



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Campus Francisco Beltrão  
***Curso de Engenharia Ambiental***

---



DANIELI MACHADO DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DE DIFERENTES ESPÉCIES  
MICROBIANAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Francisco Beltrão

2017

DANIELI MACHADO DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DE DIFERENTES ESPÉCIES  
MICROBIANAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Eugênia Castro Bravo.

FRANCISCO BELTRÃO

2017



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Campus Francisco Beltrão  
**Curso de Engenharia Ambiental**



---

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**Trabalho de Conclusão de Curso – TCC2**

**ATIVIDADE DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DE DIFERENTES ESPÉCIES  
MICROBIANAS**

por

**Danieli Machado de Oliveira**

Trabalho de Conclusão de Curso 2 apresentado às 08 horas e 00 min., do dia 21 de novembro de 2017, como requisito para aprovação da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

---

**Prof. Dra. Denise Andreia Szymczak**  
Coordenadora do Curso de Engenharia  
Ambiental

---

**Prof. Dra. Claudia Eugênia Castro**  
Professor Orientador

---

**Prof. Dr. Adir Silvério Cembranel**  
Membro da Banca

---

**Profa. Dra. Elisete Guimarães**  
Membro da Banca

---

**Prof. Dra. Denise Andréia Szymczak**  
Professor do TCC2

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso de Engenharia Ambiental”

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por toda a força, paciência e sabedoria para concluir mais essa etapa.

Agradeço à minha mãe por todo o apoio, ajuda, a confiança e todo amor que demonstrou ao longo de toda a minha trajetória.

À minha orientadora por todo o incentivo, apoio, amizade e por nunca desacreditar da minha capacidade.

À professora Naimara pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao meu namorado Jean pela ajuda, incentivo, amor e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu irmão Alexsandro e minha cunhada Michelle por sempre me apoiarem e ficarem do meu lado.

Às minhas companheiras de casa Enaile, Ana Cristina e Melanie, pela amizade, companheirismo e por sempre me apoiar e incentivar. E à minha amiga Mariana por sempre estar do meu lado.

Aos colegas da graduação, que de alguma forma contribuíram para essa realização.

Aos professores Adir e Elisete pelas contribuições.

E por fim, a todos os professores e servidores que de alguma maneira contribuíram para a minha formação acadêmica e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Francisco Beltrão.

## RESUMO

OLIVEIRA, Danieli M. **Atividade de enzimas proteolíticas de diferentes espécies microbianas**. 2017. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso Superior de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2017.

Levando em consideração a crescente utilização de tecnologias que minimizem os impactos ambientais ocasionados por compostos tóxicos e poluentes, a utilização das proteases em larga escala surge como uma alternativa aos processos químicos convencionais aplicados em processos industriais atuais. A degradação de resíduos industriais com capacidade poluente pode ser realizada por processos biotecnológicos, utilizando enzimas microbianas que estejam ligadas ao processo de degradação do poluente. Desta forma, este trabalho, teve como objetivo determinar a atividade enzimática proteolítica *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Francisco Beltrão. A determinação qualitativa da atividade enzimática de *B. subtilis* e *P. aeruginosa* foi realizada em triplicata pelo método de picada em meios de cultura sólidos, denominado Ágar Leite, contendo  $18\text{gL}^{-1}$  de ágar,  $2,5\text{gL}^{-1}$  de extrato de levedura,  $1\text{gL}^{-1}$  de glicose,  $2,5\text{gL}^{-1}$  de NaCl e  $100\text{mL}^{-1}$  do substrato indutor, neste caso, leite desnatado. A atividade enzimática foi determinada através da relação entre o diâmetro médio do halo e o diâmetro médio da colônia, expresso como Índice Enzimático (IE) e para análise estatística utilizou-se o teste t de Student. Com base nos resultados experimentais, o bioensaio qualitativo da atividade enzimática de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram resultado positivo para a produção de proteases não havendo diferença significativa entre as médias de IE ( $p \geq 0,05$ ).

**Palavras chaves:** Biodegradação. Biotecnologia. Microrganismos.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Danieli M. **Activity of proteolytic enzymes of different microbial species**. 2017. 34 pg. Work of Course Conclusion (Graduate) - Environmental Engineering Degree. Federal Technological University of Paraná. Francisco Beltrão, 2017.

Considering the increasing use of technologies that minimize the environmental impacts caused by toxic and polluting compounds, the use of proteases in large scale appears as an alternative to the conventional chemical processes applied in current industrial processes. The degradation of industrial waste, with polluting capacity, can be carried out by biotechnological processes, using microbial enzymes linked to the process of degradation of the pollutant. Thus, this work aimed to determine the proteolytic enzymatic activity of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The experiment was carried out at the Laboratory of Microbiology of the Federal Technological University of Paraná, Francisco Beltrão Câmpus. The qualitative determination of the enzymatic activity of *B. subtilis* and *P. aeruginosa* was performed in triplicate by the method of stinging in solid culture media, called Milk Agar, containing 18 g.L<sup>-1</sup> of agar, 2.5 g.L<sup>-1</sup> of yeast extract, 1 g.L<sup>-1</sup> of glucose, 2.5 g.L<sup>-1</sup> of NaCl and 100 mL.L<sup>-1</sup> of the induction substrate, in this case, skim milk. The enzymatic activity was determined through the relationship between the mean halo diameter and the mean colony diameter, expressed as Enzymatic Index (EI) and for statistical analysis, the Student's t-test was used. Based on the experimental results, the qualitative bioassay of the enzymatic activity of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* presented a positive result for the production of proteases, and there was no significant difference between the means of EI ( $p \geq 0.05$ ).

