicílico x *E. coli*. À esquerda estão as concentrações testadas em cada poço; A1 a A4: Tratamento com Ácido Penicílico; CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; X: poços não utilizados.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

Figura 6: Médias de inibição em *E. coli* em diferentes concentrações de ácido penicílico (200 µg/mL a 25 µg/mL).

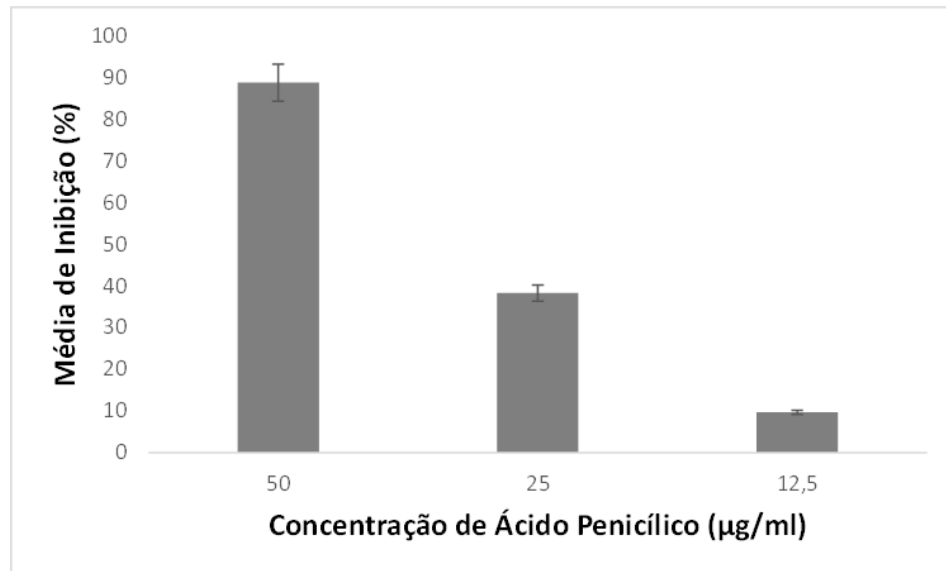


Fonte: Dados de pesquisa

Devido ao gráfico de dose resposta (Figura 6) não apresentar um decaimento de inibição conforme a diminuição da concentração de ácido penicílico, dificultando o cálculo de IC_{90} , foi realizado um novo teste com intervalo de concentração do composto de 50 µg/ml a 0.39 µg/ml, utilizando microdiluição seriada.

O gráfico de Dose resposta para esta segunda placa (Figura 7) apresentou um decaimento de inibição mais significativo conforme a concentração diminuiu pela metade. Apresentando inibição de 89% na concentração inicial (50 µg/ml) e uma queda de inibição quase pela metade na concentração subsequente, 25 µg/mL. Novamente as concentrações testadas não apresentaram uma média de inibição acima de 90%, optando-se pelo cálculo da $IC_{50} = 28,24 \mu\text{g/mL}$ ($R=0.980$).

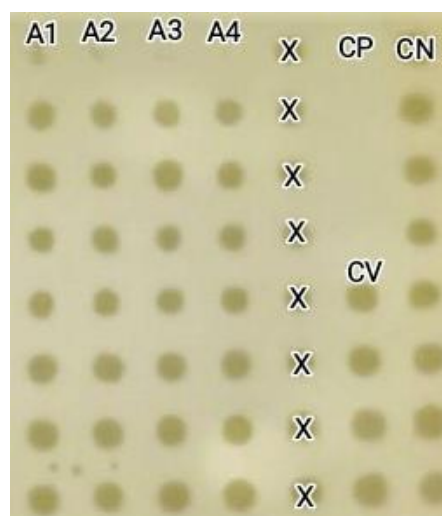
Figura 7. Médias de inibição em *E. coli* em diferentes concentrações de ácido penicílico (50 µg/mL a 12.5 µg/mL).



Fonte: Dados da pesquisa

A Figura 8 apresenta uma das placas do bioensaio bactericida em *E. coli*, como é possível verificar em todas as concentrações testadas houve crescimento bacteriano após 12h, dessa maneira foi possível verificar o carácter bacteriostático do ácido penicílico em todas as concentrações testadas para esta bactéria.

Figura 8. Placa de CBM referente a primeira placa, 12h, teste de ácido penicílico x *E. coli*. A1 a A4: Tratamento com Ácido Penicílico; CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; X: poços não utilizados.