**Keywords:** Biodegradation. Biotechnology. Microorganisms.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Halos de atividade proteolítica de *B. subtilis* e *P. aeruginosa* inoculado pelo método de picada em meio sólido a 37°C por 72 h. Todos os testes foram realizados em triplicata. ....23
- Figura 2: Representação gráfica do índice enzimático de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. ....24

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios do índice Enzimático (IE em cm) de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	22
--	----

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 OBJETIVO.....	12
2.1 OBJETIVO GERAL .....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	13
3.1 MICRORGANISMOS E MEIO AMBIENTE.....	13
3.2 RESÍDUOS INDUSTRIAIS .....	14
3.3 BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS.....	15
3.4 ENZIMAS MICROBIANAS NA BIORREMEDIAÇÃO.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
4.1 MICRORGANISMOS.....	20
4.2 BIOENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	20
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
6 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

## 1 INTRODUÇÃO

Com o acelerado desenvolvimento das indústrias, nota-se uma intensa exploração dos recursos naturais, causando grande impacto ao meio ambiente. A falta de conscientização gera uma grande quantidade de resíduos que são expostos ao meio todos os dias, gerando necessidade de maior atenção por meio dos órgãos ambientais, por isso a busca de meios para resolver os problemas ambientais.

Em consequência a esses impactos, Marques (2011) afirma que todos os dias, são lançados a natureza desafios de assimilar novos produtos artificiais, estranhos ao meio, sendo incapazes de promover o controle de seus usos e riscos, dificultando a capacidade dos ciclos naturais da sua degradação.

A degradação dos resíduos industriais com capacidade poluente pode ser realizada por processos biotecnológicos, que de maneira geral, abrangem os processos em que um catalisador biológico é utilizado para a conversão de um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas (OLIVEIRA & MANTOVANI, 2009).

Como catalisador biológico, o uso de microrganismos como ferramenta para a remediação de ambientes contaminados é chamado de biorremediação. Este processo pode ser realizado por meio de um ou mais consórcios microbianos, para a degradação de contaminantes orgânicos poluentes (PEREIRA & LEMOS, 2003).

Os catalisadores biológicos chamados de enzimas são na maioria das vezes proteínas, formadas por longas cadeias de aminoácidos com ligações peptídicas (ZANOTTO, 2003). Sua função consiste em acelerar a velocidade de uma reação química mediante a diminuição da energia de ativação da reação sem que seja consumida durante o processo (LIMA et al., 2008). As alterações que podem ser verificadas são consequências por um lado do desenvolvimento microbiano e por outro da atividade enzimática (VIEIRA, 2013).

Apesar das enzimas obtidas de microrganismos não tolerarem muitas modificações estruturais, esse fato é compensado pela diversidade de microrganismos na natureza. Embora alguns biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais e vegetais, as enzimas industriais são geralmente obtidas de microrganismos (bactérias, bolores e leveduras) e têm-se uma maior diversidade (ZANOTTO, 2003).

Desta forma, este trabalho, tem como objetivo determinar a atividade de enzimas proteolíticas de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Verificar a atividade de enzimas proteolíticas produzidas por *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar bioensaios qualitativos entre isolados de espécies *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- ✓ Determinar o valor do índice de atividade enzimática de cada microrganismo testado;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 MICRORGANISMOS E MEIO AMBIENTE

Estima-se que os primeiros microrganismos surgiram há mais de 3,5 milhões de anos em um período em que a Terra passava por grandes transformações geológicas e químicas, quando a atmosfera ainda não tinha oxigênio. A ação de processos metabólicos microbianos ao longo de milhões de anos resultou na formação de uma atmosfera rica em oxigênio, permitindo o surgimento e a evolução de novas formas de vida aeróbias, organismos multicelulares complexos, plantas e animais superiores. (TORTORA, FUNKE E CASE, 2012).

Os microrganismos são as entidades bióticas mais numerosas e antigas, capazes de colonizar com sucesso cada nicho ecológico possível do planeta. Atualmente, sabe-se que os microrganismos podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes do planeta, inclusive em condições ambientais que extrapolam os limites de tolerância de plantas e animais. Devido a sua relativa simplicidade morfológica e grande diversidade genética e metabólica, os microrganismos se adaptaram para viver em *habitats* e condições diversas do planeta, como em baixas concentrações de nutrientes e baixa atividade de água, extremos de temperatura, salinidade, pH e pressão, entre outros (TORTORA, FUNKE E CASE, 2012).

Devido estas características, os microrganismos, através de suas vias metabólicas intracelulares e de moléculas bioativas excretadas para o meio externo, atuam na manutenção do ciclo biológico de elementos químicos, no controle populacional, na descontaminação de ambientes aquáticos e terrestres, na degradação de diversos poluentes e na disponibilização de nutrientes para diferentes formas de vida (PEREIRA JR, BON E FERRARA, 2008; OLIVEIRA, SETTE E FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006).

### 3.2 RESÍDUOS INDUSTRIAIS

Os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e frequentes, principalmente pelo rápido crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial. Com estes ingredientes os problemas devido à ação antrópica têm atingido grandes dimensões, podendo ser observadas através de alterações na qualidade do solo, ar e água (KUNZ E PERALTA-ZAMORA, 2002).

As atividades industriais atraíram problemas devido à eliminação de rejeitos tóxicos provenientes de subprodutos gerados pelas indústrias. A eliminação desses produtos é, atualmente, um dos mais importantes assuntos em controle de poluição, o que tem levado os pesquisadores a buscarem novas técnicas e ferramentas mais poderosas que visem à remoção desses compostos do ambiente (ANDRADE, 2003).

Do processo de extração da matéria prima até os processos de transformação de materiais devem ser encarregados de uma série de etapas que evitam o descarte final e que possam ter informação do tipo de material que é lançado ao meio. Por isso a ideia de transformar os materiais pré-existentes em um processo benigno para o meio ambiente, para que sua vida útil prolongue e haja uso novamente (MENEGUCCI et al., 2015).

Os resíduos industriais podem ser originados nas atividades dos diversos ramos da indústria, tais como: metalúrgica, químico, petroquímico, papel e celulose, indústria alimentícia, couro, entre outros. Os resíduos são variados e podem conter produtos químicos, metais e solventes químicos, os quais ameaçam os ciclos naturais onde são despejados (KRAEMER, 2005).

Substâncias xenobióticas, ou seja, substâncias estranhas ao ambiente natural compreendem vários tipos de compostos aplicados nas diferentes indústrias, tais como agrotóxicos, corantes, fármacos, polímeros e plásticos, podendo ser tóxica a sistemas biológicos e/ou recalcitrantes, uma vez que não fazem parte do conjunto de moléculas produzidas pelo metabolismo evolutivo que propicia vida na Terra. Muitos dos xenobióticos e/ou seus produtos de degradação resultam em efeitos nocivos e/ou mutagênicos aos organismos vivos, podendo levar à eliminação seletiva de indivíduos e acarretar modificações na estrutura ecológica e funcional da comunidade biológica (GAYLARDE, BELLINASSO, MANFIO, 2005).

Portanto, além da preocupação com a poluição dos nossos recursos naturais, outra preocupação é o efeito que essas substâncias no ambiente, podem trazer à saúde humana. Muitos destes resíduos se acumulam nos organismos vivos e sofrem processos de biomagnificação, ou seja, atingem a cadeia alimentar podendo ser absorvidos pelo homem. Sabe-se que grande parte dessas substâncias possui potencial mutagênico e cancerígeno e os efeitos da sua entrada constante no organismo ainda não são completamente conhecidos (QUEIROZ & STEFANELLI, 2011).

Há a necessidade de se dar destino adequado a certos resíduos orgânicos, sejam eles industriais ou domiciliares, e ter conhecimento sobre a importância de um maior conhecimento sobre as características desses resíduos, para o tratamento (COTTA et al., 2015).

### 3.3 BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS

A degradação dos resíduos industriais com capacidade poluente pode ser realizada por processos biotecnológicos denominados biocatálise ou biotransformação, que de maneira geral, abrangem os processos em que um catalisador biológico é utilizado para a conversão de um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas (OLIVEIRA & MANTOVANI, 2009).

A diversidade metabólica definida pelo número, tipo e taxa de utilização de um conjunto de substratos pela comunidade microbiana, que é consequência da diversidade genética, dos efeitos ambientais na expressão gênica e das interações ecológicas entre as diferentes populações (ZAK et al., 1994), pode encontrar microrganismos capazes de degradar vários substratos, incluindo os poluentes industriais.

O uso de microrganismos como ferramentas para a remediação de ambientes contaminados é chamado de biorremediação. Este processo pode ser realizado por meio de um ou mais consórcios microbianos na degradação de contaminantes orgânicos poluentes (PEREIRA & LEMOS, 2003).

Gaylarde et al., 2005, afirma que este processo biotecnológico de remediação tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica como uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como

águas superficiais, subterrâneas e solos, além de resíduos e efluentes industriais, sendo a alternativa ecologicamente mais adequada.

Os tratamentos de biorremediação são basicamente de dois tipos: 1) *ex situ* (ou off-site), realizado fora do local onde ocorreu a contaminação e, por isso, é um tratamento que requer a remoção do meio contaminado para outro local. A adoção deste procedimento pode resultar em um aumento considerável do custo do processo, porém, é possível controlar com maior facilidade, as condicionantes do meio, que são consideradas os fatores-chave utilizados no tratamento; 2) *in situ* (ou on-site), tratamento feito no próprio local da contaminação. Normalmente, essa opção de biorremediação torna o processo mais atrativo e economicamente viável, quando comparado ao tratamento citado anteriormente (ANDRADE, AUGUSTO & JARDIM, 2010).

Uma das técnicas *in situ* é a biorremediação natural, na qual o contaminante permanece no local e, por meio de processos naturais ocorre a descontaminação do ambiente. Entretanto, pode ser muito lenta em função do número reduzido ou inexistente de microrganismos com habilidade de degradação do composto, exigindo o uso de um conjunto de técnicas como a bioestimulação e a bioaumentação (LIMA, OLIVEIRA e CRUZ, 2011).

Na bioestimulação, nutrientes são adicionados e as condições ambientais otimizadas, visando o desenvolvimento de populações microbianas nativas. Pela bioaumentação, são adicionados microrganismos capazes de degradar rapidamente os contaminantes específicos (LIMA, OLIVEIRA e CRUZ, 2011).

Os estudos de degradação de compostos químicos têm mostrado vários microrganismos extremamente versáteis em catabolizar moléculas recalcitrantes (PEREIRA & FREITAS, 2012). Entretanto, a eficiência da biodegradação entre os vários microrganismos, depende, em muitos casos, da estrutura da molécula do poluente e da presença de enzimas hábeis em degradar.

Segundo Costa et al., 2015, a biocatálise/biodegradação apresentam características como a perda de atividade catalítica ao longo do tempo, menores taxas de conversão com relação a outros processos e o elevado tempo de reação, que necessitam ser aprimoradas.

### 3.4 ENZIMAS MICROBIANAS NA BIORREMEDIAÇÃO

A princípio, todos os seres vivos são fontes de biocatalisadores e as enzimas presentes podem ser utilizadas nos mais diversos tipos de reações orgânicas. Na obtenção de enzimas para aplicação biotecnológica, os microrganismos merecem destaque, por terem menores custos na sua obtenção, além da possibilidade de produção em larga escala (LIMA, OLIVEIRA e CRUZ, 2011).

As enzimas são extraídas de micro-organismos, plantas ou tecidos animais e fazem parte de um grupo de substâncias que podem influenciar no desenvolvimento de outros micro-organismos. São de natureza geralmente proteica, com atividade intra ou extracelular que têm funções catalisadoras de reações químicas, as quais sem a sua presença, aconteceriam a uma velocidade demasiadamente baixa (SGARBIERI, 1998).

Podem ser aplicadas em uma ampla gama de processos industriais, sejam isoladas ou sendo produzidas *in situ* por microrganismos capazes de degradar rapidamente os contaminantes específicos (COSTA et al., 2015).