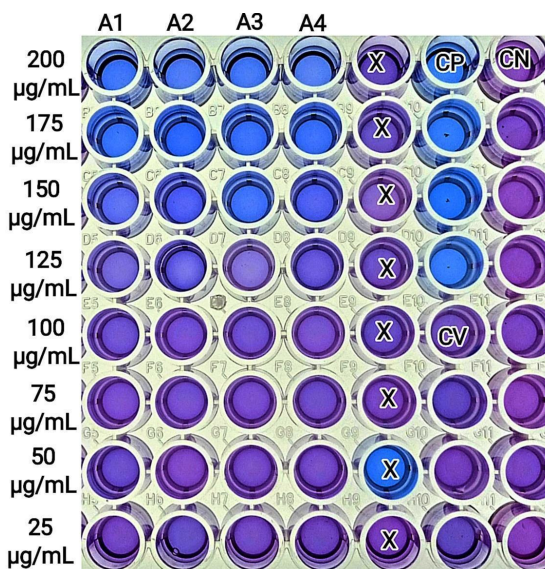


Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

3.3 Avaliação antibacteriana do Ácido Penicílico contra *P. aeruginosa*

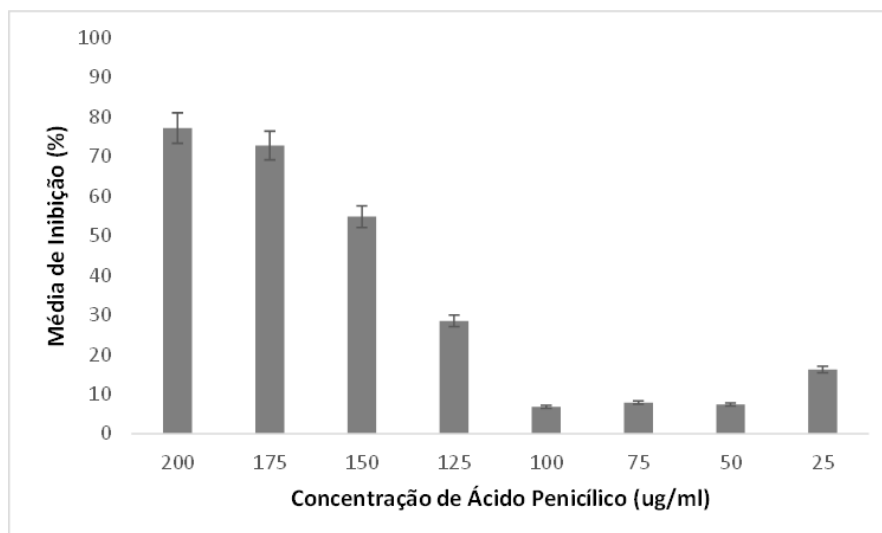
No REMA realizado com *P. aeruginosa*, visualmente foi constatada uma inibição nos três primeiros poços, Figura 9. *P. aeruginosa* se mostrou menos sensível ao ácido penicílico, com a maior média de inibição alcançada não passando 80%, mesmo na maior concentração (200 µg/mL), como verificado na Figura 10. Porém, diferente do que aconteceu em *B. subtilis*, houve inibição, mesmo que baixa, em todos os poços.

Figura 9. Placa de REMA, teste de ácido penicílico x *P. aeruginosa*. A1 a A4: Tratamento com Ácido Penicílico; CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; X: poços não utilizados.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

Figura 10. Médias de inibição em *P. aeruginosa* em diferentes concentrações de ácido penicílico (200 µg/mL a 25 µg/mL)

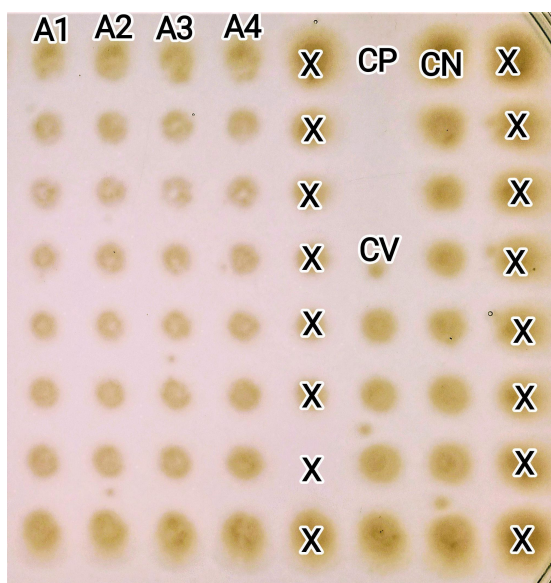


Fonte: Dados da pesquisa

O gráfico de dose respostas (Figura 10) elaborado demonstra um decaimento contínuo, que se acentua a partir de 150 µg/mL. Assim como nos testes com as demais bactérias do estudo, o composto não atingiu uma média de inibição superior a 90% em nenhuma contração testa, optando-se, novamente, pelo cálculo da IC_{50} = 153 µg/mL ($R=0.94$).