Dentre os microrganismos que produzem enzimas que exercem papel importante em processos industriais com alto valor econômico agregado ou ambientalmente desejado, destacam-se os gêneros *Kluyveromyces*, *Penicillium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pandoraea*, *Aspergillus niger*, *Burkholderia*, *E.coli* e *Serratia*, *Gliocladium*, *Pleurotus*, *Auricularia*, *Ganoderma*, *Lentinus*, *Actinomadura*, *Aspergillus terreus*, *Auricularia mixotricha* (BRAVO et al., 2000; GERMANO et al., 2003; PINHEIRO 2006; GIONGO, 2006; NASCIMENTO E MARTINS, 2006; MARTINS, 2007; RODRIGUES 2008; SILVA et al., 2009; CRUZ, 2011; PALSANIYA, 2012; SACCO, 2013; NEVES, 2014; SILVA, 2015; SILVEIRA, 2015; LIMA, 2016; SANTOS, 2016; SACCO, 2017).

Apesar de um microrganismo ser capaz de produzir mais de mil enzimas distintas, é necessário um trabalho cuidadoso para o isolamento de espécies que produzam determinadas enzimas com as características desejadas (ZANOTTO et al., 2003).

Os microrganismos, pela sua habilidade em sobreviver em ambientes extremos, vêm crescendo o interesse para as indústrias biotecnológicas (CABRAL, 2016).

Algumas enzimas são capazes de quebrar ligações peptídicas de cadeias protéicas, sendo denominadas assim de proteases. A reação catalisada pela protease é uma reação de hidrólise da cadeia polipeptídica (substrato), na qual aminoácidos e cadeias polipeptídicas menores podem ser gerados como produtos imediatos da reação (LIMA et al., 2008).

Segundo Vieira (2013), as proteases, encontram-se em todos os seres vivos e representam cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos. Entretanto, os cultivos microbianos são preferidos, frente a outras fontes de enzimas, devido ao seu rápido crescimento e ao pequeno espaço de tempo necessário ao seu cultivo, sendo responsáveis por grande parte da produção de proteases em escala industrial além da facilidade de manipulação genética, diversidade genética (Rao *et al.*, 1998).

Como produtores de enzimas, os microrganismos proteolíticos são os que tem potencial em degradar substratos ricos em proteínas (OLIVEIRA, et al., 2012). Estas enzimas podem ser utilizadas nas indústrias de detergentes, processamento de couro, produção de alimentos, indústria farmacêutica, tratamento de efluentes, alternativas no uso de antibióticos, entre outras, representando o mercado mundial de enzimas (60%), no mercado de enzimas, no qual vem ganhando grande importância, por ser uma alternativa de conservar o pensamento verde (BURKERT, 2003; CARDOSO et al., 2003; GAYLARDE et al., 2005; MENDES et al., 2005; COLEN, 2006; SILVEIRA et al., 2007; BON et al., 2008; MONTEIRO e SILVA, 2009; ORLANDELLI et al., 2012; LIMA et al., 2015; CABRAL, 2016).

Segundo Monteiro e Silva (2009), a busca de microrganismos que possam produzir essas enzimas é constante e várias técnicas de biologia molecular estão disponíveis hoje para utilização nesse processo. Uma das maiores dificuldades da indústria é encontrar enzimas que suportem as condições industriais como variação de temperatura e pH.

A procura pela obtenção dessas enzimas sempre chamou a atenção da comunidade científica. Os principais objetivos dos estudos é a seleção de microrganismos com potencial para produção de enzimas e a otimização das condições de cultivo microbiano para obtenção de quantidades relevantes de enzimas (BRAVO et al., 2000; CARVALHO, et al., 2008, BRAVO-MARTINS et al., 2009; ORLANDELLI et al., 2012; LIMA et al., 2015).

Para que se tenha uma adequada produção de enzimas é necessário ter conhecimento que o desenvolvimento microbiano é proporcional às necessidades nutricionais de cada microrganismo como a água, fonte de carbono, e a relação nitrogênio e oxigênio (BON et al., 2008).

A determinação específica da composição da comunidade bacteriana é importante, propiciando a identificação das bactérias e o conhecimento do metabolismo (UNGAR et al., 2008).

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa extremamente versátil, que pertence à família Pseudomonadaceae (PALLERONI et al., 1973). Pode ser encontrada em diversos ambientes, principalmente solo e água, ou ainda associada a plantas e animais, onde pode causar infecções oportunistas. É uma bactéria e caracteriza-se por ser aeróbia estrita, podendo ser observada como células isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas, revelando mobilidade através de flagelo polar monotríqueo (POLLACK, 1995). Para a classificação da espécie, devem ser consideradas algumas características metabólicas. *P. aeruginosa* é não fermentadora de carboidratos, é produtora de citocromo-oxidase, utiliza o nitrato em substituição ao oxigênio como aceptor final de elétrons, produzindo também arginina desidrolase e ornitina-descarboxilase (FERREIRA, 2005).

O gênero *Bacillus* é a maior fonte industrial de enzimas. Microrganismos deste gênero são pertencentes ao grupo das bactérias Gram-positivas, formadoras de esporos, possuem as células em forma de bastonete e são normalmente aeróbios ou anaeróbios facultativos. Geralmente crescem bem em meios definidos contendo uma dentre as várias fontes de carbono (ABATE, 1999). Muitos *Bacillus* produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que degradam polímeros complexos, como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, permitindo a utilização desses produtos como fonte de carbono e doadores de elétrons (MADIGAN et al., 2004).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMOS

As duas espécies bacterianas, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, utilizadas nesta pesquisa pertencem ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Francisco Beltrão. Ambas as espécies são mantidas sob refrigeração a 4 °C em tubos de ensaio contendo meio de cultura nutritivo (Peptona 5g/L, Extrato de carne 3g/L, Ágar 15g/L), passando por repiques periódicos para manter os microrganismos ativos.

### 4.2 BIOENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A determinação qualitativa da atividade da enzima foi realizada, seguindo a metodologia de FEITOSA et al. (2012). Foram realizados 10 bioensaios, em triplicata. O método de inoculação foi realizado por picada, com agulha de platina, em meios de cultura sólidos, denominado Ágar Leite, constituído de: 18g.L<sup>-1</sup> de ágar, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 1 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl e 100mL.L<sup>-1</sup> do substrato indutor, o qual será utilizado leite desnatado.

Em seguida as placas de ágar leite foram incubadas a 37°C por 72 horas. Após este período, os diâmetros das colônias e dos halos formados ao redor das colônias pela degradação do leite foram medidos com uma régua (cm).

A atividade enzimática consistiu na determinação através da relação entre o diâmetro médio do halo e o diâmetro médio da colônia, expresso como Índice Enzimático, de acordo com a Equação 1.

$$\text{Índice enzimático} = \frac{\text{Diâmetro do halo (cm)}}{\text{Diâmetro da colônia (cm)}} \quad (\text{Equação 1})$$

### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados utilizou-se o teste de T – Student, com o intuito de comparar as médias do índice enzimático entre as duas espécies microbianas, avaliando se houve diferença significativa entre elas, utilizando o valor de 95% de confiança.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do bioensaio para a determinação qualitativa, medido pelo índice enzimático (diâmetro do halo/diâmetro da colônia), produzido por *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* estão apresentados na Tabela 01.

**Tabela 1: Valores médios do índice Enzimático (IE em cm) de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.**

Repetição	IE de <i>B. subtilis</i>	IE de <i>P. aeruginosa</i>	p
01	1,29	1,11	
02	1,43	1,46	
03	1,62	1,68	
04	1,50	1,30	
05	1,70	1,47	
06	1,21	1,12	
07	1,20	1,13	
08	1,26	1,14	
09	1,29	1,20	
10	1,25	1,22	
<b>Média</b>	<b>1,38</b>	<b>1,28</b>	<b>0,282585024</b>

Fonte: própria.

Teste t - Student para amostras independentes: Diferenças estatisticamente significativas entre médias do índice enzimático ( $p \leq 0,05$ ).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 01, pode-se observar que os valores médios do índice enzimático da espécie *B. subtilis* e *P. aeruginosa* variou de 1,20 à 1,70 cm e 1,11 à 1,68 cm, respectivamente, sendo que em 80% das repetições a bactéria *B. subtilis* apresentou índice enzimático superiores aos produzidos por *P. aeruginosa*. Contudo, verificou-se pelo Teste t-Student, que o índice enzimático produzido pelas duas bactérias não apresentaram diferença estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança ( $p=0,282585024$ ), ou seja, não houve destaque quanto ao potencial para produção de atividade enzimática proteolítica. Entretanto, é importante ressaltar que o objetivo principal do

trabalho foi verificar a atividade de enzimas proteolíticas produzidas por diferentes espécies microbianas, sendo constatada atividade proteolítica em ambas as espécies microbianas.

Pode-se observar na Figura 01, os halos enzimáticos proteolíticos produzidos por *B. subtilis* e *P. aeruginosa*. A região mais clara ao redor das colônias corresponde ao halo enzimático proteolítico, indicando a degradação da proteína presente no meio de cultivo.

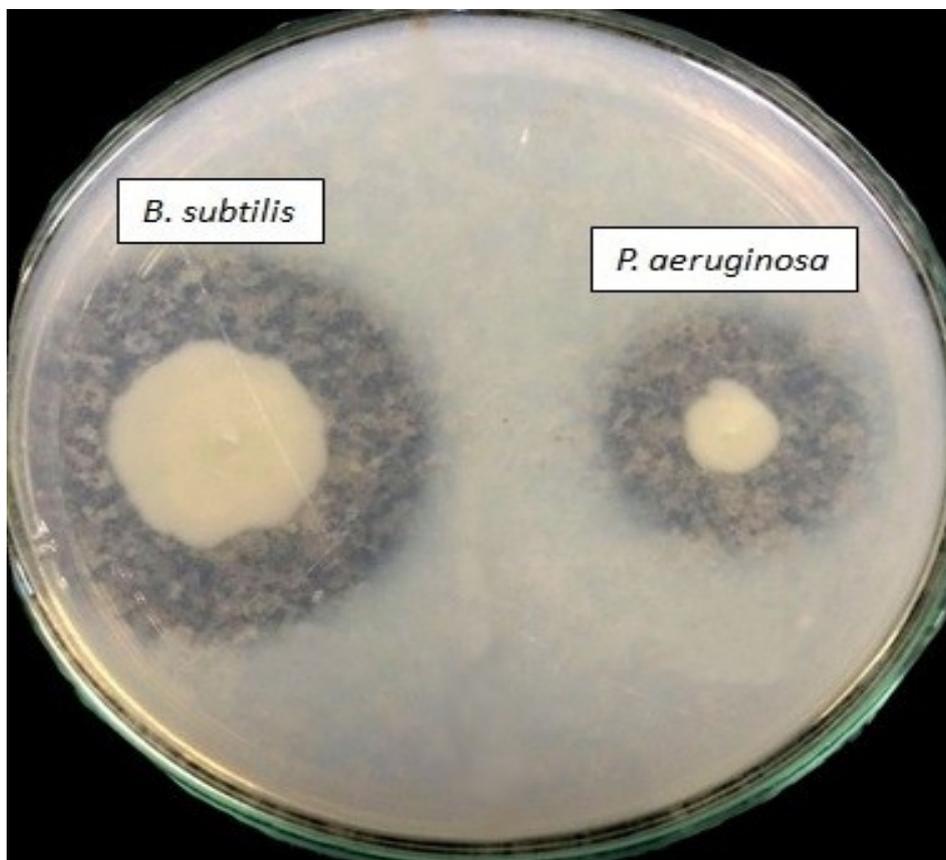
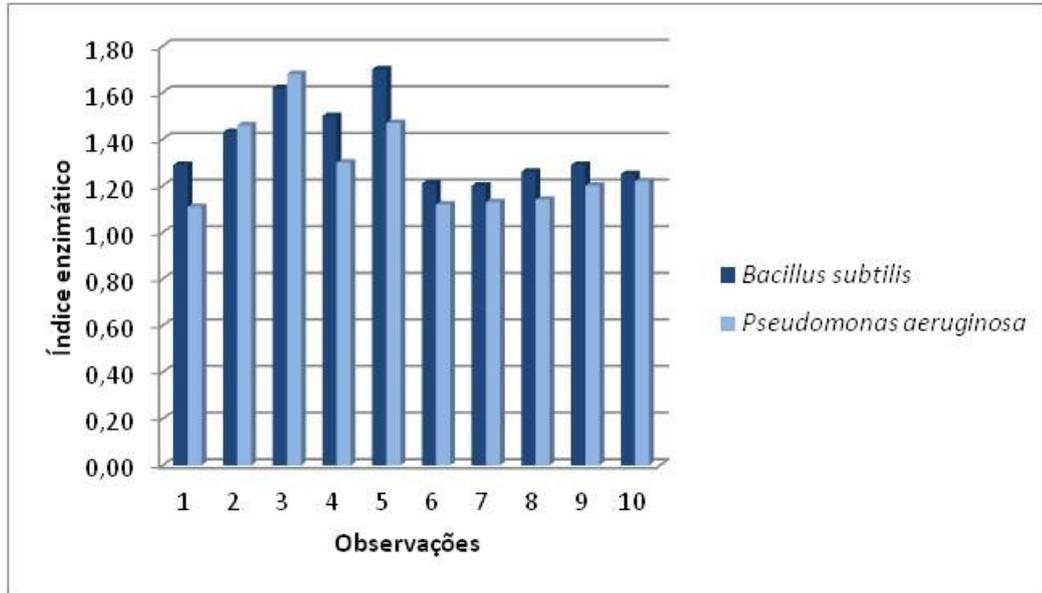