No bioensaio bactericida (Figura 11), é possível verificar que o ácido penicílico apresentou um caráter bacteriostático para todas as concentrações testadas, com crescimento normal a partir de 12h.

Figura 11. Placa de CBM, 12h, teste de ácido penicílico x *P. aeruginosa*. A1 a A4: Tratamento com Ácido Penicílico; CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; X: poços não utilizados.

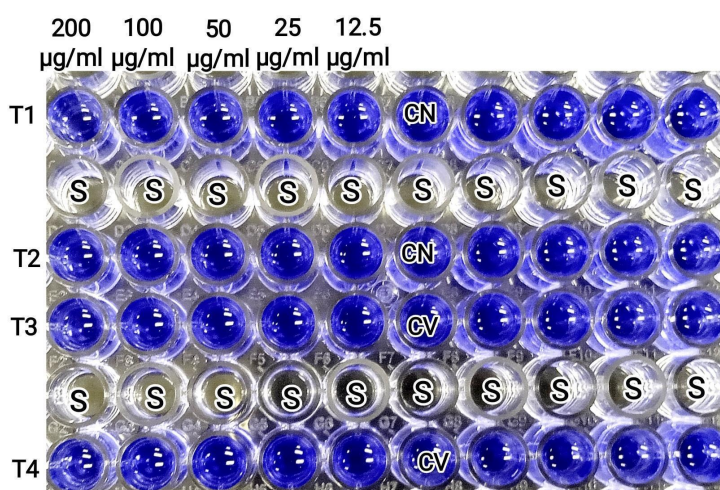


Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

3.4 Avaliação do efeito do Ácido Penicílico na produção de biofilme por *P. aeruginosa*:

O teste de atividade antibiofilme realizado com *P. aeruginosa* não apresentou, visualmente, diferenças entre os poços com o tratamento (T1 a T4) em comparação aos poços com controle negativo (CN), um indicativo que o composto não influenciou significativamente na produção de biofilme, Figura 12.

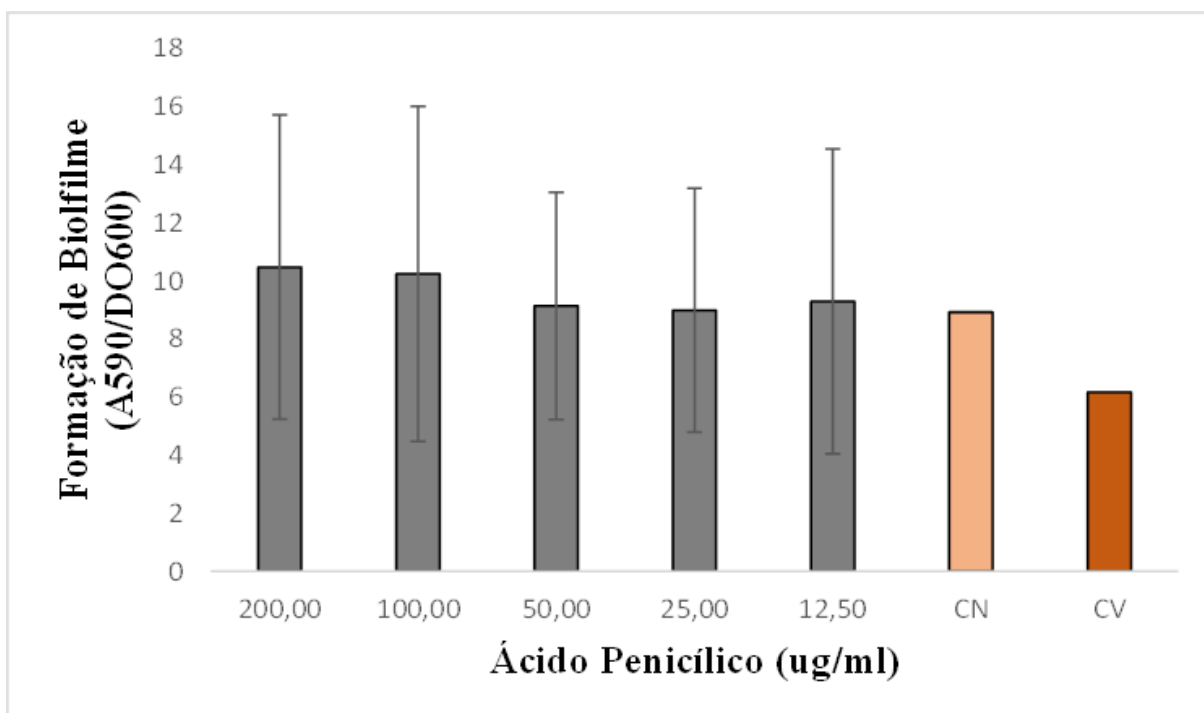
Figura 12. Placa de avaliação de Biofilme, Ácido penicílico x *P. aeruginosa*. T1 a T4: tratamento; CN: Controle negativo; CV: controle de veículo; S: poços com Salina.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