Figura 1- Halos de atividade proteolítica de *B. subtilis* e *P. aeruginosa* inoculado pelo método de picada em meio sólido a 37°C por 72 h. Todos os testes foram realizados em triplicata.  
Fonte: própria.

O valor do índice enzimático de *B. subtilis* foi maior que o valor do índice enzimático de *P. aeruginosa*, com exceção das repetições 02 e 03, possivelmente em função da quantidade de enzima extracelular secretada ou menor difusão enzimática no meio de cultivo.



**Figura 2:** Representação gráfica do índice enzimático de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonte: própria.

Deve-se levar em consideração que o índice enzimático é determinado através da relação entre o diâmetro médio do halo enzimático e o diâmetro médio da colônia microbiana, ou seja, quanto menor diâmetro do halo enzimático e maior o crescimento da colônia microbiana, valores menores de índice enzimático serão determinados.

De acordo com Ten e colaboradores (2004), há uma correlação entre o diâmetro do halo e o nível de produção de enzimas. No entanto, a produção da mesma enzima somente pode ser comparada quando todas as condições são as mesmas (incubação e meio de cultura). Desta forma, o diâmetro da região do halo pode ser útil para prever o rendimento da enzima, auxiliando de forma simples e rápida na seleção de cepas com alto potencial de produção de enzimas (TEATHER & WOOD, 1982).

A seleção de microrganismos com habilidade enzimática deve ser constantemente realizada, pois atende uma necessidade biotecnológica cada vez mais crescente sob o ponto de vista industrial e ambiental (THEATER & WOOD, 1982). Na busca de um resultado positivo, é importante ressaltar que os meios de cultivo têm de ser projetados para atender a demanda nutricional do microrganismo que vai produzir a enzima (LIMA et al., 2011).

Segundo Ten et al., (2004), dois parâmetros são usados para determinar a produção enzimática, a solubilização das partículas do substrato e a formação do halo, que foi avaliado no presente estudo. Segundo Borzani et al., (2001), a estrutura e a forma do sítio ativo fazem parte da estrutura da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças na estrutura proteica, o que torna a atividade enzimática dependente do meio ambiente.

Temperatura, pH, íons, nutrientes, substratos, umidade, tempo de incubação, condições de laboratório, fontes de carbono e nitrogênio, entre outros, são fatores que podem influenciar a produção enzimática (THEATER e WOOD, 1982; SANOMIYA e NAHAS, 2003; TEN et al., 2004; TEN et al., 2005; GIONGO, 2006; GONÇALVES, 2007).

Reconhecidos como importantes fontes de proteases, os *Bacillus* sp tem o potencial de secretar quantidades grandes de enzimas com alta produção (KUMAR e TAKAGI 1999; COSTA, 2005; NASCIMENTO, 2005; GIONGO, 2006; DIAS, 2007; LADEIRA, 2009; SILVA, 2011; FEITOSA et al., 2012; MELO et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

Chaud et al., (2007) verificou em sua pesquisa, que as condições de crescimento de *Bacillus* sp e produção de protease pelos mesmos são dependentes da estirpe a que pertence a bactéria e podem variar de acordo com as condições nutricionais do meio, juntamente com a faixa de pH, temperatura e tempo de incubação.

De acordo com Ferreira (2005), a natureza patogênica da espécie *P. aeruginosa* restringe sua aplicação em resíduo industrial, em função dos grandes riscos à saúde humana como infecções, hipertensão arterial sistêmica, doenças cardíacas, acidentes vasculares cerebrais, neoplasias, pneumonia, doença pulmonar, entre outras, nas quais, sem o tratamento correto, pode até causar a morte (BOMFIM e KNOB, 2013). Entretanto, existe a possibilidade de purificação e imobilização da enzima, porém tornaria o processo oneroso. Já a espécie *B. subtilis*, não é patogênica, é bastante usada em produção industrial enzimática, oferece menos riscos ao ambiente e a saúde humana (FERREIRA, 2005).

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos através da realização de bioensaios qualitativos, conclui-se que ambas as espécies demonstraram potencial para produção de enzimas proteolíticas. O valor médio do índice enzimático de *B. subtilis* foi aproximadamente 10% maior (1,38 cm) quando comparado com o valor médio do índice de *P. aeruginosa* (1,28cm).

Apesar de, estatisticamente não haver diferença significativa ( $p=0,282585024$ ), recomenda-se para uma próxima etapa, estudar a produção enzimática em diferentes condições experimentais, com a finalidade de conhecer as reais potencialidades de sua aplicação biotecnológica de *B. subtilis* em função do seu caráter não patogênico.

## REFERÊNCIAS

- ABATE, C.M. "Producion of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*". *Biotechnology letters*, v. 21, n. 3, 1999, pg. 249-252.
- ANDRADE, F. **Remoção de cor de efluentes têxteis com tratamento de lodos ativados e um polieletrólito orgânico**. 2003. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de Solos contaminados por Petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, Marília, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.
- BOMFIM, L. B.; KNOB, A. **Perfil epidemiológico das infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital privado no município de guarapuava-pr**. *Rev. Saúde. Com*, v. 9, n. 4, p 264-274, 2013.
- BON, E. P.; FERREIRA, M. A.; CORVO, M. L. *Enzimas em biotecnologia - produção, aplicação e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência. p. 506. 2008.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos* São Paulo, Edgard Blücher Ltda, vol.1, 2001.
- BRAVO, C.E.C.; CARVALHO, E.P.; SCHWAN, R.F., CASTRO-GÓMEZ, R.J.H.; PILÓN, L. Determinação de condições ideais para produção de poligacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, 24 (Edição Especial), 2000.
- BRAVO-MARTINS, C. E.C.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H.; SARROUH, B. F.; SILVA, S.S. Production of cellulolytic enzymes by anaerobic fungi cultivated in different conditions. **International Journal of Food Engineering**, v.5, n.3, 2009.
- BURKERT, J. F. **Otimização das condições de produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL – Y552**. 2003. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CABRAL, A. Bioprospecção in silico da capacidade adaptativa e do potencial biotecnológico da *Erythrobacter citreus* LAMA 915. 2016. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

CARDOSO, A. M.; CLEMENTINO, M. B. M.; MARTINS, O. B.; VIEIRA, R. P.; ALMEIDA, R. V.; ALQUERES, S. M. C.; ALMEIDA, W. I. 2003. Archaea: potencial biotecnológico. Rev. Biotechn. Ciência e Desenvolv., 30: 71-77.

CARVALHO, R.V.; CORRÊA, T.L.R.; SILVA, J.C.M.; VIANA, A.P.; MARTINS, M.L.L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 28(2): 380-386, abr.-jun. 2008.

CHAUD, L. C. S.; VAZ, P. V.; FELIPE, M. G. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. Nucleus, v. 4, n. 1-2, set. 2007.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. p, 206. 2006.

COSTA, C. S. **Produção de protease por *Bacillus firmus* via batelada alimentada utilizando-se perfis constante e exponencial de alimentação**. 2005. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

COSTA, C. Z.; ALBUQUERQUE, M. de. C. C.; BRUM, M. C.; CASTRO, A. M. Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão. Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 259-267, 2015.

COTTA, J. A. O.; CARVALHO, N. L. C.; BRUM, T. S.; REZENDE, M. O. O. Compostagem versus vermicompostagem: comparação das técnicas utilizando resíduos vegetais, esterco bovino e serragem. Minas Gerais, v.20, n.1, jan/mar 2015.

CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALES, Z. S. Produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger* em resíduos de cascas de mandioca. Bahia, v. 13, n. 4, f. 245-9, 2011.

DIAS, C. R. **Uso de protease de *Bacillus* spp. na hidrólise proteica de farinha de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2007. 131 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

FEITOSA, L. C. A.; SANDRI, M. R.; PIRES, A. S.; PIVA, G. A. Prospecção de *Bacillus* sp. produtores de proteases para aplicação na degradação de resíduos orgânicos. 3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente, 25 a 27 de abril, 2012, Porto Alegre.

FERREIRA, L. F. **Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. 2005. 99 f. Dissertação (Pós-Graduação) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento*, n. 34, p. 36-43, 2005.

GERMANO, S. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção, caracterização e purificação de proteases de *Penicillium* sp. por fermentação no estado sólido**. 2000. 142f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Setor de Tecnologia - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2000.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 32, f. 246-251, 2003.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.** 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. 2007. 67 f. Dissertação (Pós-Graduação) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

KRAEMER, M. E. P. A questão ambiental e os resíduos industriais. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 8, 2005, Porto Alegre.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 561–594, 1999.

KUNZ, A.; ZAMORA, P. P. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**. Curitiba, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

LADEIRA, S. A. **Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2 e propriedades da enzima.** 2009. 89 f. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2009.

LIMA, D. F.; OLIVEIRA, O. M. C.; CRUZ, M. J. M. Utilização dos fungos na biorremediação de substratos contaminados por petróleo: estado da arte. *Cadernos de Geociências*, v. 8, n. 2, 2011.

LIMA, E. E. **Produção, caracterização bioquímica de proteases produzida por fungos filamentosos e aplicação biotecnológica.** 2016. 92 f. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2016.

LIMA, M. S.; SANTOS, B. A. C.; SOARES, J. M. M. Q.; LIMA, T. R. A.; SILVA, T. H. L. Potencial de fungos filamentosos na produção de enzimas utilizando diferentes fontes de amido. *Revista brasileira de agrotecnologia. Boa vista*, v. 5, n. 1, p. 49-53, 2015.

LIMA, S. L. T.; JESUS, M. B.; SOUZA, R. R. R.; OKAMOTO, A. K.; LIMA, R.; FRACETO, L. F. Estudo da Atividade Proteolítica de Enzimas Presentes em Frutos. *Química Nova na Escola*, nº 28, maio 2008.

LISBOA, H. C. F. Fungos endofíticos: prospecção de atividade biocatalítica e aplicação biotecnológica. 2015. 222f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10ª edição. Editora Pearson education, São Paulo, 2004, 608p.

MARQUES, Rosângela F. de P. V. **Impactos ambientais da disposição de resíduos sólidos urbanos no solo e na água superficial em três municípios de Minas Gerais.** 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

MANFIO, G. P. Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil. *MICROBIOTA*. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. 2003.