Comparando os dados da DO_{600nm} , obtidos antes de corar a placa com cristal violeta, com a Absorbância em 590 nm, obtidos após a placa corada, usando a fórmula: A_{590}/DO_{600} ; Elaborou-se um gráfico do Índice de Formação de biofilme (Figura 13), no qual constatou-se que a inibição do ácido penicílico não foi significativa, em nenhuma das concentrações testadas, em comparação ao controle negativo, sem tratamento, ou seja, a formação de biofilme nos poços com o tratamento com ácido penicílico é semelhante a formação de biofilme no controle negativo.

Figura 13. Formação de Biofilme, Ácido penicílico x *P. aeruginosa*. CN: Controle negativo; CV: controle de veículo.



Fonte: Dados de pesquisa

Como mencionado, em trabalhos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, foram obtidos resultados bastante promissores com o uso do ácido penicílico. Contra a bactéria *X. citri*, observou-se uma inibição bacteriana de 90% mesmo em concentrações extremamente baixas, como 25 µg/mL (Vieira et al., 2022). Resultados semelhantes foram encontrados para *E. coli*, com o composto apresentando inibição próxima a 90% em concentrações acima de 50 µg/mL. Além disso, o resultado está de acordo com o apresentado por Eshboev et al. (2023) que também relataram atividade antibacteriana do ácido penicílico isolado de um fungo endofítico contra *E. coli*, neste estudo o ácido penicílico inibiu em 100% o crescimento de *E. coli* na concentração de 50 µg/mL. Além disso, segundo Eshboev, et al (2023) o ácido penicílico não apresenta ação específica na redução da formação de biofilmes de *Escherichia coli*, algo que também pode ser verificado no teste realizado em *P. aeruginosa*, como demonstrado na Figura 13, o ácido penicílico não apresentou uma inibição de formação de biofilme.

Ademais, foi possível confirmar que a ação antimicrobiana do ácido penicílico se estende a bactérias clínicas. No entanto, as concentrações necessárias para inibição variaram entre os microrganismos testados. Para *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, a inibição não atingiu 90%, mesmo na concentração de 200 µg/mL. Vale destacar o caso de *P. aeruginosa*, que apresenta mecanismos

variados de evasão, sendo conhecida por utilizar mecanismos de resistência intrínseca e adquirida variados para neutralizar a ação da maioria dos antibióticos, o que dificulta a ação de compostos com ação antimicrobiana (Pang, Z. et al, 2019).

4 CONCLUSÃO

O Ácido penicílico é uma molécula promissora nos estudos de substâncias antibacterianas, de acordo com os resultados foi possível concluir que o ácido penicílico apresentou atividade antibacteriana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, entretanto apresentou uma inibição pouco significativa na inibição da formação de biofilme em *P. aeruginosa*.

O ácido penicílico apresentou uma boa inibição para *E. coli*, mesmo em concentrações baixas de 50 µg/mL, demonstrando seu potencial para terapias combinadas, abrindo possibilidades para novos estudos com novas bactérias.