MARTINS, L. M.; **Caracterização de protease e lipase de *Pseudomonas fluorescens* e quorum sensing em bactérias psicrotólicas isoladas de leite.** 2007. 163 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2007.

MELO, V. A.; TAKAKI, G. M. C.; SILVA, C. A. A. Produção de protease utilizando diferentes meios através de amostras de *Bacillus licheniformis* isoladas do porto da cidade de Recife – Pernambuco. e-xacta, v. 8, n. 1, p. 57-65, 2015.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; JÚNIOR, A. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Quim. nova**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MENEGUCCI, F.; MARTELI, L.; CAMARGO, M.; VITO, M. Resíduos têxteis: Análise sobre descarte e reaproveitamento nas indústrias de confecção. in: CONGRESSO NACIONAL DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO, 11, 2015, Rio de Janeiro.

MONTEIRO, Valdirene N.; SILVA, Roberto Do Nascimento. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. Processos químicos, Goiânia, v. 3, n. 5, p.111-222, jun. 2009.

NASCIMENTO, W. C. A. **Estudos sobre a secreção de proteases por *Bacillus sp* SMIA-2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais.** 2005, 96 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2005.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus sp* SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, v. 26, n. 3, f. 582-588, 2006.

NEVES, K. C. S. **Produção de proteases coagulantes por espécies de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia.** 2014. 99 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

OLIVEIRA, A. C. D.; WATANABE, F. M. F.; VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B.; RODRIGUES, M. L. F. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. Ponta Grossa, v. 6, n. 2, p. 822-831, 2012.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. Campinas, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; GARBOGGINI, F. F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. Multiciência: Revista interdisciplinar dos centros e núcleos da Unicamp. Out, 2006.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; ALENCAR, J.. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *Sabios: rev. saúde e biol.* [S.L.], v. 7, n. 3, p. 97-109, set./dez. 2012.

PALLERONI, N.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Bacteriol*, v. 23, p. 333-339, 1973.

PALSANIYA, P.; MISHRA, R.; BEEJAWAT, N.; SETHI, S.; GUPTA, B. L. Optomozation of alkaline protease production from bacteria isolated fom soil. *Malviya Nagar*, v. 2, n. 6, f. 858-865, 2012.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. de. Uso de microrganismos para a biorremediação de ambientes impactados. *Lavras*, v. 6, n. 6, p. 975-1006, 2012.

PEREIRA, L.T.C.; LEMOS, J.L.S. Os fungos filamentosos, uma opção em estudo para a biorremediação”. *XI Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT*. 2003.

PEREIRA, N. J.; BOM, P. S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de bioprocessos. *Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ*, v.1, p. 62, 2008.

PINHEIRO, Thaís da. L. **Produção de lipase por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicilium verrucosum* como microrganismo**. 2006. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2006.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, D.; Benneths, J.; Dolin, R. (eds.). **Principles and practice of infections diseases**, 1995.

QUEIROZ, B. P. V.; STEFANELLI, T. Biodegradação de corantes têxteis por *Anabaena flos-aqual*. *Espírito Santo do Pinhal*, v. 8, n. 1, p. 026-035, 2011.

RAO, M. B.; TANKSALE A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviwes*, Washington, v. 62, n.3, p. 597 – 635, 1998.

RODRIGUES, P. M. B. **Produção de protease pelo *Pinicillium aurantiogriseum* URM4622**. 2008. 56f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, 2008.

SACCO, L. P. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos**. 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

SACCO, L. P. **Potencial de isolados bacterianos para uso em processos biotecnológicos e agroindustriais**. 2017. 96 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017.

SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. *Ciência Rural*. v. 33, n. 5, p. 835-842, 2003.

SANTOS, J. G.; FILHO, R. F.C.; TEIXEIRA, M. F. S. Produção e caracterização de proteases de bacilos da Amazônia com potencial fibrinolítico. *Manaus*, v. 5, n. 1, p. 15-21, 2016.

SGARBIERI, VALDOMIRO C. Proteínas em alimentos proteicos: Propriedades, degradações e modificações. São Paulo, Editora Varela, 1998, 517 p.

SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS, E.S. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium Verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Ponta Grossa – PR, v. 03, n. 01, p. 28-41, 2009.

SILVA, M. A. **Produção de proteases e biossurfactantes por *Bacillus licheniformis***. 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2011.

SILVA, L. S. C. **Produção de proteases neutras de cogumelos para aplicação na indústria de detergente**. 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

SILVEIRA, L. G.; VAZ, P.; GRAÇAS, M. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. *Lorena*, v. 4, n. 1-2, 2007.

SILVEIRA, L. L. **Purificação e caracterização de proteases com atividade colagenolítica produzida por *Actinomadura* sp.** 2015. 72 f. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015

TEATHER, R. M.; WOOD, P. T. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Applied and environmental microbiology*. v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

TEN, L. N.; IM, W-T.; KIM, M-K.; KANG, M. S.; LEE, S-T. Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. *Journal of Microbiological Methods*. v. 56, p. 375– 382, 2004.

TEN, L. N.; IM, W-T.; KIM, M-K.; LEE, S-T. A plate assay for simultaneous screening of polysaccharide and protein-degrading micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*. v. 40, p. 92–98, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

UNGAR, A. B.; LOPES, M.; MARTINS, B. S.; ALARSA, M.; GOMEZ, J. G. C. A importância da identificação e caracterização de microrganismos por técnicas moleculares para definição de taxas de degradação de compostos orgânicos em processos de biorremediação de hidrocarbonetos em aquíferos de ambiente tropical. XV Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, 11-14 de novembro de 2008, Natal – RN.

VIEIRA, H. S. F. Caracterização de enzimas proteolíticas produzidas por bactérias de origem marinha. 2013. Dissertação (mestrado). Universidade de Lisboa. 2013.

ZAK, J. C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, v.26, p.1101-1108, 1994.

ZANOTTO, S. P. **Utilização de enzimas e microrganismos para a obtenção de compostos oticamente ativos**. 2003. 115f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química, UFSC, 2003.