REFERÊNCIAS

- BEYER, P.; PAULIN, S. **The antibacterial research and development pipeline needs urgent solutions**. *ACS Infect. Dis.* 6, 1289–1291, (2020).
- CAMPOS, L.C.; TRANULSI, L.R. *Escherichia*. In.: Trabulsi, L.R. *et al.* *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo : Atheneu, p.215-228, (2000).
- CHEN, X. *et al.* **The microbial coinfection in COVID-19**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 7777–7785 (2020).
- COLON, B. P. *et al.* **Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion**. *Nat. Microbiol.* 1, 16051 (2016).
- GETAHUN, H., SMITHI, I., TRIVEDI, K., PAULIN, S.; BALKHY, H. H. **Tackling antimicrobial resistance in the COVID-19 pandemic**. *Bull. World Health Organ.* 98, 442–442A (2020).
- ESHOEV, F. *et al.* **Antimicrobial and cytotoxic activities of the secondary metabolites of endophytic fungi isolated from the medicinal plant *Hyssopus officinalis***. *Antibiotics (Basel)*, Basel, v. 12, n. 7, p. 1201, 18 jul. 2023.
- FERRARA, F. *et al.* **The challenge of antimicrobial resistance (AMR): current status and future prospects**. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 397(12), 9603–9615 (2024).
- HARMS, A., MAISONNEUVE, E.; GERDES, K. **Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure**. *Science* 354, aaf4268 (2016).
- LIAQAT, I. *et al.* **Type 2 Quorum Sensing Monitoring, Inhibition and Biofilm Formation in Marine Microorganisms**. *Current Microbiology* 68, 342-351, (2014).
- MARRRRIE, T. J.; SUNG, J. Y.; COSTERTON, J. W. **Bacterial biofilm formation on nasogastric tubes**. *J Gastroenterol Hepatol*, 5, 503-506, (1990).
- MATIAS, V. R.; BEVERIDGE, T. J. **Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space**. *Mol Microbiol.* 56:240–251, (2005).
- Muller, A.; Wenzel *et al.* **Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E7077- E7086, (2016).
- NADIMPALLI, M. L. *et al.* **Urban informal settlements as hotspots of antimicrobial resistance and the need to curb environmental transmission**. *Nat. Microbiol.* 5, 787–795 (2020).
- NICKEL, J.C.; DOWNEY, J. A.; COSTERTON, J. W. **Ultrastructural study of microbiologic colonization of urinary catheters**. *Urology*, 34(5):284-291, (1989).
- OLDENBURG, C. E.; DOAN, T. **Azithromycin for severe COVID-19**. *Lancet* 396, 936–937 (2020).

- PANG, Z. *et al.* **Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies.** *Biotechnology Advances*. 37, 177-192 (2019).
- PINHO, M. G.; KJOS, M.; VEENING, J. W. **How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria.** *Nat. Reviews Microbiol.* 11, 601–614, (2013).
- RASMUSSEN, T. B. *et al.* **Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species.** *Microbiology*, 151, 1325-1340, (2005).
- RAWSON, T. M. *et al.* **Antimicrobial use, drug-resistant infections and COVID-19.** *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 409–410 (2020).
- SAIDENBERG, A. B. S. **Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas em psitacídeos com diferentes manifestações clínicas.** 76 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, (2008).
- SAVIOLLI, J.Y. **Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo.** 84 f. Dissertação mestrado. Universidade de São Paulo, (2010).
- SCHRADER, S. M.; VAUBOURGEIX, J.; NATHAN, C. **Biology of antimicrobial resistance and approaches to combat it.** *Sci. Trans. Med.* 12, eaaz6992 (2020).
- SODHI, M.; ETMINAN, M. **Therapeutic potential for tetracyclines in the treatment of COVID-19.** *Pharmacotherapy* 40, 487–488 (2020).
- STROHL, W.R. **The role of natural products in a modern drug discovery program.** *Drug Discovery Today* 5, 39-41, (2000).
- THI, M.; WIBOWO, D.; REHM, B. ***Pseudomonas aeruginosa* Biofilms.** *International journal of molecular sciences*, 21, 8671, (2020).
- VENTOLA, C. L. **The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats.** *Pharm. Ther.* 40, 277–283 (2015).
- VIEIRA, G. *et al.* **Isolation and agricultural potential of penicillic acid against citrus canker.** *J Appl Microbiol.* 132, 3081-3088, (2022).
- WU, T. *et al.* **A structure– activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1828, 2751-2756, (2013).
- YATES, P. A. *et al.* **Doxycycline treatment of highrisk COVID-19-positive patients with comorbid pulmonary disease.** *Ther. Adv. Respir. Dis.* 14, (2020).
- ZHOU, P. *et al.* **Bacterial and fungal infections in COVID-19 patients: A matter of concern.** *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 41, 1124–1125 (2020).